

اثر ضد سرطانی نانوذرات نقره هشت‌وجهی و کروی شکل روی سلول‌های سرطانی پستان رده MCF-7

چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۰۱ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۱/۲۷ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۳۰ آنلاین: ۱۳۹۶/۰۱/۳۱

زمینه و هدف: علم نوین نانوفناوری یکی از علوم بین رشته‌ای است که کمک شایانی به پیشرفت در درمان سرطان نموده است. این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد سرطانی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره هسته خرما روی سلول‌های سرطانی رده MCF-7 در شرایط درون آزمایشگاهی انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تحلیلی، از فروردین ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵ در دانشگاه‌های علوم پزشکی بسم و کرمان انجام شد. نانوذرات نقره با استفاده از عصاره هسته خرما سنتز و تعیین مشخصات شدند. سپس با روش سنجش ماندگاری (بقای) سلولی، اثر نانوذرات نقره بر سلول‌های سرطانی پستان رده MCF-7 بررسی شد.

یافته‌ها: با افزایش غلظت نانوذرات نقره، میزان ماندگاری سلولی طور معناداری کاهش یافت. IC_{50} نانوذرات نقره $2 \mu\text{g/ml}$ تعیین شد.

نتیجه‌گیری: نانوذرات نقره سنتز شده به روش بیوسنتز سمیت وابسته به غلظت را رده سلولی مورد مطالعه نشان دادند.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، نانوذرات نقره، تصویربرداری میکروسکوپی الکترونی، سمیت، نانوفناوری.

مهرداد خاتمی^{۱-۴*}، سام خرازی^۱
زینب کیشانی فراهانی^۵، حکیم عزیزی^۶
مارکوس آگوستینو لیما نوبره^۷

۱- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بسم، بسم، ایران. ۲- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران. ۳- مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران. ۴- مرکز تحقیقات نانوفناوری در علوم زیستی و پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. ۵- واحد توسعه تحقیقات، بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. ۶- گروه انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران. ۷- گروه فیزیک، دانشکده علوم و فناوری، دانشگاه دولتی سان‌پائولو، سان‌پائولو، برزیل.

* نویسنده مسئول: کرمان، انتهای بلوار ۲۲ بهمن، میدان پژوهش، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات لیشمانیوز تلفن: ۳۴-۳۲۶۰۲۶۱ E-mail: mehrdad7khatami@gmail.com

مقدمه

پیشرفته، بیشتر از این روش‌های رایج نتیجه مثبت حاصل نمی‌گردد و نیاز به پژوهش و یافتن راه‌های جدید برای مبارزه با سرطان به شدت ضروری است.^۱ نانوتکنولوژی تولید کارآمد مواد، دستگاه‌ها و سیستم‌ها با کنترل ماده در مقیاس نانومتر و بهره‌برداری از خواص پدیده‌های جدیدی است که در این مقیاس توسعه یافته‌اند. نانوذرات مجموعه‌های اتمی یا مولکولی با حداقل ابعاد بین ۱-۱۰۰ nm هستند که خواص فیزیکوشیمیایی متفاوتی در مقایسه با توده مواد خود دارند. نانوتکنولوژی کمک شایانی به توسعه و پیشرفت کشف راهکار جدید درمان سرطان نموده است.^{۲-۴}

نانوذرات فلزی مانند نقره و سلنیوم به‌عنوان ماده‌هایی قوی ضد قارچی، ضد میکروبی و گندزدا شناخته شده‌اند.^۵ کاربردها و

سرطان یک بیماری مهلک با مرگ‌ومیر بالاست که درگیری‌های روانی و اقتصادی زیادی به دنبال دارد. نحوه زندگی، یکی از فاکتورهای مهم و موثر در بروز سرطان است.^۱ عوامل محیطی مانند آلاینده‌های محیطی، کارسینوژن‌ها و موتاژن‌ها، عفونت‌های باکتریایی و ویروسی و همچنین حساسیت ژنتیکی از مهمترین فاکتورهای موثر در بروز سرطان است. بسته به نوع، میزان پیشرفت سرطان، وسعت بیماری و وضعیت بیمار، ترکیبی از روش‌های مختلف مانند جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی جهت مبارزه و کنترل سرطان استفاده می‌شود. با وجود احتمال ایجاد عوارض جانبی، در سرطان‌های نوع

غلظت یک میلی‌مولار و زمان‌های متفاوت بررسی شدند.^{۸،۹} اندازه و شکل نانوذرات سنتز شده با استفاده از دستگاه Carl ZIESS ساخت آلمان بررسی شد. سلول‌های سرطانی رده MCF-7 از انیستو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت (حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS)، ۱٪ آنتی‌بیوتیک، ۸۹٪ محیط کشت سلول‌های جانوری DMEM (Dulbecco's modified Eaggel medium) با گلوکز بالا کشت داده شدند و در دمای °C ۳۷ و ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت سلول‌ها در ظروف ۹۶ چاهکی (پلیت الیزا)، در یک طرح تصادفی تکراردار و پس از تعویض محیط کشت، سلول‌های سرطانی با غلظت‌های ۱-۳ μg/ml (ppm) تیمار و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

همان‌گونه که پیش‌تر شرح داده شده است، ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با نانوذرات نقره و عصاره هسته خرما به‌تنهایی، محیط کشت سلول‌ها خارج و محیط جدید اضافه گردید. سپس به‌منظور سنجش بقای سلولی به هر چاهک ماده 2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide یا به‌اصطلاح MTT اضافه و ظرف حاوی سلول‌ها به مدت چهار ساعت انکوبه گردید.

یافته‌ها

در کمتر از ۲۰ دقیقه پس از تیمار عصاره هسته خرما با نیترات نقره تغییر رنگ مخلوط واکنش از زرد روشن به خرمایی رنگ رخ داد، در صورتی‌که در عصاره شاهد تغییر رنگ رخ نداد. پیک جذب مخلوط واکنش که در محدوده ۴۲۸ nm نشان‌دهنده سنتز زیستی نانوذرات نقره بود (شکل ۱).

نانوذرات نقره‌ای با پایداری ۴۰۰ روز در نمونه تیمار شده با غلظت یک میلی‌مولار نیترات نقره مشاهده شد که با نتایج منتشر پیشین مطابقت داشت.^۹ تصویربرداری الکترونی عبوری سنتز نانوذرات نقره کروبی و هشت‌وجهی شکل را با بیشترین فراوانی اندازه در محدوده ۱۵-۲۰ nm و با میانگین اندازه به‌طور تقریبی ۱۷ nm نشان داد (شکل ۲).

نتایج نشان داد نانوذرات نقره دارای اثر مهارکنندگی از رشد وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، سمیت سلولی افزایش می‌یابد. عصاره هسته خرما در مقایسه با شاهد سمیتی روی سلول‌های

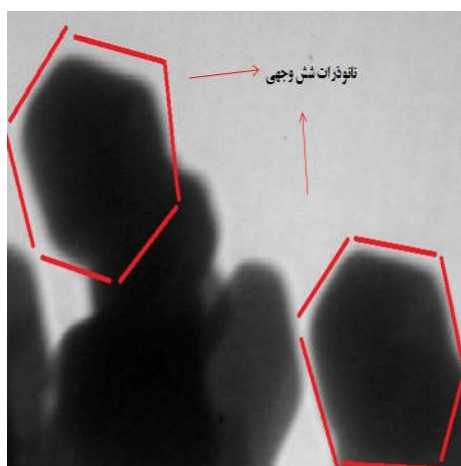
روش‌های متفاوت شیمیایی، فیزیکی و زیستی برای سنتز نانوذرات وجود دارد.^{۱۰-۷} از میان آن‌ها روش‌های زیستی سنتز نانوذرات که به‌معنای استفاده از منابع طبیعی برای سنتز نانوذرات است، با توجه به هزینه‌های بالا پروسه‌های سنتز شیمیایی^{۱۱} و وابستگی به ترکیبات شیمیایی مخرب محیط زیست، بررسی سنتز بیولوژیکی نانوذرات با صرف انرژی و هزینه بسیار کم نسبت به روش شیمیایی و بدون نیاز به حلال‌ها آلی دارای اهمیت است. سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از منابع زیستی مختلف^{۱۲} مورد مطالعه قرار گرفته است. اما یکی از مشکل‌های این نانوذرات سنتز شده پایدار نبودن آن‌ها است که به‌طور میانگین حدود سه ماه پایداری دارند.

در مرحله اول سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره هسته خرما همان‌طور که پیش‌تر شرح داده شده بود، بررسی گردید.^۸ خرما یکی از مهمترین گیاهان تجاری در خاورمیانه است. خرما دارای کاربردهای مهم در علوم پزشکی است.^{۱۳} ویژگی دیگر استفاده از هسته خرما اینکه هسته خرما مصرف خوراکی ندارد و جز ضایعات می‌باشد. با توجه به این‌که ایران دومین کشور تولید کننده خرما در دنیا است. در مرحله دوم اثر ضد سرطانی نانوذرات نقره سنتز شده روی سلول‌های سرطان پستان رده MCF-7 بررسی گردید.

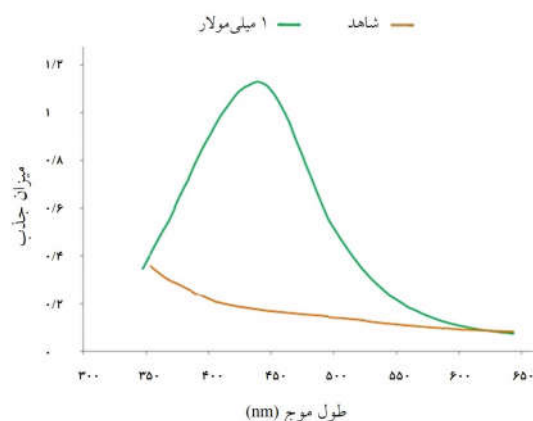
جزئیات روش سنتز، تعیین ویژگی‌های نانوذرات سنتز شده و بررسی اثر سیتوتوکسیتی نانوذرات سنتز شده گزارش شد.

روش بررسی

این مطالعه تحلیلی، از فروردین ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵ در دانشگاه علوم پزشکی بم و کرمان انجام گرفت. هسته‌های خرما از باغستان ارگانیک خرما از شهرستان بم، کرمان، ایران تهیه گردید. ۲۰ g هسته در ظرف ارلن مایر حاوی ۱۰۰ ml آب دیونیزه در حال جوش اضافه گردید و ۱۵ دقیقه جوش خورد، سپس در دمای محیط سرد گردید. در نهایت هسته بیرون ریخته شدند و عصاره باقیمانده همان‌گونه که پیش‌تر شرح داده شد تهیه گردید.^۹ برای سنتز نانوذرات نقره، غلظت نهایی یک میلی‌مولار از استوک نیترات نقره استفاده شد. به‌این‌صورت که ۱۵ ml از عصاره به ۳۰ ml آب دیونیزه و نیترات نقره (مخلوط واکنش) اضافه شد. UV visible اسپکتروفتومتری نانوذرات نقره سنتز در طول موج با محدوده ۳۰۰-۷۰۰ nm در

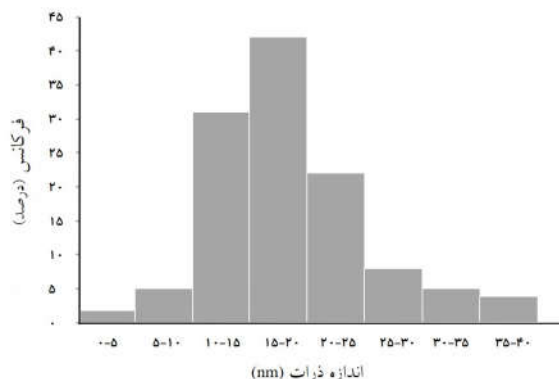


الف



الف) عصاره هسته خرما پیش و (ب) پس از تیمار با غلظت یک میلی مولار نیترات نقره

ب



شکل ۲: عکس‌های الکترونی عبوری نانوذرات نقره سنتز شده کروی و هشت وجهی با الف) عصاره هسته خرما و ب) هیستوگرام

Lalitha و Firdhouse نانوذرات نقره با دامنه اندازه ۱۰-۳۰ nm را با استفاده از *Alternanthera sessilis* سنتز و میزان IC_{50} برای سلول‌های سرطانی رده MCF-7 را $3/04 \mu\text{g/ml}$ محاسبه کردند که به‌طور تقریبی با نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش برابر است.^{۱۵} لازم به یادآوری است این نتایج حاصل پژوهش‌هایی تحت شرایط درون آزمایشگاهی و کنترل شده است، کاربرد عملی نانوذرات در جهان و به‌ویژه در کشور ما، مطالعات دقیق‌تری را برای شبیه‌سازی مدل‌های حیوانی، تأثیر این نانوذرات بر روی سلامت انسان و محیط زیست و به‌دست آوردن راه‌کارهای کاهش ریسک را نیازمند است.

مورد آزمایش نداشت ($P < 0/05$). میزان IC_{50} نانوذرات نقره سنتز شده در این پژوهش $2 \mu\text{g/ml}$ تعیین شد.

بحث

از ویژگی‌های مهم نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره خرما می‌توان به پایداری بسیار زیاد، تأثیر بسیار زیاد و سریع، سازگاری با محیط زیست، مقاومت در برابر حرارت را می‌توان اشاره نمود. نانوذرات نقره سنتز شده قادر به مهار رشد سلول‌های سرطانی مورد آزمایش در غلظت‌های پایین بودند. میزان IC_{50} نانوذرات نقره در این پژوهش $2 \mu\text{g/ml}$ تعیین شد.

در مقاله منتشر شده از Saraniya نانوذرات نقره با اندازه در دامنه ۲۰-۵۶ nm با استفاده از گیاه *Ulva lactuca* سنتز و سمیت سلولی آن‌را روی سلول‌های سرطان پستان رده MCF-7 مطالعه و میزان IC_{50} را $12/5 \mu\text{g/ml}$ محاسبه کردند.^{۱۴} Ramar نیز نانوذرات نقره با اندازه در دامنه ۱۲/۵-۴۱/۹ nm را با استفاده از *Solanum trilobatum* سنتز و سمیت سلولی آن‌را روی سلول‌های سرطان پستان رده MCF-7 مطالعه کردند و میزان IC_{50} را به‌طور تقریبی $30 \mu\text{g/l}$ به‌دست آوردند که بسیار بیشتر از غلظت مهاری نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره هسته خرما است.^۴

محیط زیست، ساده و ارزان سنتز شد. توسعه و پیشرفت در شیمی سبز با جایگزینی روش‌های ایمن و قابل اعتماد به‌جای روش‌های فیزیکی و شیمیایی رایج مخرب محیط زیست از نتایج به‌دست‌آمده حاصل این پژوهش است.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی با عنوان "بررسی اثر ضد سرطانی نانوذرات نقره تولیدشده به‌روش زیستی روی سلول‌های سرطانی پستان رده MCF7" مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بم در سال ۱۳۹۵ و به کد mubam-1355-17 می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی بهداشتی بم اجرا شده است.

پیک جذبی مخلوط واکنش که در محدوده ۴۲۸ nm نشان‌دهنده سنتز زیستی نانوذرات نقره بود. نانوذرات نقره‌ای با پایداری ۴۰۰ روز در نمونه تیمار شده با غلظت یک میلی‌مولار نترات نقره مشاهده شد. نانوذرات نقره دارای اثر مهارکنندگی از رشد وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، سمیت سلولی افزایش می‌یابد (IC50 نانوذرات نقره در این پژوهش ۲ μg/ml). عصاره هسته خرما در مقایسه با شاهد سمیتی روی سلول‌های مورد آزمایش نداشت. عصاره هسته خرما توانایی بالایی در سنتز ساده، سریع نانوذرات نقره با پایداری بسیار بالا و ارزان را داشت. نانوذرات نقره به‌طور عمده کروی‌شکل با اندازه متوسط و تقریباً همگن حدود ۱۷ nm با روشی کاملاً سبز و دوستدار

References

1. Wu S, Powers S, Zhu W, Hannun YA. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature* 2016;529(7584):43-47.
2. Daroud M, Saran M, Kazemi R, Khorsand A, Amiri MS. Nanoceria: Gum mediated synthesis and in vitro viability assay. *Ceramics Int* 2014;40(2):2863-8.
3. Tietze R, Zaloga J, Unterweger H, Lyer S, Friedrich RP, Janko C, et al. Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;468(3):463-70.
4. Ramar M, Manikandan B, Marimuthu PN, Raman T, Mahalingam A, Subramanian P, et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Solanum trilobatum* fruits extract and its antibacterial, cytotoxic activity against human breast cancer cell line MCF 7. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2015;140:223-8.
5. Khatami M1, Pourseyedi S2. *Phoenix dactylifera* (date palm) pit aqueous extract mediated novel route for synthesis high stable silver nanoparticles with high antifungal and antibacterial activity. *IET Nanobiotechnol* 2015;9(4):184-90.
6. Mahmoudvand H, Fasihi Harandi M, Shakibaie M, Aflatoonian MR, ZiaAli N, Makki MS, et al. Scolicidal effects of biogenic selenium nanoparticles against protoscolices of hydatid cysts. *Int J Surg* 2014;12(5):399-403.
7. Song K, Lee S, Park T, Lee B. Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. *Korean J Chem Eng* 2009;26(1):153-5.
8. Abedi G, Sotoudeh A, Soleymani M, Shafiee A, Mortazavi P, Aflatoonian MR. A collagen-poly(vinyl alcohol) nanofiber scaffold for cartilage repair. *J Biomater Sci Polym Ed* 2011;22(18):2445-55.
9. Khatami MR, Mehnipor R, Sobhani Poor MH, Salehi Jouzani G. Facile biosynthesis of silver nanoparticles using *descurainia sophia* and evaluation of their antibacterial and antifungal properties. *J Cluster Sci* 2016;27(5):1601-12.
10. Azizi Z, Pourseyedi S, Khatami M, Mohammadi H. *Stachys lavandulifolia* and *Lathyrus* sp. mediated for green synthesis of silver nanoparticles and evaluation its antifungal activity against *dothiorella sarmen-torium*. *J Cluster Sci* 2016;27(5):1613-28.
11. Khatami M, Nejad MS, Salari S, Almani PG. Plant-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Trifolium resupinatum* seed exudate and their antifungal efficacy on *Neofusicoccum parvum* and *Rhizoctonia solani*. *IET Nanobiotechnol* 2016;10(4):237-43.
12. Miri A, Sarani M, Rezazade Bazaz M, Darroudi M. Plant-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Prosopis farcta* extract and its antibacterial properties. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2015;141:287-91.
13. Biglari F, Alkarkhi AFM, Easa AM. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chem* 2008;107(4):1636-41.
14. Devi JS, Bhimba BV. Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized by the seaweed *Ulva lactuca* in vitro. *Sci Rep* 2012;1(4).
15. Firdhouse M, Lalitha P. Apoptotic efficacy of biogenic silver nanoparticles on human breast cancer MCF-7 cell lines. *Prog Biomater* 2015;4(2-4):113-21.

The anti-cancer effect of octagon and spherical silver nanoparticles on MCF-7 breast cancer cell line

Mehrdad Khatami M.D.^{1-4*}
Sam Kharazi Ph.D.¹
Zeinab Kishani Farahani Ph.D.⁵
Hakim Azizi Ph.D.⁶
Marcos Augusto Lima Nobre
Ph.D.⁷

1- Department of Laboratory Sciences, Faculty of Medicine, Bam University of Medical Sciences, Bam, Iran.

2- Research Center for Infectious and Tropical Diseases, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

3- Leishmaniasis Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

4- Nanomedicine and Nanobiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

5- Research and Development Center, Taleghani Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

6- Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.

7- Department of Physics, Faculty of Sciences and Technology, São Paulo State University, São Paulo, Brazil.

* Corresponding author: Leishmaniasis Research Center, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Pazhohesh Sq., End of 22 Bahman Blvd., Kerman, Iran.
Tel: +98 34 32650261
E-mail: mehrdad7khatami@gmail.com

Abstract

Received: 22 Sep. 2016 Revised: 16 Apr. 2017 Accepted: 19 Apr. 2017 Available online: 20 Apr. 2017

Background: The modern science of nanotechnology is an interdisciplinary science that has contributed to advances in cancer treatment. This study was performed to evaluate the therapeutic effects of biosynthesized silver nanoparticles on breast cancer cell of line MCF-7 *in vitro*.

Methods: This analytical study was performed in Kerman and Bam University of Medical Sciences, Bam City, Kerman Province, Iran from March 2015 to March 2016. Silver nanoparticles suspension was synthesized using palm kernel extract. The resulting silver nanoparticles were studied and characterized. The ultraviolet-visible spectroscopy and transmission electron microscopy used for screening of physicochemical properties. The average particle size of the biosynthesized silver nanoparticles was determined by transmission electron microscopy. The properties of different concentrations of synthesized silver nanoparticles (1 to 3 µg/ml) and palm kernel extract (containing the same concentration of the extract was used for the synthesis of silver nanoparticles) against MCF-7 human breast cancer cells were determined by MTT assay. MTT is used to assess cell viability as a function of redox potential. Actively respiring cells convert the water-soluble MTT to an insoluble purple formazan.

Results: The ultraviolet-visible spectroscopy showed strong absorption peak at 429 nm. The X-ray diffraction (XRD) and transmission electron microscopy (TEM) images revealed the formation of silver nanoparticles with spherical and octagon shape and sizes in the range between 1-40 nm, with an average size approximately 17 nm. The anti-cancer effect of silver nanoparticles on cell viability was strongly depends on the concentration of silver nanoparticles and greatly decrease with increasing the concentration of silver nanoparticles. The IC50 amount of silver nanoparticle was 2 µg/ml.

Conclusion: The biosynthesized silver nanoparticles showed a dose-dependent toxicity against MCF-7 human breast cancer cells.

Keywords: breast cancer, nanoparticles, nanotechnology, silver, toxicity, transmission electron microscopy.