

مقایسه سمیت نانو ذرات نقره تجاری و نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی بر روی رده‌های سلولی سرطانی معده (AGS) و فیبروبلاست ریه (MRC-5)

چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۲۹ آنالیز: ۱۳۹۳/۱۲/۰۵

محمدعلی رشمه‌زاد^۱

الهه علی عسگری^{۱*}، فرزانه تفویضی^۲

سیدعطا اله سادات شانندیز^۳

امیر میرزایی^۴

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شرق،

دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه

آزاد اسلامی، پرند، ایران.

۳- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۴- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد

تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، جاده خاوران، شهرک

قیام‌دشت، انتهای خیابان شهید باهنر، دانشگاه آزاد

اسلامی واحد تهران شرق.

تلفن: ۰۲۱-۳۳۵۹۴۹۵۰

E-mail: e.asgari@gmail.com

زمینه و هدف: امروزه، علی‌رغم کاربردهای بسیار وسیع نانومواد، اطلاعات محدودی در زمینه اثرات آنها بر سلامت انسان وجود دارد. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی مقایسه‌ای اثرات نانوذرات نقره تجاری و نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی بر روی رده‌های سلولی سرطان معده AGS و نرمال MRC-5 می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی از تیر تا دی ماه سال ۱۳۹۳ در دانشگاه آزاد واحد تهران شرق به انجام رسید. ابتدا، به منظور سنتز نانوذرات نقره زیستی، از عصاره برگ گیاه اکالیپتوس استفاده شد. ریخت‌شناسی نانوذرات نقره زیستی با استفاده از تفرق دینامیکی نوری و میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت، اثرات سمیت سلولی نانوذرات تجاری و زیستی با روش رنگ سنجی MTT طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دو رده سلولی سرطانی AGS و رده نرمال MRC-5 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: تیمار رده سلولی AGS با نانوذرات سنتز شده به روش تجاری و زیستی در مدت ۷۲ ساعت به ترتیب سبب کاهش بقای سلول‌ها به میزان $7/47 \pm 0/002$ و $3/65 \pm 0/01$ ($P=0/003$) و $P=0/002$ درصد شد. همچنین تیمار رده سلولی MRC-5 با نانوذرات نقره سنتز شده به روش تجاری و زیستی در همین مدت سبب کاهش بقای سلول‌ها به میزان $10/27 \pm 0/19$ ($P=0/001$) و $9/16 \pm 1/53$ ($P=0/002$) درصد شد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه برای اولین بار از عصاره گیاه اکالیپتوس جهت سنتز نانوذره نقره استفاده شد و نتایج نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی، اثرات مهاری بیشتری نسبت به نانوذرات تجاری بر روی سلول‌های سرطانی از خود نشان می‌دهند.

کلمات کلیدی: مطالعه مقایسه‌ای، سمیت سلولی، نقره، نانوذرات، سرطان معده.

مقدمه

مبارزه با سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد.^۱ با وجود تلاش‌های فراوان در زمینه پیشگیری و درمان سرطان، این بیماری رشد فزاینده‌ای داشته و همچنان یک عامل کشنده‌ی جهانی محسوب می‌شود. به طوری که انتظار می‌رود شیوع آن در سال ۲۰۲۰ به عدد ۱۷ میلیون مورد در سال برسد.^۲ مطالعات نشان می‌دهد که غیرفعال شدن ژن‌های سرکوب کننده تومور (Tumor suppressor genes) و فعال شدن انکوژن‌ها (Oncogenes) بر اثر تغییرات ژنتیکی و

سرطان، اولین علت مرگ در کشورهای توسعه یافته و دومین علت مرگ در کشورهای در حال توسعه به شمار می‌رود. تنوع و گستردگی شیوع سرطان در طول سال‌های گذشته موجب تکامل روش‌های متنوع درمانی شده است که بسته به نوع، میزان پیشرفت، وسعت بیماری و وضعیت بیمار، ترکیبی از روش‌های مختلف جهت

در بسیاری از مطالعات مشخص شده است. نانوذرات نقره با اختلال در انتقال پیام سلولی، باعث ایجاد اختلال در شبکه ارتباطی سلولی می‌شود.^{۱۱،۱۲} همچنین، نانوذرات نقره در آسیب به DNA و در افزایش بیان مولکول پروتئینی کاسپاز ۳ و به راه انداختن مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی (آپوپتوز) نقش دارند و بنابراین منجر به میانجی‌گری و تکثیر سیگنال‌های مرگ می‌شوند. این امر در درمان سرطان بسیار حائز اهمیت است.^{۱۲}

بنابراین با توجه به کاربردهای نقره طی سالیان اخیر، می‌تواند اثرات چشمگیری را در سطح نانو تکنولوژی ایفا نماید. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی مقایسه‌ای اثرات سمیت نانوذرات تجاری و نانوذرات سنتز شده به روش زیستی بر روی رده‌های سلولی سرطانی معده AGS cell line و فیرو بلاست ریه MRC-5 cell line بود.

روش بررسی

این مطالعه بنیادی-کاربردی از تیر تا دی ماه سال ۱۳۹۳ در گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران- شرق به انجام رسید. در این مطالعه، به منظور سنتز نانوذرات نقره زیستی با خلوص بالا از روش رسوب‌گذاری با احیای یون‌های نقره، AgNO₃ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) توسط عصاره برگ گیاه اکالیپتوس انجام گرفت. برای ساخت عصاره گیاهی، مقدار ۵۰ gr از برگ گیاه را به حجم ۵۰۰ ml آب مقطر رسانده و به مدت دو ساعت جوشانده شد. پس از گذشت این مدت، عصاره به‌دست آمده فیلتر شد. نانوذرات نقره با افزودن ۲ ml از حجم عصاره با غلظت ۰/۰۰۱ mmol AgNO₃ تحت شرایط دمایی ۶۰ °C و همزدن سنتز شدند. عصاره گیاهی به دلیل فراوانی ترکیباتی همچون آلدئید، کتون، ترپن و آلفا تریپنئول منجر به احیای نمک نیترات نقره به نانوذرات نقره می‌شوند. در طی فرایند سنتز، یون‌های Ag⁺ در معرض ترکیبات احیا کننده عصاره قرار گرفته و از این طریق کاهش نمک نیترات نقره شروع می‌شود. احیای کامل یون‌های Ag⁺ به نانوذرات نقره با تغییر رنگ محیط و طیف سنجی انجام شد. پس از سپری شدن یک ساعت از زمان واکنش و تغییر رنگ محلول، سه مرتبه شستشوی رسوب با آب مقطر انجام گرفت. تمامی مراحل شستشو با دور ۱۳۰۰۰ rpm Eppendorf 5804R Centrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) به

آبی‌ژنتیکی یکی از مهمترین عوامل شناخته شده برای ایجاد سرطان باشد. سرطان معده (Gastric cancer) یکی از معمول‌ترین بدخیمی‌ها به شمار می‌رود که سالانه باعث مرگ بسیاری از افراد در سرتاسر جهان می‌شود. سرطان معده در مردان پس از سرطان ریه به‌عنوان شایعترین نوع سرطان می‌باشد در حالی که در زنان سرطان پستان شایعترین سرطان به شمار می‌آید.^۳

امروزه درمان‌های رایج سرطان شامل جراحی، اشعه درمانی و شیمی درمانی می‌باشد که اغلب موارد سلول‌های سالم نیز از بین می‌روند که این می‌تواند باعث اثرات سمی و عوارض جانبی در بیمار شود. در سال‌های اخیر، به علت افزایش شیوع مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها و نقص روش‌های شیمی درمانی و رادیوتراپی در فرم‌های پیشرفته سرطان، نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای کنترل سرطان احساس می‌شود.^{۳،۴} هدف‌دار نمودن داروهای ضدسرطانی به‌طوری که فقط روی سلول‌های سرطانی اثرگذار باشند و همچنین استفاده از حداقل غلظت داروها به گونه‌ای که اثرات سمی دارو روی سلول‌های طبیعی کاهش یابد، نیز در این امر ضروری است.^۵ از این‌رو جهت تحویل اختصاصی دارو به بافت سرطانی و کم نمودن عوارض جانبی آن از روش‌های جدید تحویل دارو به بافت با کمک نانوذرات به عنوان حامل می‌توان کمک گرفت. استفاده از نانوذرات با اندازه‌ی ۱۰۰ nm یا کمتر برای رساندن و هدف‌گیری عوامل تشخیصی و دارویی در پروژه‌های پزشکی سرطان بسیار گسترده شده است. به‌تازگی بسیاری از نانوذرات در انتقال دارویی به صورت هدفمند به سلول‌های توموری بدخیم با کاهش سمیت سیستمیک داروهای ضدسرطانی به خدمت گرفته شده‌اند.^{۶،۷}

امروزه نانوذرات نقره (Silver nanoparticles) (AgNPs) به‌عنوان محصولی مهم در نانو تکنولوژی به عنوان کاندیدای جذاب برای رساندن بسیاری از مولکول‌های دارویی کوچک یا بیومولکول‌های بزرگ از قبیل DNA، RNA و پروتئین‌ها به شمار می‌رود.^۸ یون نقره به دلیل خواص آنتی‌بیوتیکی آن به مدت طولانی شناخته شده بود، اما به‌تازگی به دلیل ساخته شدن به صورت نانوذرات استفاده‌ی بیشتری یافته است و این در حالی است که هنوز مکانیزم عمل ضدباکتریایی آن به‌طور کامل درک نشده است.^{۹،۱۰} کشف این خاصیت ذرات نقره باعث شد تا امروزه در زیست‌شناسی و نانو بیوتکنولوژی از اهمیت بالایی برخوردار باشد. همچنین خاصیت ضدسرطانی نانوذرات نقره

روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. این روش یک تست متابولیک رقابتی میتوکندریایی است و بر اساس شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز سلول‌های زنده استوار است.^{۱۳} برای انجام آزمایش، حجم ۱۰۰ µl محیط کشت حاوی تعداد ۱۰۰۰۰ سلول MRC-5 و AGS در هر خانه پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون غلظت‌های مختلف ۳، ۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ µg/ml از نانوذرات نقره تجاری و زیستی طی زمان ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از طی زمان مذکور به هر خانه پلیت ۱۰۰ رنگ MTT (۳،۵،۴- دیمیتیل تیازولیل -۲-، ۲-، ۵- دیفنیل تترازولیوم بروماید) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) با غلظت ۰/۵ mg/ml اضافه شد و به مدت چهار ساعت در انکوباتور ۳۷ °C مجهز به CO₂ انکوبه شد. پس از طی زمان لازم محیط کشت حاوی MTT به دقت خارج شد و به هر خانه پلیت حجم ۱۰۰ µl ایزوپروپانول جهت حل نمودن کریستال‌های فرمازان ارغوانی رنگ اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه الیزا Stat Fax® 3200 Microplate Readers (Awareness Technology, Inc., Palm City, FL, USA) در طول موج ۵۷۰ nm قرائت شد.

نتایج حاصله به صورت میزان بقای سلولی و IC₅₀ (غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰٪ می‌شود) مطابق منحنی غلظت (µg/ml) گزارش شدند.^{۱۴} جهت گرفتن نتیجه بهتر، آزمایش‌های این پژوهش سه بار تکرار انجام گرفت و میزان بقای سلولی بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید.

$$100 \times (\text{جذب نوری کنترل} / \text{جذب نوری تست}) = \text{میزان بقای}$$

سلولی

نتایج براساس میانگین و انحراف از معیار با استفاده از SPSS software version 16 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) و تست آماری One-way ANOVA و Tukey's test بررسی و $P < 0/05$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تایید سنتز نانوذرات نقره به روش زیستی: اندازه و ریخت‌شناسی نانوذرات نقره زیستی از طریق میکروگراف میکروسکوپ الکترونی

مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید.^{۱۱} در نهایت شستشوی انتهایی با اتانول انجام گرفت و محصول در دمای ۷۵ °C طی دو ساعت قرار داده شد. بررسی ریخت‌شناسی و اندازه نانوذرات نقره با استفاده از میکروسکوپی الکترونی روبشی Scanning Electron Microscope (EVO-50 (Carl Zeiss AG, Goettingen, Germany) بررسی شد. ارزیابی اندازه و مورفولوژی نانوذرات پس از پوشش‌دهی با طلا در ولتاژ ۲۵ کیلوولت و تحت فشار خلاء با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (XL30, Philips, Japan) مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور، نانوذرات در مقداری آب حل شده و سوسپانسیون حاصل روی گرید طلا قرار گرفته و نانوذرات حاصل برای انجام تست تاییدی میکروسکوپی روبشی بررسی شد. جهت تعیین اندازه و بار سطحی نانوذرات نقره از دستگاه Zetasizer, 3000 HAS (Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Germany) استفاده شد.^{۱۷} برای آماده‌سازی نانوذرات تجاری، ابتدا نانوذرات (Merck, Germany) خریداری شده و رقیق‌سازی انجام گرفت. محلول حاضر پس از سونیکاسیون برای ارزیابی‌های سمیت سلولی مورد استفاده قرار گرفت.

کشت سلول: AGS, MRC-5 cell lines از بانک سلولی انستیتو پاستور (Pasteur Institute of Iran (IPI), Tehran, Iran) خریداری شد. این سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum (FBS)، ۲ mmol، ۲ gr/l، گلوتامین، ۲ بی‌کربنات، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین در دمای ۳۷ °C در یک اتمسفر مرطوب با غلظت CO₂ ۵٪ کشت داده شدند. به منظور انجام آنالیزهای بعدی، زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰٪ رشد سلولی رسیدند، توسط تریپسین ۰/۰۵٪ از ته فلاسک جدا و در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی حاصل در یک میلی‌لیتر محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در آن با افزودن نسبت مساوی از رنگ تریپان بلو با استفاده از لام نتویار و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از اطمینان از عدم آلودگی، از سلول‌های با درصد زنده بودن بالای ۹۰٪ جهت انجام آزمایش استفاده شد.

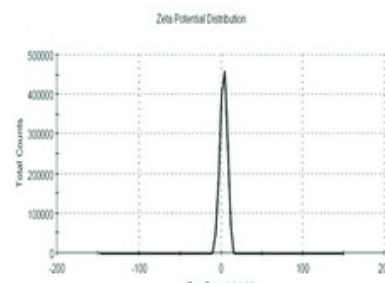
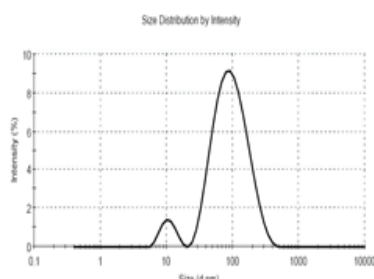
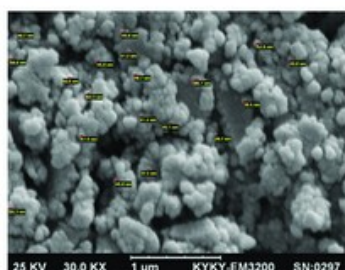
بررسی میزان سمیت سلولی: به منظور بررسی اثر نانوذرات نقره تجاری و زیستی بر روی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و نرمال از

انجام گرفت. محاسبات، با آزمایش نسبت انجام گرفت و در آزمایش اولیه محدوده غلظت اولیه به‌دست آمد. اثر سمیت بر روی سلول‌ها با مقادیر $100-3 \mu\text{g/ml}$ (ppm) از نانوذرات نقره انجام گرفت و درصد زنده بودن سلول‌ها پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از زمان تیمار اندازه‌گیری شد. به‌طوری‌که نتایج سنجش توان زیستی سلول‌ها بر اساس روش رنگ سنجی در جدول‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ آمده است. مقایسه میانگین توانایی زیستی سلول‌های سرطانی پس از گذشت زمان‌های فوق اختلاف معناداری را نشان داد.

همچنین، نتایج نشان داد که اثر کشندگی بر روی رده سلولی سرطانی AGS وابسته به غلظت نانوذرات است و بدین ترتیب مقدار IC_{50} طی ۲۴ ساعت برای نانوذرات تجاری و زیستی به ترتیب مقدار $23/80$ و $9/01 \mu\text{g/ml}$ به‌دست آمد. مقدار IC_{50} برای نانوذرات زیستی در رده‌ی سرطانی AGS در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار به ترتیب مقدار $6/34$ و $3/99 \mu\text{g/ml}$ به‌دست آمد. علاوه بر این مقدار IC_{50} نانوذرات تجاری در رده‌ی سرطانی AGS در زمان‌های

رویشی، با ولتاژ زیر ۲۵ کیلوولت و با بزرگ‌نمایی‌های مختلف، تحت فشار خلاء (۵-۱۰ Torr) مورد ارزیابی قرار گرفت. همانگونه که در شکل ۱ نشان داده شد، اندازه نانوذرات بین ۳۰ تا ۷۰ nm متغیر است. البته در برخی نقاط تجمع و آگلومره شدن رخ داده است که می‌توان با سونیکاسیون پخش نمود و سپس با دستگاه میکروسکوپ بررسی نمود. همچنین، اندازه نانوذرات نقره تجاری در این مطالعه حدود ۲۰ nm بود. اندازه و بار سطحی نانوذرات نقره در شکل ۲ نشان داده شده است. پروفایل توزیع اندازه نانوذرات سنتز شده به روش زیستی نشان می‌دهد که با میانگین حدود $63/7 \text{ nm}$ وجود دارند که با نتایج پیش‌بینی شده در شکل میکروسکوپی الکترونی همخوانی داشت. همچنین بار سطحی با اندازه‌گیری پتانسیل زتا نانوذرات با میانگین حدود $3/63 \text{ mv}$ بود.

تیمار سلول‌ها با نانوذرات نقره: اثرات نانوذرات نقره تجاری و زیستی بر روی سلول سرطانی معده و فیبروبلاست نرمال ریه با اندازه‌گیری حداقل و حداکثر غلظت از صفر تا ۱۰۰ درصد زنده بودن



ج

الف

شکل ۱: اندازه (الف) و بار سطحی (ب) نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی (ج) میکروگراف الکترونی از نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی.

جدول ۱: اثر غلظت‌های متفاوت نانوذرات نقره تجاری بر روی سلول‌های رده سرطانی AGS در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

زمان (ساعت)	$3 \mu\text{g/ml}$	$5 \mu\text{g/ml}$	$12/5 \mu\text{g/ml}$	$25 \mu\text{g/ml}$	$50 \mu\text{g/ml}$	$100 \mu\text{g/ml}$
۲۴	$64/24 \pm 0/02$	$48/92 \pm 0/01$	$45/16 \pm 0/01$	$36/29 \pm 0/007$	$22/31 \pm 0/01$	$15/86 \pm 0/005$
۴۸	$60/75 \pm 0/22$	$40/80 \pm 1/23$	$30/72 \pm 0/02$	$17/17 \pm 2/27$	$8/16 \pm 0/87$	$5/76 \pm 0/01$
۷۲	$61/17 \pm 0/43$	$59/52 \pm 1/89$	$25/95 \pm 0/74$	$15/63 \pm 0/29$	$7/69 \pm 0/02$	$7/47 \pm 0/002$

$P < 0/05$ معنادار در نظر گرفته شد ($P < 0/05$ ، $**P < 0/01$ ، $***P < 0/001$). نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد.

جدول ۲: اثر غلظت‌های متفاوت نانوذرات نقره زیستی بر روی سلول‌های رده سرطانی AGS در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

زمان (ساعت)	۳ µg/ml	۵ µg/ml	۱۲/۵ µg/ml	۲۵ µg/ml	۵۰ µg/ml	۱۰۰ µg/ml
۲۴	***۵۵/۴۲±۰/۰۱	***۳۷/۹۸±۰/۰۱	***۳۳/۷۲±۰/۰۱	***۲۱/۳۱±۰/۰۰۶	***۱۵/۱۱±۰/۰۰۱	***۱۳/۱۷±۰/۰۰۹
۴۸	***۵۴/۶۲±۱/۰۴	***۳۵/۷۲±۰/۰۱	***۲۵/۵۲±۰/۰۹۸	***۱۲/۶۹±۲/۰۰۷	***۷/۷۹±۱/۱۱	***۴/۳۱±۰/۰۴
۷۲	***۴۷/۶۵±۰/۰۳	***۲۰/۹۸±۱/۱۳	***۱۲/۲۲±۰/۰۸	***۷/۲۲±۱/۰۵	***۳/۷۶±۲/۰۱	***۳/۶۵±۰/۰۱

۰/۰۵ < P معنادار در نظر گرفته شد (۰/۰۵ < P، ۰/۰۱ < P، ۰/۰۱ < P). نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد.

جدول ۳: اثر غلظت‌های متفاوت نانوذرات نقره تجاری بر روی سلول‌های رده سلولی نرمال MRC-5 در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

زمان (ساعت)	۳ µg/ml	۵ µg/ml	۱۲/۵ µg/ml	۲۵ µg/ml	۵۰ µg/ml	۱۰۰ µg/ml
۲۴	۹۴/۶۶±۳/۷۹	۸۷/۹۷±۰/۰۱	*۶۳/۵۶±۰/۰۶۳	***۲۵/۸۸±۰/۰۰۷	***۲۲/۲۱±۰/۰۴	***۱۷/۷۶±۰/۰۰۵
۴۸	۹۱/۲۴±۱/۷۸	۸۶/۷۷±۱/۲۱	*۵۱/۰۵±۰/۱۹	***۲۰/۲۱±۲/۲۹	***۱۴/۲۰±۰/۱۱	***۱۰/۲۵±۰/۰۹۸
۷۲	۸۸/۶۴±۰/۰۶	۶۷/۶۸±۲/۱۸	**۳۶/۶±۰/۱۷	***۳۲/۰۱±۱/۱۲	***۱۵/۳۲±۱/۱۴	***۱۰/۲۷±۰/۱۹

۰/۰۵ < P معنادار در نظر گرفته شد (۰/۰۵ < P، ۰/۰۱ < P، ۰/۰۱ < P). نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد.

جدول ۴: اثر غلظت‌های متفاوت نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی بر روی سلول‌های رده سلولی نرمال MRC-5 در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

زمان (ساعت)	۳ µg/ml	۵ µg/ml	۱۲/۵ µg/ml	۲۵ µg/ml	۵۰ µg/ml	۱۰۰ µg/ml
۲۴	۹۲/۶۵±۰/۰۲	۸۵/۷۸±۰/۰۱	*۵۳/۷۲±۰/۰۱	***۲۴/۷۹±۰/۰۰۳	***۱۹/۰۸±۰/۰۱	***۱۵/۷۸±۰/۰۰۱
۴۸	۹۰/۶۸±۰/۱۸	۸۰/۴۸±۱/۰۰	**۴۸/۶۰±۰/۱۲	***۱۷/۹۲±۰/۰۱۴	***۱۶/۷۰±۰/۰۰۵	***۱۲/۷۶±۰/۰۲۳
۷۲	۷۰/۷۳±۱/۸۳	*۶۷/۶۸±۲/۰۰۶	***۴۰/۶۴±۰/۰۱	***۱۴/۸۱±۰/۰۹۲	***۱۲/۳۵±۰/۰۲۹	***۹/۱۶±۱/۰۵۳

۰/۰۵ < P معنادار در نظر گرفته شده است (۰/۰۵ < P، ۰/۰۱ < P، ۰/۰۱ < P). نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد.

بحث

خاصیت ضدباکتریایی و ضدسرطانی و برخی دیگر از خواص نانوذرات نقره از چندین سال پیش مشخص شده و به همین دلیل سنتز این نانوذرات از اهمیت بالایی برخوردار شده است. روش‌های زیست سازگار سنتز نانوذرات نقره، اهمیت استفاده آن را در درمان انسانی بالا می‌برد. دستیابی به دانش سنتز نانو ساختارها با استفاده از روش‌های دوستدار محیط زیست و به اصطلاح روش‌های سبز بسیار مهم می‌باشد. به تازگی روش‌های بیوسنتزی که از میکروارگانیسم‌هایی

۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با نانوذرات به ترتیب مقدار ۹/۲۱ و ۱۲/۸۶ µg/ml به دست آمد. مقدار IC50 در مدت زمان ۲۴ ساعت برای نانوذرات تجاری و زیستی بر روی رده‌ی سلولی نرمال MRC-5 به ترتیب مقدار ۳۸/۷۶ و ۳۵/۴۴ µg/ml محاسبه شد. همچنین مقدار IC50 نانوذرات زیستی در رده‌ی سرطانی MRC-5 در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار به ترتیب مقدار ۳۰/۱۳ و ۲۱/۲۸ µg/ml به دست آمد. علاوه بر این، مقدار IC50 نانوذرات تجاری برای رده سرطانی MRC-5 در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار به ترتیب مقدار ۳۲/۳۵ و ۲۷/۸۷ µg/ml به دست آمد.

مثل باکتری‌ها و قارچ‌ها و یا از عصاره‌های گیاهان استفاده می‌کنند به عنوان روش‌های بسیار ساده و قابل قبول جایگزین سنتز شیمیایی پیچیده برخی از نانوساختارها شده‌اند.^{۲۵و۲۴}

بیوسنتزها مزایای بسیاری مانند هزینه کمتر، سازگاری با محیط زیست و امکان تولید آسان در مقیاس بالا را دارند. در روش‌های بیوسنتز نیازی به استفاده از دما و فشار بالا و همچنین ترکیبات شیمیایی سمی نیست.^{۲۶و۲۵} استفاده از عصاره گیاهان در بیوسنتز نسبت به سایر روش‌های بیوسنتزی مانند استفاده از میکروارگانیسم‌ها بسیار ساده‌تر می‌باشد و در اینجا دیگر نیازی به کشت سلول و مراحل از این قبیل نیست. نانوذرات فلزی از جمله نانوذرات نقره در زمینه‌های مختلف نظیر کاتالیست، نشان دارکردن بیولوژیکی، اپتوالکترونیک استفاده می‌شوند.^{۲۷}

علاوه در روش سنتز زیستی با اتصال برخی از ترکیبات موجود در عصاره گیاه در حین سنتز به سطح نانوذرات تولید شده، فعالیت‌های ذکر شده در مورد این نانوذرات اصلاح شده و بهبود خواهند یافت. به همین دلیل استفاده از گیاهان به عنوان منابع پایدار در دسترس در تهیه نانوذرات زیست سازگار در سال‌های اخیر توجه زیادی از پژوهشگران را به خود معطوف نموده است.^{۲۸و۲۸} برای سنتز نانوذرات نقره در سال‌های اخیر از احیاءکننده‌های شیمیایی مختلفی در حلال‌های متفاوت استفاده شده است.

برای مثال Yang و همکارانش از تری اتانول آمین به عنوان عامل کاهنده برای تولید نانوذرات نقره با ابعاد حدود ۴۰ nm نانومتر استفاده نموده و سپس خاصیت ضد میکروبی نانوذرات تولید شده را بررسی نموده‌اند.^{۱۵}

از انواع بسیار زیادی از احیاءکننده‌های شیمیایی در مقالات و مطالعات مختلف دیگر نیز استفاده شده است. در سال‌های اخیر و با اهمیت یافتن روزافزون بحث محیط زیست، توسعه روش‌های سبز برای سنتز نانوذرات از اهمیت بالایی برخوردار شده است. به این منظور از باکتری‌ها، قارچ‌ها و مواد طبیعی نظیر عصاره‌های گیاهان برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شده است.^{۱۵} تاکنون مطالعات مختلفی از روش بیولوژیکی عصاره‌های گیاهان برای سنتز نانوذرات نقره و اثرات ضدسرطانی آنها به کار رفته است. Kaviya و همکارانش *infundibuliformis* نانو ورقه‌های نقره را با استفاده از عصاره گیاه *Vijayaraghavan* و همکارانش با *Crossandra* تهیه نمودند.^{۲۶}

استفاده از عصاره گیاه *Cissus quadrangularis* نانوذرات نقره را سنتز نموده و خاصیت ضد میکروبی آنها را بررسی کرده‌اند.^{۲۷} تعداد زیادی مقاله در زمینه سنتز نانوذرات نقره و اثرات سلول‌کشی آنها به چاپ رسیده است.^{۲۰}

خاصیت ضدسرطانی نانوذرات نیز در پژوهش‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته شده است. طی مطالعه Sulaiman و همکاران، سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از احیای عصاره برگ گیاهی *Eucalyptus chapmaniana* انجام گرفت و خواص ضد میکروبی و سمیت علیه رده سلولی لوسمی میلوئیتیک (HL-60) انجام گرفت.^{۲۱} در مطالعه آنها سمیت نانوذرات نقره در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بررسی شد که این نانوذرات منجر به کشندگی ۸۵ درصدی این رده سلولی سرطانی شده بودند.^{۲۱} همچنین Inbathamizh و همکارانش، ارزیابی آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی نانوذرات نقره ساخته شده از طریق احیای گیاهی *Morinda pubescens* روی سلول‌های کارسینومای کبد (HepG2) را نشان دادند. نتایج این پژوهش پتانسیل بالای نانوذرات نقره در کاهش ۱۶/۳۹ درصدی زنده ماندن رده سلولی سرطان کبد را نشان داد.^{۲۲}

در مطالعه Saraniya و همکارانش پس از سنتز نانوذرات نقره از طریق احیای گیاهی *Ulva Lactuca* با سایز بین ۲۰ تا ۵۶ nm، اثرات ضدسرطانی آن روی رده‌های سلولی سرطانی کبد HepG-2، پستان MCF-7، کولون HT29 و سلول نرمال Vero را نشان دادند.^{۲۳و۱۹} در مطالعه آنها اثرات سمیت بیشتر با مقدار IC50 برابر ۱۲/۵ µg/ml g/ml طی ۲۴ ساعت تیمار در مورد رده سلولی سرطان کبد نسبت به رده‌های سرطانی دیگر و رده سلولی نرمال مشاهده شد. در مطالعات یاد شده اثرات مقایسه‌ای سمیت نانوذرات نقره تولید شده با روش شیمیایی و زیستی مورد ارزیابی قرار نگرفته بود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که اثر کشندگی سلول‌ها، بستگی به زمان و غلظت نانوذرات دارد. مقدار IC50 محاسبه شده برای نانوذرات تجاری بیشتر از نانوذرات سنتز شده به روش زیستی در رده سلولی سرطانی AGS بوده و همچنین مقدار IC50 برای نانوذرات تجاری و زیستی در رده‌ی سلولی نرمال MRC-5 بیشتر از رده‌ی سلولی سرطانی AGS در طی ۷۲ ساعت محاسبه شد.

نتیجه‌گیری کلی نشان داد که نانوذرات زیستی اثرات مهاری بیشتری نسبت به نانوذرات تجاری بر روی سلول‌های سرطانی از خود

تخریب سلول‌های سرطانی فراهم می‌شود.^{۲۹} یکی دیگر از دلایل، تفاوت‌های ریخت‌شناسی بین غشاء سلول‌های سرطانی و طبیعی از لحاظ تفاوت اندازه منافذ آنها می‌باشد. همچنین اختلاف در شکل، اندازه و بار سطحی نانوذرات نقره عامل دیگر در تفاوت میزان سمیت نانوذرات بین سلول‌های سرطانی و نرمال در این مطالعه بوده است.^{۳۰} بنابراین از نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی می‌توان به‌عنوان راهکاری مناسب در درمان سرطان استفاده نمود.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی با عنوان "بررسی اثر سمیت نانوذرات نقره تجاری و نانوذرات نقره تولید شده با روش زیستی بر روی رده سلولی سرطان معده است" که در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۳ و کد ۲۸۳۳۰۵۰۵۹۳۱۰۲۰ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق اجرا شده است.

نشان می‌دهند و از طرفی اثرات مهارى نانوذرات زیستی و تجاری در رده سلولی سرطانی بیشتر از رده سلولی نرمال بوده است که این پدیده به دلیل اثر مستقیم آنها بر روی سامانه تنفسی سلول در میتوکندری می‌باشد.

به‌طور کلی القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یکی از رویکردهای جذاب در حوزه نانو به شمار می‌رود. مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل فعال‌سازی رویدادهای پروآپتوتیک اندامک میتوکندری در سلول باشد که با آزاد سازی سیتوکروم c از آن آغاز می‌شود. علاوه بر این اثرات نانوذرات نقره در افزایش بیان ژن پروتئاز کاسپاز ۳ در سلول‌های سرطانی و القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در مطالعات مختلف نشان داده شده است.^{۲۲} بنابراین با توجه به میزان فعالیت بالای میتوکندری در فرایند تنفس سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی، بستر مناسبی برای عنصر نقره جهت

References

- Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, MacRobert AJ. Nano-materials in combating cancer: therapeutic applications and developments. *Nanomedicine* 2014;10(1):19-34.
- Vinod P, Siddik U. Nanoparticles in drug delivery and cancer herapy: The giant rats tail. *J Cancer Therapy* 2011;2:325-34.
- Fock KM. Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;40(3):250-60.
- Szymanski MS, Porter RA. Preparation and quality control of silver nanoparticle-antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays. *J Immunol Methods* 2013;387(1-2):262-9.
- Ravindran A, Chandran P, Khan SS. Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;105:342-52.
- Narayanan KB, Sakthivel N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Adv Colloid Interface Sci* 2011;169(2):59-79.
- Iiizumi M, Liu W, Pai SK, Furuta E, Watabe K. Drug development against metastasis-related genes and their pathways: a rationale for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2008;1786(2):87-104.
- Liu JJ, Lin M, Yu JY, Liu B, Bao JK. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Lett* 2011;300(2):105-14.
- Real PJ, Cao Y, Wang R, Nikolovska-Coleska Z, Sanz-Ortiz J, Wang S, et al. Breast cancer cells can evade apoptosis-mediated selective killing by a novel small molecule inhibitor of Bcl-2. *Cancer Res* 2004;64(21):7947-53.
- Jia Z, Sun H, Gu Q. Preparation of Ag nanoparticles with triethanolamine as reducing agent and their antibacterial property. *Colloids Surf A Physico Engin Aspec* 2013;419:174-9.
- Philip D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using Hibiscus rosa. *Physica E* 2010;42(5):1417-24.
- Dubey SP, Lahtinen M, Silanpaa M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. *Proc Biochem* 2010;45(7):1065-71.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1-2):55-63.
- Arechabala B, Coiffard C, Rivalland P, Coiffard LJ, de Roeck-Holtzhauer Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *J Appl Toxicol* 1999;19(3):163-5.
- Yang J, Wang H, Wang Z, Tan X, Song C, Zhang R, et al. Interaction between antitumor drug and silver nanoparticles: combined fluorescence and surface enhanced Raman scattering study. *Chin Opt Lett* 2009;7(10):894-97.
- Khan Z, Hussain JI, Hashmi AA. Shape-directing role of cetyltrimethylammonium bromide in the green synthesis of Ag-nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf extract. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012;95:229-34.
- Inbathamizh L, Mekalai Ponnur T, Jancy Maryc E. In vitro evaluation of antioxidant and anticancer potential of *Morinda pubescens* synthesized silver nanoparticles. *J Pharm Res* 2013;6(1):32-8.
- Rocha A, Azevedo I, Soares R. Progesterone sensitizes breast cancer MCF7 cells to imatinib inhibitory effects. *J Cell Biochem* 2008;103(2):607-14.
- Santhoshkumar T, Rahuman AA, Bagavan A, Marimuthu S, Jayaseelan C, Kirthi AV, et al. Evaluation of stem aqueous extract and synthesized silver nanoparticles using *Cissus quadrangularis* against *Hippobosca maculata* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Exp Parasitol* 2012;132(2):156-65.
- Lukman AI, Gong B, Marjo CE, Roessner U, Harris AT. Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. *J Colloid Interface Sci* 2011;353(2):433-44.
- Sulaiman GM, Mohammed WH, Marzoog TR, Al-Amiery AA, Kadhum AA, Mohamad AB. Green synthesis, antimicrobial and cy-

- tototoxic effects of silver nanoparticles using Eucalyptus chapmaniana leaves extract. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013;3(1):58-63.
22. Koyyati R, Nagati V, Ramchander M, Manthurpafigya P. Biological synthesis of silver nanoparticles using *Raphanus sativus* var. *Longipinnatus* leaf extract and evaluation of their antioxidant and antibacterial activity. *IJMPS* 2013; 3(4): 89-100.
23. Saraniya Devi J, Valentin Bhimba B. Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized by the seaweed *Ulva lactuca* in vitro. *Sci Rep* 2012;1(4).
24. Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2010;6(1):103-9.
25. Philip D. Honey mediated green synthesis of silver nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2010;75(3):1078-81.
26. Kaviya S, Santhanalakshmi J, Viswanathan B. Biosynthesis of silver nano-flakes by *Crossandra infundibuliformis* leaf extract. *Mater Lett* 2012;67(1):64-6.
27. Vijayaraghavan K, Kamala Nalini SP, Udaya Prakash N, Madhankumar D. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Syzygium aromaticum*. *Mater Lett* 2012;75:33-5.
28. Arunachalam R, Dhanasingh S, Kalimuthu B, Uthirappan M, Rose C, Mandal AB. Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Coccinia grandis* leaf extract and its application in the photocatalytic degradation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012;94:226-30.
29. Basavaraja S, Balaji SD, Lagashetty A, Rajasab AH, Venkataraman A. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Mater Res Bull* 2008;43(5):1164-70.
30. Vaidyanathan R, Kalishwaralal K, Gopalram S, Gurunathan S. Nanosilver: The burgeoning therapeutic molecule and its green synthesis. *Biotechnol Adv* 2009;27(6):924-37.

Comparative study on cytotoxicity effect of biological and commercial synthesized nanosilver on human gastric carcinoma and normal lung fibroblast cell lines

Mohammad Ali Rashmezaad
M.Sc.¹
Elahe Ali Asgary Ph.D.^{1*}
Farzaneh Tafvizi Ph.D.²
Seyed Ataollah Sadat Shandiz
Ph.D.³
Amir Mirzaie Ph.D.⁴

1- Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran.

3- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

4- Young Researchers and Elite Club, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

* Corresponding author: East Tehran Branch, Islamic Azad University, Shahid Bahonar St., Ghiamdasht, Khavaran Highway, Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 33594950
E-mail: e.asgari@gmail.com

Abstract

Received: 10 Dec. 2014 Accepted: 19 Jan. 2015 Available online: 24 Feb. 2015

Background: Biosynthesis of nanoparticles has attracted the attention of the scientific community in nanotechnology and biotechnology due to their extensive application in the area of material sciences and medicine. Nowadays, despite a various application of nanomaterial's, there is a little information about their impact on human health. In this study, we investigated the comparative study on cytotoxicity effect of biological and commercial synthesized nanosilver on human gastric carcinoma (AGS) and normal lung fibroblast (MRC-5) cell lines.

Methods: The current experimental study was carried out in Islamic Azad University, East Tehran Branch, from April to November 2014. The biological synthesis of nanosilver was obtained from Eucalyptus plant extract as a reducing agent. Further to more analysis, morphological study on size and shape of developed biological nanosilver was characterized by performing scanning electron microscopy and dynamic light scattering. AGS and MCR-5 cell lines were treated with various concentration of nanosilver for 24, 48 and 72 hours. Finally, the cell viability was evaluated by using MTT assay.

Results: The results show that the nanosilver exerts a dose-dependent inhibitory effect on viability of cells. At 100µg/mL of commercial and biological synthesized nanosilver, the viability of AGS was reduced to 7.47±0.002% (P=0.002) and 3.65±0.01% (P=0.003) after 72 hours, respectively. In addition, the viability of MRC-5 at the same condition was reduced to 10.27±0.19% (P=0.001) and 9.16±1.53% (P=0.002), respectively.

Conclusion: Based on a thorough literature surveys, the present study is the first research about biosynthesis of nanosilver using Eucalyptus plant extract. This eco-friendly and cost effective method can be used for large scale production of silver nanoparticle. In addition, based on the current obtained data, commercial and biological synthesized nanosilver can more inhibitory effect on cancer cells compared to the normal cells. Hence, silver nanoparticles might be used as a new strategy for treating many human cancers. However, further studies are necessary to ascertain their potential as anticancer agents.

Keywords: carcinoma, comparative study, cytotoxicity tests, nanoparticles, silver, stomach.