

Investigating the vital effect of gold nanoparticles prepared by thyme extract by green synthesis method on FaDu pharyngeal cancer cell line

Shideh Khoshkheir Dariani¹, Fereshteh Atabi¹, Mojgan Alaeddini², Malihe Entezari³, Shahroo Etemad-Moghadam², Malak Hekmati⁴, Elham Rezaei Pasandideh¹

¹ Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Dental Research Center, Dentistry Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Department of Genetics, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴ Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Chemistry, Tehran Medical Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Different medicinal properties of thyme plant, anticancer effects of green synthesis of gold nanoparticles and low survival of patients with pharyngeal cancer are the main reasons for this research on the pharyngeal cancer FaDu cell line.

Materials and methods: Following preparation of thyme extract, green synthesis was performed on AuCl₃ gold salt to obtain nanomedicine. Infrared and X-ray diffraction spectroscopic tests along with scanning and transmission electron microscopy was carried out for optimization of the synthesized nanomedicine. The viability of FaDu cells was assessed by MTT after 24-, 48-, and 72-hours treatment with different concentrations of the nanomedicine and LC₅₀ was determined. Cell apoptosis was measured by flow cytometry.

Results: The mean survival of FaDu cells after treatment with different concentrations of gold nanomedicine at each of the three time points was significantly lower compared to untreated cells ($P < 0.001$). The LC₅₀ value of the nanomedicine following 48 hours of exposure was approximately 40 µg/ml. The rate of early and late apoptosis in the treated cells was calculated as 37.5%.

Conclusion: The results of the present study confirmed that gold nanoparticles synthesized from thyme extract have cytotoxic and apoptosis induction effects on FaDu pharyngeal cancer cells. Therefore, further study on the use of this nanomedicine in the treatment of pharyngeal malignancy is recommended.

Keywords: Cancer, Thymol, Thyme, Green synthesis, Gold nanoparticle, Nanomedicine, FaDu.

Cited as: Khoshkheir Dariani SH, Atabi F, Alaeddini M, Entezari M, Etemad-Moghadam SH, Hekmati M, et al. Investigating the vital effect of gold nanoparticles prepared by thyme extract by green synthesis method on FaDu pharyngeal cancer cell line. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2023; 33(3): 219-229.

Correspondence to: Fereshteh Atabi & Mojgan Alaeddini

Tel: +98 912 240 5285 & 91228779667

E-mail: f.atabi@iautmu.ac.ir, malaeddini@sina.tums.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-6051-2644, 0000-0002-3634-7992

Received: 13 Feb 2023; **Accepted:** 29 Jun 2023

بررسی اثر حیاتی نانوذرات طلا تهیه شده توسط عصاره آویشن با روش سنتز سبز بر رده سلولی سرطان حلق FaDu

شیده خوش خیر داریانی^۱، فرشته عتابی^۱، مژگان علاءالدینی^۲، ملیحه انتظاری^۳، شهرو اعتماد مقدم^۲، ملک حکمتی^۴، الهام رضایی پسندیده^۱

^۱ گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۲ مرکز تحقیقات دندانپزشکی، پژوهشکده علوم دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تهران، ایران
^۳ گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۴ گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: خواص مختلف دارویی گیاه آویشن، اثرات ضد سرطانی سنتز سبز نانوذرات طلا و بقای پایین بیماران مبتلا به سرطان حلق، دلایل اصلی این تحقیق بر روی رده سلولی سرطان حلق FaDu بود.

روش بررسی: عصاره گیری از آویشن و سنتز سبز بر روی بستر نمک طلا $AuCl_3$ انجام شد. بهینه سازی نانو داروی طلا توسط آزمون های طیف سنجی با مادون قرمز و پراش پرتو ایکس، میکروسکوپ الکترونی روبشی و عبوری صورت پذیرفت. سپس توان زیستی رده سلولی FaDu به وسیله سنجش MTT پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار با نانو دارو بررسی و غلظت LC_{50} تعیین شد و میزان آپوپتوز سلولی با فلوسایتومتری سنجیده شد.

یافته ها: میانگین زنده مانای سلول های FaDu در تیمار با غلظت های مختلف نانو دارو در هر یک از سه زمان مذکور نسبت به گروه بدون تیمار، کاهش و اختلاف آماری معنی داری نشان داد ($P < 0.001$). مقدار LC_{50} نانو دارو در زمان ۴۸ ساعت و حدود غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. میزان آپوپتوز اولیه و تاخیری در سلول های بدخیم تحت تیمار ۳۷/۵ درصد گزارش شد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر موید اثر کشندگی و القای آپوپتوز در رده سلولی سرطان حلق FaDu توسط نانوذرات طلا بر پایه عصاره آویشن بود. بنابراین شاید بتوان در آینده از این نانو دارو به عنوان دارویی با پتانسیل ضد سرطانی در درمان بدخیمی حلق استفاده کرد.

واژگان کلیدی: سرطان، تیمول، آویشن، سنتز سبز، نانوذرات طلا، نانو دارو، FaDu

مقدمه

سرطان مشکلی جدی است که سلامت همه جوامع بشری را تحت تاثیر قرار می دهد. متأسفانه طیف وسیعی از بیماری های مختلف در سطح بافت را شامل می شود که این تنوع، چالشی

عمده برای تشخیص و پیرو آن، اثربخشی در درمان را به همراه دارد (۱). کارسینوم سلول سنگفرشی حلق تقریباً ۳-۵ درصد از کل کارسینوم های سلول سنگفرشی سر و گردن را تشکیل می دهد (۲). بیش از ۹۵ درصد از بیماران مبتلا به تومورهای بدخیم حلق، سرطان سلول سنگفرشی هستند. آنها معمولاً به عنوان یک ضایعه مخاطی سطحی به صورت نواحی لکوپلاکیا یا اریتروپلاکیا ظاهر می شوند. سلول های بدخیم سرطان حلق به طور معمول رفتارهای تهاجمی داشته و از مشخصات آن ها گسترش موضعی تومور اولیه به مخاط و زیر

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران & دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، پژوهشکده علوم دندانپزشکی - مرکز تحقیقات دندانپزشکی، فرشته عتابی & مژگان علاءالدینی (f.atabi@iautmu.ac.ir & malaeddini@sina.tums.ac.ir)
ORCID ID: 0000-0002-6051-2644 & 0000-0002-3634-7992
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۲۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۴/۸

مخاط، متاستاز زود هنگام به لنف نوده‌های گردنی و میزان نسبتاً بالای دست اندازی و انتشار به نواحی دوردست است (۳). میزان بقای سرطان حلق در بین همه سرطان‌های سر و گردن یکی از بدترین هاست، بدین نحو که میزان بقای کلی ۵ ساله بین ۱۵ تا ۴۵ درصد گزارش شده است (۲). گزینه‌های درمانی موجود برای سرطان حلق شامل جراحی، پرتودرمانی یا شیمی درمانی بسته به مرحله بالینی و شرایط بیمار است (۴). با این حال، صرف نظر از درمان انتخابی، متاسفانه پیشرفت چشمگیری در میزان بقا یا کنترل موضعی در دهه‌های گذشته در رابطه با این سرطان به دست نیامده است (۲).

روش‌های معمول درمان سرطان محدودیت‌های زیادی را نشان می‌دهد که موجب اثر بخشی کم آن در تمایز بین سلول‌های سرطانی و سلول‌های سالم می‌شود. تحولات اخیر فناوری نانو، نانو مواد درمانی هوشمند و جدید را معرفی کرده است که از روش‌های مختلف هدف گذاری استفاده می‌کنند. امروزه کوچک مولکول‌ها برخی از مهم‌ترین مولکول‌ها برای عملکرد بیولوژیکی را شامل می‌شوند (۵). کوچک مولکول‌ها وزن مولکولی نسبتاً کمی دارند (به طور معمول زیر ۱۰۰۰ دالتون) و معمولاً از طریق سنتز شیمیایی قابلیت تولید دارند. لیکن از طریق عصاره گیری و تخمیر نیز تولید می‌شوند. استفاده بالینی از کوچک مولکول‌ها در داروهای احیاکننده به تازگی آغاز شده است. در مقایسه با پپتیدها و پروتئین‌ها، این داروها ارزان‌تر هستند، از ذخیره سازی نسبتاً ساده‌ای برخوردارند و کاربرد آنها بسیار آسان است. عملکرد آنها در سیستم‌های بیولوژیکی با غلظت‌های مختلف تنظیم می‌شود. آنها به طور معمول در انواع سلول‌ها و گونه‌ها عمل می‌کنند (۶). گیاه آویشن یکی از گیاهان تیره نعناعیان (Lamiaceae) است که این گیاه در مدیترانه و برخی نواحی آسیا می‌روید و امروزه در مناطق مختلف جهان و از جمله در ایران کشت و تولید می‌شود (۷). این گیاه در طب سنتی به عنوان ضد التهاب، ضداسپاسم و اختلالات گوارشی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸). آنالیز فیتوشیمیایی گونه‌های آویشن وجود ترکیبات فنلی مانند تیمول، کارواکرول، تیمونین، اسید کافئیک و اسید رزمارونیک، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها و ساپونین را تأیید می‌نماید. مطالعات گذشته نشان می‌دهند که عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده آویشن را کارواکرول و تیمول تشکیل می‌دهد (۹). تیمول به عنوان یک کوچک مولکول، یک فنول مونوترپن طبیعی است که به مقدار زیادی در آویشن باغی، پونه کوهی و پوست نارنگی یافت می‌شود (۱۰). تیمول دارای فعالیت‌های گسترده‌ای از جمله اثرات ضد میکروبی، آنتی

اکسیدانی و ضد التهابی است. در مورد اثرات ضد توموری تیمول اطلاعات محدودی گزارش شده است (۱۱). تیمول اثر ضد توموری خود را از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند مهار رشد سلولی (فعالیت ضد تکثیری)، القای آپوپتوز، تولید گونه‌های فعال اکسیژن درون سلولی، دپلاریزاسیون غشاء میتوکندریایی، فعالسازی پروتئین‌های میتوکندریایی پروآپوپتیک Bax و تعامل با کاسپاز یا پلی ADP ریبوز پلیمریز اعمال می‌کند (۱۲). از سوی دیگر نانوذرات فلزی به طور گسترده ای برای زیست پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند و در میان آنها، نانوذرات طلا (Au NPs) بسیار مورد توجه هستند (۱۳). نانوذرات طلا دارای مزایای مختلفی از جمله زیست سازگاری خوب، سنتز ساده در طیف گسترده‌ای از اندازه‌ها و عملکرد آسان و قابلیت پوشش سطحی جهت اتصال لیگاندهای مورد نیاز برای هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی و اندامک‌های موجود در آنها هستند (۱۴). ویژگی‌های قابل توجه Au NP آنها را به یک نانوحامل کارآمد در سیستم‌های انتقال دارو تبدیل می‌کند. این نانوحامل‌های موثر قادر به انتقال داروهای مختلف مانند پپتیدها، پروتئین‌ها، DNAهای پلاسמיד، RNAهای کوچک مداخله گر و عوامل شیمی درمانی هستند (۱۳). روشهای شیمیایی سنتز نانوذرات همراه با مشکلات متعددی هم چون صرف هزینه و انرژی زیاد، تولید مواد زائد سمی و مضر برای محیط زیست و سلامت انسان است. امروزه برای کاهش موارد ذکر شده از روش‌های سنتز سبز در بیوسنتز نانوذرات فلزی هم چون طلا استفاده می‌شود. گیاهان و فرآورده‌های آنها یکی از منابع طبیعی بسیار خوب و کارآمد در بیوسنتز نانوذرات فلزی هستند. تحقیقات متنوعی در سال‌های اخیر، اثر ضد سرطانی نانوذرات طلا سنتز شده توسط گیاهان دارویی را بر روی رده‌های سلولی بدخیمی‌های مختلف نشان داده‌اند.

این عصاره‌های گیاهی غنی از پروتئین، آمینواسیدها، آنزیم‌ها، ویتامین‌ها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، فنولیک اسیدها و غیره هستند که به عنوان پوشش دهنده و کاهش دهنده عمل می‌کنند و یون‌های فلزی را در طول فرآیند القای زیستی برای تولید نانوذرات یا نانوساختارها در ابعاد و مورفولوژی‌های مختلف کاهش می‌دهند (۱۵). تحقیقات متنوعی در سال‌های اخیر، اثر ضد سرطانی نانوذرات طلا سنتز شده توسط گیاهان دارویی را بر روی رده‌های سلولی بدخیمی‌های مختلف نشان داده‌اند (۱۶). مطالعات پیش بالینی متعددی به وجود پتانسیل ضدسرطان گیاه آویشن اشاره نموده‌اند. به عنوان مثال، گیاه مذکور فعالیت مهار رادیکال‌های

آزاد و اثرات پروآپوئوتیک قابل توجهی از خود نشان داده است (۱۷-۱۹).

لازم به ذکر است با توجه به پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه درمان بدخیمی‌ها، هم چنان پیش آگهی سرطان حلق ضعیف و میزان مرگ و میر آن بالا است و محققین در صدد دستیابی به روش‌های کارآمدتری در درمان این بدخیمی هستند. بر اساس جستجوهای صورت گرفته در منابع موجود، مطالعه‌ای در رابطه با اثر نانوذره طلا بر روی رده سلول‌های سرطان حلق یافت نشد. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثرات آپوئوتیک نانوذره طلا بر پایه عصاره آویشن بر روی رده سلولی FaDu سرطان حلق است.

مواد و روشها

کلیه مواد مورد استفاده در این تحقیق از بهترین مواد از شرکت سیگما و مرک تهیه شده‌اند. سلول‌های سرطانی رده سلولی FaDu سرطان حلق از مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه گردیده است. در مطالعه حاضر با کد اخلاق Thymus (IR.IAU.PS.REC.1399.092 از گیاه آویشن کوهی) Kotschyannus Boiss & Hohen با کد هرباریوم 203-1-PMP/A استفاده شد که در سال ۱۴۰۰ در تهران تهیه گردید.

آماده سازی عصاره گیاه

ابتدا برگ‌های گیاه آویشن شست و شو و خشک گردیده و به صورت پودر درآمد. ۲۰ گرم از پودر حاصل در حجم کلی ۵۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط شد. محلول حاصل به مدت ۴ ساعت بر روی شوف بالن مدل Finetech با یک سیستم رفلاکس ملایم در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفته، پس از خنک شدن با کاغذ واتمن و قیف بوخنر صاف گردید. عصاره به دست آمده برای استفاده‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

سنتز نانودارو (نانوذرات طلا با عصاره آبی گیاه آویشن)

مقدار ۱ گرم نمک طلای خریداری شده محلول در ۵۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد بر روی مگنت استیرر قرار گرفت تا به نقطه جوش رسید. مقدار ۲۵ میلی لیتر از عصاره آبی به صورت قطره قطره تا جایی به محلول طلا اضافه شد که تغییر رنگ از زرد به بنفش مشاهده گردید. پس از ۲ ساعت محلول نانوذره با دور ۴۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول زیرین در آون در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد خشک شده، به صورت پودر درآمد. مقدار ۰/۰۲ گرم از پودر بدست آمده در ۱۰ میلی لیتر DMSO با قدرت ۱۰۰ وات و به

مدت ۳ دقیقه با پروب ۴ میلی متری با دستگاه سونیکاسیون مدل topsonics سونیکه گردید. نانوذرات حاصل جهت انجام آزمون‌های تاییدی و استفاده بعدی در دمای ۲۵-۱۸ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

سنجش نانوذرات

نانوذرات تهیه شده با عصاره گیاه (نانوذرات) از نظر شکل و اندازه و... با روش‌های FTIR-EDX-SEM-TEM مورد بررسی و تایید قرار گرفتند. میکروسکوپ الکترونی عبوری جهت تعیین مورفولوژی، ساختار مواد و اندازه ذرات استفاده گردید. برای آماده سازی نمونه جهت بررسی TEM ابتدا یک سوسپانسیون از نانوذرات در آب مقطر آماده شد. بعد از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در حمام اولتراسونیک و پراکنده شدن بهتر ذرات، ۲-۳ قطره از این سوسپانسیون بر روی یک توری مسی با پوشش فیلم کربن قرار داده شد و جهت مطالعه TEM خشک گردید. این توری‌های مسی یک شبکه مسی ۳۰۰ خانه هستند با یک پوشش فیلم کربنی. در روش TEM یک پرتو الکترونی از سطح نمونه بسیار نازک عبور داده شد. پرتو عبوری از نمونه، با توزیع انرژی خاصی که مختص همان ماده است با بزرگنمایی بسیار بالا و قدرت تفکیک ۱ تا ۰/۱ نانومتر روی صفحه فلئوئورسنتس ظاهر گردید. این آزمون TEM توسط میکروسکوپ الکترونی مدل Philips em208s، 100kv انجام گردید. همچنین جهت بررسی سطح نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM مدل FEI Quanta200 ESEM با قدرت تفکیک کمتر از ۱ تا ۲۰ نانومتر، استفاده گردید. نانوذرات در این روش بر روی سطحی قرار داده شدند. پس از خشک شدن، سطح آنها با ذرات طلا به آرامی پوشیده شد. سیگنال‌های مورد استفاده توسط SEM برای تولید تصویر نتیجه برهم کنش پرتو الکترون با اتم‌های نمونه در عمق‌های متفاوت می باشد. طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) به منظور تجزیه و تحلیل ساختاری یا خصوصیات شیمیایی نانوذرات مورد استفاده قرار گرفت. جهت برانگیختن انتشار پرتو ایکس از یک نمونه، یک دسته پرتو پر انرژی از ذرات باردار مانند الکترون یا پروتون و یا یک دسته پرتو ایکس به نمونه تابیده شد. تعداد و انرژی پرتوهای ایکس ساطع شده از نانوذرات توسط دستگاه اندازه گیری گردید. این روش با دستگاه EDAX Element انجام شد. در روش طیف سنجی با مادون قرمز یا فوریه مادون قرمز (FTIR)، برخورد پرتوهای مادون قرمز به نمونه، توسط نمونه جذب شده و تعدادی از آن عبور کرده، در نتیجه جذب و عبور طیف‌های IR، توسط مولکول‌های نمونه بصورت طیف نشان داده می شود، که در این تحقیق نانوذرات با استفاده از دستگاه FTIR-8400s مدل SHIMADZU مورد بررسی قرار

گرفتند. از آنجا که KBr در طیف سنجی FTIR جذب ندارد و طیفی ایجاد نمی کند، آماده سازی نمونه در آزمون FTIR در ترکیب با KBr (پتاسیم برمید) انجام شد. پس از ترکیب شدن نمونه با این ماده، نمونه به شکل قرص درآمد و جهت بررسی و تولید طیف، در جایگاه مورد نظر در دستگاه قرار گرفت.

کشت و ذخیره سازی سلول

سلول‌های FaDu در فلاسک T25 حاوی محیط high glucose DMEM (Bioidea، ایران) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS (Bioidea، ایران)، ۱ درصد آنتی بیوتیک (۵۰۰۰ واحد/لیتر پنی سیلین و ۵۰ میلی گرم / لیتر استرپتومایسین) کشت داده شد و در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO₂) نگهداری گردید. جهت حفظ شرایط غنی تغذیه ای برای سلول‌ها، محیط سلول‌ها در زمان مورد نیاز مرتب تعویض شدند.

سنجش بررسی سمیت نانوذرات (MTT)

سلول‌های سرطانی FaDu به تعداد 1×10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کاشته شدند. نانودارو با غلظت‌های مختلف (رقیق شده با ۶٪ DMSO) شامل ۲۰-۳۰-۴۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به هر چاهک اضافه گردید. همچنین یک ردیف از چاهک‌ها به عنوان گروه کنترل بدون تیمار با نانودارو، هم چنین یک ردیف گروه Sham حاوی ۶٪ DMSO در نظر گرفته شد. پس از طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محتویات داخل چاهک‌ها با محلول ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر MTT (2,5-diphenyltetrazolium bromide) جایگزین گشت. پس از گذشت ۴ ساعت، محلول MTT با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO پیپتاژ گردید و رنگ هر چاهک ارغوانی شد. سپس پلیت‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر الایزا ریدر Biotech و در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش و از طریق فرمول زنده مانی، درصد بقای سلولی محاسبه و در نهایت غلظت LC₅₀ نانودارو (غلظتی از دارو که سبب مرگ سلولی تا میزان ۵۰ درصد می شود) مشخص گردید. درصد بقای سلول از فرمول زیر محاسبه گردید. توضیح اینکه نمونه های کنترل منفی، سلول های سرطانی بدون تیمار با نانوذرات در نظر گرفته شدند:

$100 \times \frac{\text{میانگین جذب نمونه های کنترل منفی}}{\text{میانگین جذب نمونه های تیمار شده}} = \text{درصد بقای سلول}$

آزمون بررسی آپوپتوز با استفاده از روش فلوسایتومتری

تعداد 1×10^5 سلول FaDu در هر چاهک از پلیت ۱۲ خانه کاشته شد. غلظت های کمتر از LC₅₀ نانو دارو ۲۵ و ۳۰ میلی گرم در میلی لیتر به خانه ها اضافه و گروه بدون تیمار نانودارو هم

به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، سلول ها تریپسینه و با محلول PBS شستشو داده شدند. متعاقباً سلول ها به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شده و با محلول Binding buffer 1X به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانیده شدند. نهایتاً در تیوب مخصوص فلوسایتومتری با اضافه نمودن پنج میکرولیتر Annexin V-FITC کونژوگه شده، با ۱۰ میکرولیتر محلول Propidium iodide (PI) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. جذب نور عبوری توسط سلول های نشاندار شده توسط دستگاه فلوسایتومتری مدل BD FACS Calibur 2 Laser 4 color خوانش شد و اطلاعات و نتایج درباره آپوپتوز و نکروز سلولی ثبت گردید.

محاسبات آماری

جهت تحلیل نتایج به دست آمده از آزمون های آماری t-test، ANOVA و Tukey با سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

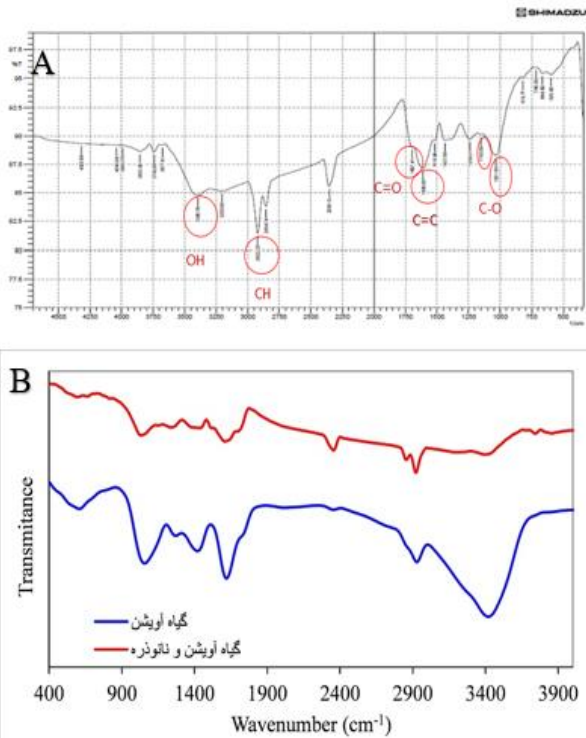
تصویر SEM از توپولوژی و مورفولوژی نانودارو در شکل ۱ نشان داده شده است. توزیع یکنواخت نانوذرات طلا به خوبی مشهود است. اندازه نانوذرات حدود ۱۰-۲۰ نانومتر به دست آمد.

میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

نتایج میکروسکوپ الکترونی عبوری نانودارو در شکل ۲ نشان داده شده است. تصویر TEM نانودارو معلوم می کند که نانوذرات Au به شکل چندضلعی و برخی تقریباً کروی تشکیل شده‌اند.

طیف پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) نانودارو

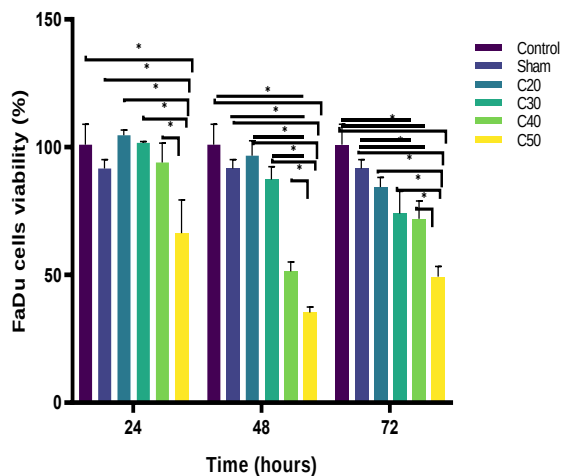
از طیف EDX جهت مشخص کردن عناصر موجود در نانودارو استفاده گردید. همانطور که در نمودار ۱ مشخص است، پیک های مربوط به C، Au، O و N وجود این عناصر را در نانودارو سنتر شده تایید نمود. در نمودار ۱ سیگنال کربن و نیتروژن و اکسیژن، طلا نشان داده شده است. طیف سنجی اشعه ایکس با طول موج پراکنده می تواند اطلاعات کیفی در مورد توزیع عناصر شیمیایی مختلف در ماتریس نانودارو فراهم کند. با نگاه به این نمودار، وجود عناصر C، O، N به خوبی مشاهده گردید که به دلیل وجود ترکیبات باقی مانده از گیاه آویشن بود.



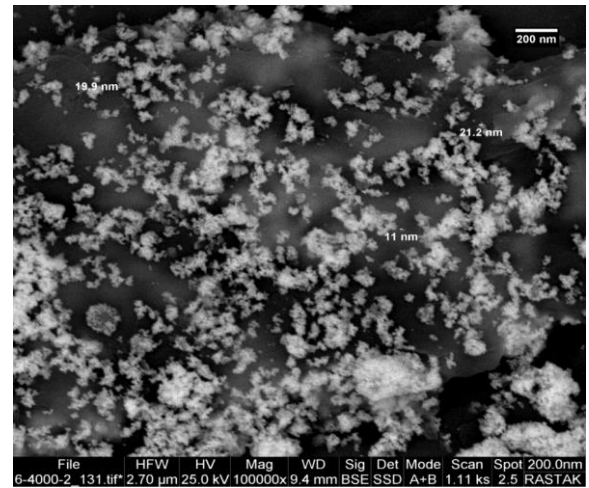
نمودار ۲. نمودار طیف مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR): A نمودار طیف مادون قرمز تبدیل فوریه نانوذره حاصل از تحقیق حاضر و B طیف مادون قرمز تبدیل فوریه گیاه آویشن به همراه نمودار تجمع

طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)

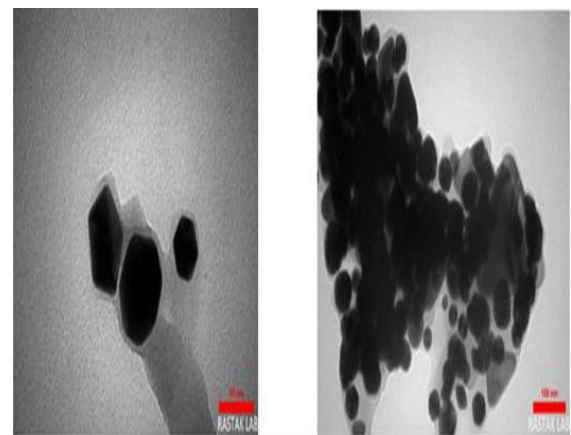
از طیف IR برای نشان دادن گروه های عاملی موجود در نانوذره و شناسایی مولکول های زیستی که نقش احیای کاتیون های طلا را دارند استفاده شد. طیف مادون قرمز گیاه آویشن و نانوذرات سنتز شده برپایه گیاه آویشن احیای کاتیون های فلز طلا را به نانوذرات طلا به خوبی نشان می دهد.



نمودار ۳. نتایج سنجش MTT بر روی رده سلولی FaDu اثر غلظت های مختلف نانوذره در مقایسه با گروه کنترل و sham بر زنده مانی سلول های سرطانی FaDu ($P < 0.05$)

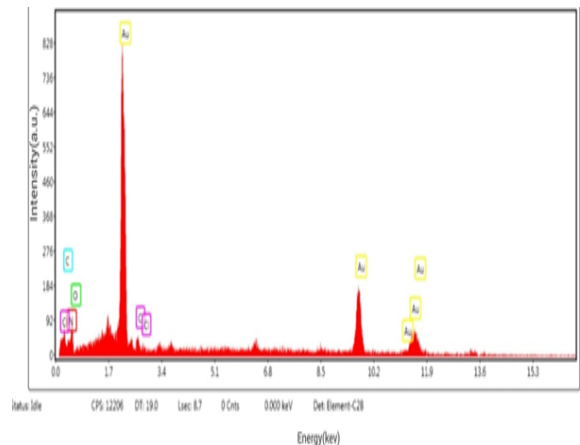


شکل ۱. طیف میکروسکوپ الکترونی SEM بدست آمده از نانوذره



شکل ۲. طیف میکروسکوپ الکترونی TEM نانوذره. در شکل نانوذرات Au عمدتاً به شکل چندضلعی و بعضاً به شکل کروی تشکیل شده اند.

در آنالیز EDX حضور بیومولکولهای عصاره گیاه و نانوذرات طلا تایید شد. پیک قوی در ۲/۲ KeV و همچنین پیک های ضعیف در ۹/۵ و ۱۱ KeV نشانه حضور نانوذرات طلا و پیک های ظاهر شده در کمتر از ۱ KeV نشانه حضور عناصر اکسیژن، کربن و نیتروژن موجود در عصاره گیاه آویشن است.

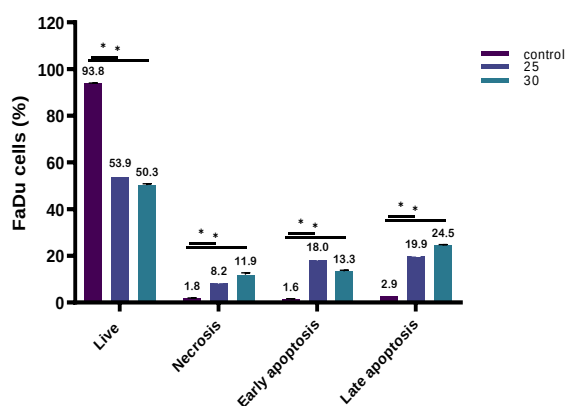


نمودار ۱. طیف EDX نانوذره. پیک های مربوط به Au، C، O و N وجود عناصر مذکور در نانوذره سنتز شده را تایید کرد.

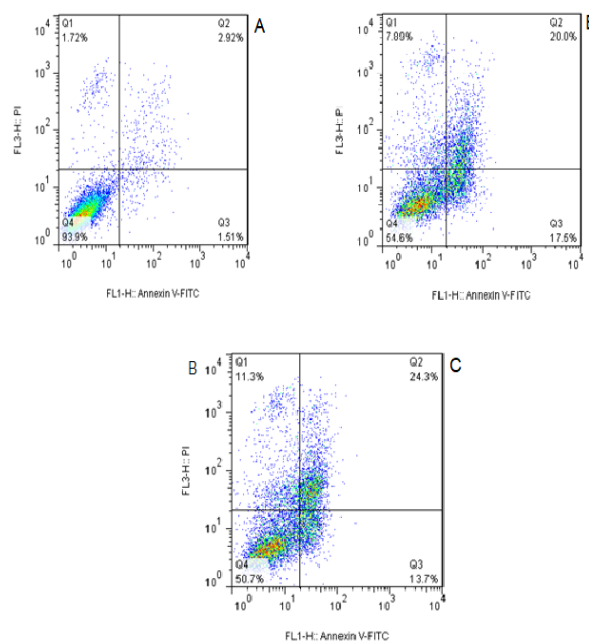
زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه بررسی گردید. میانگین زنده مانی سلول های FaDu در تیمار با غلظت های مختلف نانو دارو در هر یک از زمان های مورد بررسی اختلاف آماری معنی داری را نشان داد ($P < 0.001$). در محاسبه LC_{50} نانوداروی مذکور، غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر پس از ۴۸ ساعت تیمار به دست آمد که قابلیت حیات سلول ها را به ۵۰ درصد کاهش داد. هم چنین در مقایسه دوگانه گروه ها توسط آزمون post hoc، در زمان ۲۴ ساعت غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر، در زمان ۴۸ ساعت غلظت های ۴۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و در زمان ۷۲ ساعت غلظت های ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه با گروه کنترل و sham تفاوت معنی دار نشان دادند (نمودار ۳).

سنجش آپوپتوز با استفاده از روش فلوسایتومتری

نتایج تعیین درصد سلول های آپوپتوتیک در جمعیت سلولی FaDu تیمار شده با نانودارو و قیاس آن با جمعیت سلولی کنترل منفی در روش فلوسایتومتری در شکل ۳ و نمودار ۴ نشان داده شده است. با توجه به غلظت LC_{50} نانو دارو به مقدار ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر در زمان ۴۸ ساعت که باعث از بین رفتن نصف سلول ها گردید، برای ارزیابی آپوپتوز از غلظت های کمتر از LC_{50} یعنی ۲۵ و ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر از نانودارو، پس از تیمار ۴۸ ساعت، استفاده شد. سپس هر یک از مراحل وضعیت سلول های FaDu بر اساس نتایج فلوسایتومتری بین گروه های کنترل، و دو غلظت ۲۵ و ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر نانودارو با یکدیگر توسط t-test مقایسه شدند. اختلاف میانگین همه متغیرها شامل آپوپتوز اولیه، تاخیری و نکروز بین گروه های تیمار با نانو دارو و گروه کنترل از نظر آماری معنی دار بود (نمودار ۴).



نمودار ۴. مقایسه درصد سلول های آپوپتوتیک، نکروتیک و زنده در سلول های FaDu گروه تیمار شده با غلظت های مختلف نانودارو و گروه کنترل تیمار نشده بر اساس داده های فلوسایتومتری ($P < 0.05$)



شکل ۴. نمونه ای از منحنی Quadrant حاصل از روش فلوسایتومتری. A: گروه کنترل سلول های FaDu بدون تیمار نانو دارو، B: گروه تیمار شده با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نانودارو و C: گروه تیمار شده با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانودارو. Q1: Necrosis, Q2: Late Apoptosis, Q3: Early Apoptosis, Q4: Live Cells

باتوجه به نمودار ۲ در نوار طیفی نانوداروی طلای سنتز شده که طیف مادون قرمز آن در کنار طیف مادون قرمز عصاره گیاه آویشن را نشان داده شد، حضور نوار طیفی در محدوده cm^{-1} ۳۳۸۷ مربوط به OH های الکلی و اسیدی موجود در فلاونوئیدها و تانن ها، ترکیبات فنولی در عصاره گیاه آویشن است. وجود پیک در محدوده cm^{-1} ۲۹۲۲ مربوط به پیوندهای هیبریداسیون sp^3 است. محدوده cm^{-1} ۱۶۹۷ مربوط به پیوند $C=O$ یعنی گروه های کربونیل و محدوده cm^{-1} ۱۵۱۶ مربوط به پیوندهای $C=C$ به دست آمد. محدوده های cm^{-1} ۱۰۳۱ و ۱۱۵۰ مربوط به پیوند استری C-O و محدوده زیر cm^{-1} ۱۰۰۰ وجود فلز طلا اثبات گردید. نتایج نشان می دهد که عصاره گیاه آویشن پتانسیل قدرتمندی در احیای کاتیون های قلز طلا به نانوذرات طلا داشته است و جابجایی فرکانس کششی تمامی گروه های عاملی نشان دهنده کنور دینه شدن هترو اتم های گروه های عاملی عصاره گیاه با اربیتال خالی فلز طلا است.

سنجش MTT و اثر نانو دارو بر زنده مانی سلولی

در این آزمون اثر نانوداروی حاصل از عصاره آویشن و نمک طلا با غلظت های ۲۰-۳۰-۴۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی زنده مانی (viability) سلول های FaDu در سه

بحث

درمان‌های مختلفی برای سرطان در طی دهه‌ها، مورد قبول واقع و ارائه شده که هر کدام دارای عوارض جانبی هستند. به طور مثال، داروهای شیمی درمانی فقط سلول‌هایی با تقسیم سریع را هدف قرار داده و بنابراین نه تنها سلول‌های سرطانی را از بین می‌برند، بلکه سلول‌های طبیعی مانند سلول‌های مغز استخوان را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهند. این موضوع سبب شده کماکان محققین به دنبال دستیابی به روش‌های کم عارضه تر و موثرتر در درمان سرطان باشند (۲۰). سرطان حلق یک بیماری نسبتاً نادر اما بدخیم در سر و گردن است (۲۱). علی رغم پیشرفت‌های پزشکی در درمان کلی آنکولوژی سرطان سر و گردن، نتایج درمان سرطان حلق نسبتاً ضعیف باقی مانده و در طول سال‌ها تنها بهبودی جزئی را در بقا نشان داده است (۴). در سال‌های اخیر، تکنولوژی نانو به طور فزاینده‌ای وارد مرحله کاربرد بالینی از جمله حیطة درمان سرطان شده است (۲۰). با پیشرفت‌های اخیر در فناوری نانو و علوم پزشکی، نانوذرات متعددی از عناصر مختلف مانند طلا، نقره، آهن، مس، کبالت، پلاتین و غیره پدید آمده‌اند که به صورت بیولوژیکی یا فیزیکی شیمیایی سنتز می‌شوند (۲۲). در این میان نانوذرات طلا (Au NP) ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی دارند. نانوذرات طلا نسبتاً ایمن، پایدار و تهیه آنها تقریباً آسان است. هم چنین توانایی نفوذ بهتری نسبت به داروهای سنتی داشته و دارای خطر کمتری در درمان و تشخیص بیماری‌ها هستند. بنابراین نانوذرات طلا می‌توانند به شکل گسترده‌ای در پزشکی، به ویژه در درمان سرطان‌ها مورد استفاده قرار گیرند (۲۳). گیاهان زیادی وجود دارند که قابلیت ساخت نانودارو و استفاده در چنین صنعت ارزشمند و گران بهایی را دارند. فرآیند ساده احیای یون‌های فلزی و تولید نانو ذرات، به وسیله متابولیت‌های اولیه و ثانویه-ای مانند آنتی اکسیدان‌ها، فلاونوئیدها، فلاون‌ها، ایزوفلاون‌ها، آنتی سیانیدین‌ها، ایزوتیوسانات‌ها، کاروتنوئیدها و پلی فنول‌ها که در عصاره گیاهی وجود دارند می‌تواند صورت گیرد (۲۴). آویشن، گیاهی چندساله از خانواده نعنا یکی از این گیاهان است که دارای مواد موثره هم چون تیمول، کارواکرول، تانن و فلاونوئید است و این خصوصیات سبب شده تا بتوان در فرآیند ساخت نانودارو از آن استفاده کرد (۲۵). تیمول اثر ضد توموری خود را از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند مهار رشد سلولی (فعالیت ضد تکثیر)، القای آپوپتوز، تولید گونه‌های فعال اکسیژن درون سلولی، دیپلاریزاسیون غشاء میتوکندریایی،

فعالسازی پروتئین‌های میتوکندریایی پروآپوپتیک Bax و تعامل با کاسپاز یا پلی ADP (Adenosine DiPhosphate) ریبوز پلیمرز اعمال می‌کند. ساخت نانودارو در پژوهش حاضر به روش سنتز سبز انجام شد و اثرات کشندگی نانوذرات طلا بر پایه عصاره آویشن توسط ماده موثره آن یعنی تیمول، بر روی رده سلولی FaDu سرطان حلق مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش سنتز سبز هم چنین توسط Hemmati و همکارانش طی تحقیقی در سال ۲۰۱۹ برای ساخت نانودارو از نمک طلا و عصاره آویشن بر روی سلول‌های لوسمی میلوئید حاد استفاده شد (۲۵). به نظر می‌رسد با توجه به جذب گونه‌های شیمیایی مثل سیترات سدیم توسط ذرات، سنتز شیمیایی دارای اثرات نامطلوب زیستی و زیست محیطی است و می‌تواند برای سلامتی انسان مضر واقع شود. از این نظر سنتز سبز روشی مطلوب‌تر است (۲۶). به همین سبب در پروژه حاضر، سنتز سبز نانوذرات طلا ترجیح داده شد. برای اطمینان از درستی انجام سنتز نانودارو از آزمون‌های تاییدی SEM، EDX، TEM و FTIR استفاده شد. به طور معمول، شکل و اندازه نانوذرات ارتباط مستقیمی با سمیت سلولی دارد و معمولاً نانوذرات با اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر سمیت سلولی بیشتری نشان داده-اند (۲۷). خواص مواد نانو ساختاری به شکل و اندازه آنها بستگی دارد. از این رو مطالعه پیرامون شکل، اندازه و آرایش مواد نانو ساختاری از نظر فهم پدیده‌های موجود و در نهایت استفاده از آن‌ها در کاربردهای مختلف ضروری است. در مطالعه حاضر تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ SEM نشان داد که اندازه نانوذرات بین ۱۰ تا ۲۰ نانومتر بود. تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM اندازه و شکل ذرات را با دقت حدود چند نانومتر به دست می‌دهد که به نوع ماده و دستگاه مورد استفاده بستگی دارد. تصویربرداری TEM نیز بر روی نانودارو اندازه متوسط حدود ۱۰ تا ۲۰ نانومتر را تایید کرد. همچنین شکل چندضلعی و برخی تقریباً کروی نانوذره سنتز شده به خوبی نشان داده شد. در مطالعه Hemmati و همکارانش، نانوذرات طلا عمدتاً به شکل چندضلعی و بعضاً به شکل کروی با اندازه بین ۱۰ تا ۳۰ نانومتر گزارش گردید (۲۵). هم چنین با استفاده از روش EDX عناصر موجود در نانوذرات تحقیق ما مشخص شد که شامل Au، C، O، N بود و سنتز موفق AuNP‌ها بدین ترتیب تأیید شد. وجود عناصر دیگر مانند C، O و N به دلیل وجود ترکیبات باقی مانده از گیاه آویشن است. لازم به ذکر است که به دلیل ویژگی Sureface Plasmon Resonance، نانوذرات فلزی طلا یک پیک جذب نوری قوی در حدود ۲/۲ keV را

نشان دادند. در پروژه Hemmati و همکارانش این پیک جذب نوری از نانوذرات طلای احیا شده در طیف EDX در ۵/۵ Kev مشاهده شد (۲۵). این اختلاف می‌تواند ناشی از نوع ماده احیا کننده و سنتز سبز نمک طلا در تحقیق حاضر باشد. در مطالعه وشمگیری و همکارانش در سال ۲۰۲۲، طیف طلا را در ناحیه حدود ۲ kev به دست آوردند که مشابه تحقیق حاضر بود (۲۸).

از روش FTIR جهت شناسایی مولکول‌های فعال زیستی مسئول در احیای یون‌های طلا استفاده شد. مقایسه نتایج طیف‌های FTIR گیاه آویشن با طیف‌های پس از واکنش عصاره گیاه آویشن با یون‌های طلا، مقداری جا به جایی در محل و ارتفاع پیک‌ها در طیف نانوداروی سنتز شده را نشان داد که گروه‌های عاملی مذکور ممکن است مسئول احیای نمک $\text{AuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ و پوشش دهی نانوذرات طلا AuNP باشند. کشش و خمش ارتعاشی قله‌ها ممکن است به ترکیباتی مانند فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و پروتئین‌های محلول در عصاره گیاه آویشن نسبت داده شود که می‌توانند مسئول تثبیت نانوذرات طلا باشند. جا به جایی در محل پیک از مقدار cm^{-1} ۳۳۸۷^۱ می‌تواند مربوط به شکسته شدن پیوند هیدروژنی و ایفای نقش مستقیم هیدروژن در احیای یون‌های طلا باشد.

در تحقیق حاضر، از سنجش MTT برای بررسی میزان سمیت دارو بر روی سلول‌های سرطانی استفاده شد. به کمک این آزمون غلظت مناسب دارو برای اثرگذاری روی سلول‌های سرطانی بدست می‌آید. بر اساس نتایج این آزمون می‌توان LC_{50} را محاسبه نمود که حداقل غلظت دارو است باشد که موجب کشندگی ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی تحت درمان با نانودارو می‌شود. برای رقیق و حل شدن نانودارو و تاثیر روی سلول‌های FaDu از آب (نتایج نمایش داده نشده است) و DMSO استفاده شد. نانوداروی حل شده در DMSO، اثرات کشندگی مطلوب تری را بر روی رده سلولی FaDu مورد تحقیق نشان دادند. پس از انجام آزمون‌های متعدد MTT با نانوذرات حل شده در آب، در غلظت‌های مختلف هیچ کدام باعث القای مرگ در سلول‌های سرطانی نشدند، ولیکن نانوداروی حل شده در DMSO به سرعت تاثیر گذار بودند. عصاره خشک شده حاصل از گیاه آویشن نیز، در غلظت‌های مختلف بر روی سلول‌های سرطانی تاثیر داده شده که به تنهایی هیچ گونه اثر کشندگی نداشته است، بنابراین ترکیب Sham در مطالعه حاضر ترکیب محیط کشت و غلظتی از DMSO بود که در محلول رقیق شده نانوذرات حل شده در آن وجود داشت. در تحقیق Hemmati و همکارانش نیز

نانوذرات حل شده با DMSO ۵٪ برای تیمار سلول‌های بدخیم استفاده گردید که تاثیر گذار بود (۲۵).

نتایج آزمون تحلیل واریانس یکطرفه حاصل از داده‌های سنجش MTT، اختلاف آماری معنی‌داری بر زنده مانگی سلول‌های بدخیم حلق FaDu در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار نانوداروی حاصل از عصاره آویشن و نمک طلا با غلظت‌های ۲۰-۳۰-۴۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر نشان داد. در واقع پس از گذشت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار با نانودارو مذکور، درصد زنده مانگی سلول‌های FaDu به طور معنی‌داری کاهش یافت و این کاهش حیات سلولی وابسته به غلظت و زمان بود. میزان LC_{50} پس از ۴۸ ساعت تیمار نانودارو عصاره آویشن و نمک طلا با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. با توجه به جستجوهای ما در منابع در دسترس، مطالعه‌ای در رابطه با اثر نانوذره طلا بر روی سلول‌های FaDu یافت نشد و تنها مطالعه درباره اثر نانوذره تیتانیوم دی اکسید بر روی سلول‌های FaDu بود که نتایج این بررسی حاکی از آن بود که این نانوذره در سرکوب تکثیر سلولی موثر واقع شده است (۲۹). با توجه به این که در رابطه با سلول FaDu مطالعات محدودی صورت گرفته امکان مقایسه زیادی در مورد این سلول نمی‌توان ارائه داد و در واقع یکی از نوآوری‌های این پروژه را نیز شامل می‌شود. Khorasani و همکارانش طی تحقیقی اثرات سمیت سلولی نانودارو نقره با پوشش عصاره برگ آویشن شیرازی را بر سلول‌های سرطانی کبد رده HepG2 بررسی کردند (۳۰). نتایج سنجش MTT مطالعه آنها موید این مطلب بود که نانوذرات نقره قادرند به صورت وابسته به غلظت و زمان منجر به کاهش میزان بقای سلول‌های سرطانی کبد شوند. غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذره نقره مذکور پس از ۲۴ ساعت تیمار و غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر آن بعد از ۴۸ ساعت تیمار منجر به مرگ ۵۰ درصد از سلول‌های رده HepG2 کبدی شدند (۳۰). در مطالعه دیگری توسط مطیع و همکارانش در سال ۱۴۰۰ اثر نانوفلورید کلسیم روی سلول‌های MDA-MB-231 سرطان پستان بررسی شد و اثرات آنالیز ۵۰ درصد زنده مانگی در طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۴/۸، ۱/۲ و ۱۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد (۳۱). داده‌های منتج از پژوهش حاضر که نشان دهنده اثرات سیتوتوکسیک نانوداروی طلا بر پایه عصاره آویشن روی سلول‌های سرطانی حلق بود، با نتایج حاصل از مطالعات فوق تقریباً همسو است.

روش فلوسایتومتری در مطالعه حاضر جهت تعیین درصد سلول‌های آپوپتوتیک سرطانی به کار رفت. مقادیر غلظت‌هایی

بدخیم پستان تحت تیمار با نانوذره نقره سنتز شده بر پایه *Thymus Vulgaris* آپوپتوز تاخیری و اولیه نشان دادند (۳۲). نتایج حاصل از مطالعات فوق با داده‌های تحقیق حاضر در القا و رخداد آپوپتوز توسط نانوذره طلا سنتز شده بر پایه گیاه آویشن بر روی رده سرطان حلق سازگاری دارد.

با عنایت به محدودیت‌های موجود در مطالعه حاضر، امکان بررسی اثر نانوداروی مذکور بر سلول‌های طبیعی همتراز فراهم نشد. هم چنین در سطح مولکولی و ژنی مسیرها و مکانیسم‌های دخیل در فرآیند آپوپتوز مورد ارزیابی قرار نگرفت که پیشنهاد می‌شود مطالعات آتی بر اساس این موارد طراحی و انجام پذیرد.

بر اساس نتایج به دست آمده پژوهش حاضر سنتز سبز نمک طلا با استفاده از عصاره گیاه آویشن، اثر کشندگی قابل توجهی بر زنده مانی سلول‌های سرطانی حلق، رده FaDu دارد و منجر به مرگ سلولی و القای آپوپتوز در این سلول‌ها شد. بنابراین شاید بتوان از این نانودارو به عنوان یکی از درمان‌های کمکی سرطان حلق استفاده کرد که البته نیازمند مطالعات بیشتر و دقیق‌تر مکانیسم مولکولی و اثرات بالینی در این زمینه است.

کمتر از غلظت LC_{50} نانودارو پس از تیمار ۴۸ ساعت برای انجام آزمایش در نظر گرفته شد تا روند مرگ و میر در سلول‌ها بهتر مشاهده گردد. بر اساس نتایج فلوسایتومتری، وضعیت آپوپتوز در سلول‌های FaDu با استفاده از غلظت‌های ۲۵ و ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانودارو بدین ترتیب گزارش شد که میزان آپوپتوز تاخیری و اولیه و هم چنین نکروز نسبت به گروه کنترل از نظر آماری به صورت معنی‌داری بیشتر بود. تیمار سلول‌های FaDu با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر، مجموع میانگین آپوپتوز تاخیری و اولیه ۳۷/۹٪ نشان داد، در حالی که درصد نکروز در این غلظت ۷/۸٪ بود. در غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر، مجموع میانگین آپوپتوز تاخیری و اولیه ۳۸٪ و درصد نکروز در این غلظت ۱۱/۳٪ گزارش شد. مجموع آپوپتوز در گروه کنترل ۴/۴۳٪ بود و میزان نکروز در این گروه ۱/۷۲٪ مشاهده شد. نتایج فلوسایتومتری مطالعه Khorasani و همکارانش نشان داد که القای آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره صورت گرفته و در حدود ۴۴ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوز تاخیری و اولیه شدند (۳۰). بررسی فلوسایتومتری مطالعه Heidari و همکارانش نیز بر این مطلب تاکید داشت که ۸۷/۴٪ سلول‌های رده T47D

REFERENCES

- Hassanpour SH, Dehghani M. Review of cancer from perspective of molecular. J Cancer Res Pract 2017;4:127-9.
- Meulemans J, Delaere P, Vander Poorten V. Primary treatment of T1-T2 hypopharyngeal cancer: changing paradigms. Adv Otorhinolaryngol 2019;83:54-65.
- Eckel HE, Bradley PJ. Natural history of treated and untreated hypopharyngeal cancer. Adv Otorhinolaryngol 2019;83:27-34.
- Garneau JC, Bakst RL, Miles BA. Hypopharyngeal cancer: a state of the art review. Oral Oncol 2018;86:244-50.
- Jahangirian H, Kalantari K, Izadiyan Z, Rafiee-Moghaddam R, Shameli K, Webster TJ. A review of small molecules and drug delivery applications using gold and iron nanoparticles. Int J Nanomed 2019;14:1633.
- Lu B, Atala A. Small Molecules, eds. Controlling Cell Fate and Function. In Situ Tissue Regeneration. New York: Elsevier; 2016. p. 87-110.
- Hosseini H, Fatehi F, Mousavi Fard S, Qaderi A. Gene expression analysis of thymol and carvacrol biosynthesis pathway in *Thymus vulgaris* under salinity stress. MGJ 2018;13(3):18-409. [In Persian]
- Alipourfard F, Roozbahani Sh. Cytotoxic effect of extract leaves of *T. kotschyianus* Boiss. & Hohen on Human Lung Cell. Experimental Animal Biology. 2015;4:1-6. [In Persian]
- Mohammadigholami A. Study of antifungal properties and chemical composition of essential oil of *Thymus kotschyianus* Boiss. & Hohen. Iranian Journal of plant Physiology and Biochemistry 2016; 1:52-62. [In Persian]
- Chauhan KR, Le TC, Chintakunta PK, Lakshman DK. Phyto-fungicides: Structure activity relationships of the thymol derivatives against *Rhizoctonia solani*. Journal of Agricultural Chemistry and Environment 2017;6:175-85.
- Li Y, Wen J-m, Du C-j, Hu S-m, Chen J-x, Zhang S-g, et al. Thymol inhibits bladder cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 2017;491:530-6.
- Kowalczyk A, Przychocka M, Sopata S, Bodalska A, Fecka I. Thymol and Thyme Essential Oil - New Insights into Selected Therapeutic Applications. Molecules 2020;25:4125.
- Elahi N, Kamali M, Baghersad MH. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. Talanta. 2018;184:537-56.

14. Haume K, Rosa S, Grellet S, Śmiałek MA, Butterworth KT, Solov'yov AV, et al. Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review. *Cancer Nanotechnol* 2016;7:8.
15. Elia P, Zach R, Hazan S, Kolusheva S, Porat Ze, Zeiri Y. Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. *Int J Nanomed* 2014;9:4007.
16. Sargazi S, Laraib U, Er S, Rahdar A, Hassanisaadi M, Zafar MN, et al. Application of green gold nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Nanomaterials* 2022;12:1102.
17. Kubatka P, Uramova S, Kello M, Kajo K, Samec M, Jasek K, et al. Anticancer activities of *Thymus vulgaris* L. in experimental breast carcinoma in vivo and in vitro. *Int J Mol Sci* 2019;20:1749.
18. Niksic H, Becic F, Koric E, Gusic I, Omeragic E, Muratovic S, et al. Cytotoxicity screening of *Thymus vulgaris* L. essential oil in brine shrimp nauplii and cancer cell lines. *Sci Rep* 2021;11:13178.
19. Ebrahimipour M, Akhlaghi M, Hemati M, Ghazanfary S, Shahriary S, Ghalekohneh SJ, et al. In vitro evaluation and comparison of anticancer, antimicrobial, and antifungal properties of thyme niosomes containing essential oil. *Nanomed J* 2022;9.
20. Karamati K, Abdullahi M, Asghari Bagh Khairati A, Abdullahi M, Shabanniai Galesh Kalami D. The effect of combined administration of thyme plant extract (*Thymus vulgaris*) and flunixin meglumine (Flunixin meglumine) on visceral pain in mice: an experimental study. *JAP* 2017;8:45-52. [In Persian]
21. Arends CR, Petersen JF, van der Noort V, Timmermans AJ, Leemans CR, de Bree R, et al. Optimizing survival predictions of hypopharynx cancer: development of a clinical prediction model. *Laryngoscope* 2020;130:2166-72.
22. Singh P, Pandit S, Mokkapati V, Garg A, Ravikumar V, Mijakovic I. Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. *Int J Mol Sci* 2018;19:1979.
23. Peng J, Liang X. Progress in research on gold nanoparticles in cancer management. *Medicine (Baltimore)* 2019;98:e15311.
24. Zadeh Salari N, karimi maleh H, Asadi M. Biosynthesis of gold nanoparticles by extract of aerial organs of Cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)* 2019;32:280-91. [In Persian]
25. Hemmati S, Joshani Z, Zangeneh A, Zangeneh MM. Green synthesis and chemical characterization of *Thymus vulgaris* leaf aqueous extract conjugated gold nanoparticles for the treatment of acute myeloid leukemia in comparison to doxorubicin in a leukemic mouse model. *Applied Organometallic Chemistry* 2020;34:e5267.
26. Razmi A, Nikkhah M, Bagheri A, Malekzadeh Shafaroudi S, Shams bakhsh M. Green synthesis of spherical gold nanoparticles using leek plant extract. *Modarres Journal of Biotechnology* 2017;8:60-70. [In Persian]
27. Molaei S, Mirzaei A, Aliasgari E. Investigating the antimicrobial and anticancer effects of silver nanoparticles made using *Artemisia scoparia* plant extract against lung cancer cell line (A459). *Feyz* 2017. 22: 5. 487-496. [In Persian]
28. Voshmgiri H, Atabi F, Entezari M, Hekmati M. Gold nanoparticles based on fennel extract: biosynthesis and properties. *Medical Sciences Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch* 2021; 31. [In Persian]
29. Trang N, Dong V, Yoo H. Cellular Effects of Ultraviolet-Radiated Reduced-Titanium Dioxide Nanoparticles on Human Hypopharyngeal Adenocarcinoma Cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2021;21:3656-61.
30. Khorasani N, Baharara J, Iranbakhsh A, Ramezani T. Apoptotic effects of silver nanoparticles coated with *Zataria multiflora* leaves extract on HepG2 cell line. *Feyz* 2016;19:457-67. [In Persian]
31. Motie Arani H, Atabi F, Hesami Tackallou S, Zali H, Shahani M. Synthesis and determination of apoptotic effect of calcium nanofluoride on breast cancer cells. *Medical Sciences Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch* 2021; 31
32. Heidari Z, Salehzadeh A, Shandiz SAS, Tajdoost S. Anti-cancer and anti-oxidant properties of ethanolic leaf extract of *Thymus vulgaris* and its bio-functionalized silver nanoparticles. *3 Biotech* 2018;8:177.