

Cytotoxicity effects of green synthesized silver nanoparticles on human colon cancer (HT29) cells

Movagharnia R¹, Baghbani-Arani F^{2*}, Sadat Shandiz SA³

1- Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, I. R. Iran.

2- Department of Genetics and Biotechnology, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, I. R. Iran.

3- Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran.

Received: 2016/12/8 | Accepted: 2017/10/30

Abstract:

Background: Nowadays, investigations on the role of nanoparticles for diagnosis, and treatment of cancers are being increased. This study aimed at examining the cytotoxic effect of green synthesized silver nanoparticles (AgNPs) on human colon cancer (HT29) and normal (HEK293) cells using the *Artemisa tournefortiana* extract.

Materials and Methods: In the current study, the green synthesis of AgNPs was conducted using the *A. tournefortiana* extract. Then, the characterization of fabricated AgNPs was performed by ultraviolet-visible (UV-vis) spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), and transmission electron microscopy (TEM) methods. The HT29 and HEK293 cell lines were treated with different concentrations of synthesized AgNPs for 24 hours and the viability of cells and half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) were calculated by the MTT assay.

Results: The fabricated AgNPs showed the characteristic surface plasmon resonance peak at around 425 nm. The crystallographic shapes from the XRD and TEM tests showed that the AgNPs were mostly spherical in shape, having an average diameter of 22 nm. The MTT results revealed that AgNPs significantly decreased the viability of cells in dose- and time-dependent manner. The IC₅₀ values of nanoparticles for HT29 and HEK293 cell lines, during the 24 hours, were 40.71 and 61.38 µg/mL, respectively.

Conclusion: According to the results of the current study, the green fabricated AgNPs can have a more cytotoxic effect on colon cancer cells compared to the normal cells. Thus, they can be considered as a promising strategy for the treatment of colon cancer.

Keywords: Green synthesis, Silver nanoparticles, MTT, Colon cancer

* Corresponding Author.

Email: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

Tel: 0098 912 602 2786

Fax: 0098 21 367 24767

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2018; Vol. 22, No 1, Pages 31-38

Please cite this article as: Movagharnia R, Baghbani-Arani F, Sadat Shandiz SA. Cytotoxicity effects of green synthesized silver nanoparticles on human colon cancer (HT29) cells. *Feyz* 2018; 22(1): 31-8.

ارزیابی سمیت نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز علیه رده سلولی سرطانی کولون (HT29)

رابعه موقرنیا^۱، فهیمه باغبانی آرائی^{۲*}، سید عطا اله سادات شانندیز^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: امروزه تحقیقات در زمینه نانوذرات برای استفاده تشخیصی و درمان سرطان روبه افزایش است. در این مطالعه سمیت نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گیاه آرتیمیزیا روی رده‌های سلولی سرطان کولون (HT29) و نرمال HEK293 ارزیابی گردید.
مواد و روش‌ها: در این مطالعه سنتز سبز نانوذرات نقره توسط عصاره گیاه آرتیمیزیا تورنفرتیانا انجام گرفت. سپس، نانوذرات نقره با روش‌های طیف‌سنجی مرئی فرابنفش (UV-vis)، آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) بررسی شدند. رده‌های سلولی HEK293 و HT29 با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و میزان زنده‌مانی سلول‌ها و دوز ۵۰ درصد کشندگی (IC₅₀) با روش MTT محاسبه گردید.
نتایج: نانوذرات سنتز شده پیک جذب طیف‌سنجی مرئی فرابنفش را در طول موج ۴۲۵ نانومتر نشان دادند. الگوی پیک‌های حاصل از آزمون XRD و TEM نشان داد که نانوذرات اغلب شکل کرولی داشته و میانگین اندازه آنها ۲۲ نانومتر می‌باشد. نتایج MTT نشان داد که نانوذرات نقره اثر کشندگی وابسته به دوز و زمان داشته و میزان بقای سلول‌ها را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهند. مقدار IC₅₀ طی زمان ۲۴ ساعت به ترتیب غلظت ۴۰/۷۱ و ۶۱/۳۸ میکروگرم در میلی‌لیتر برای سلول‌های HT29 و HEK293 بود.
نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که اثر کشندگی نانوذرات سنتز شده به روش سبز روی سلول‌های سرطانی کولون نسبت به سلول‌های نرمال بیشتر است. بنابراین، استفاده از این نانوذرات می‌تواند در درمان سرطان کولون مورد توجه قرار گیرد.
واژگان کلیدی: سنتز سبز، نانوذرات نقره، MTT، سرطان کولون

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۹۷، صفحات ۳۸-۳۱

مقدمه

این درحالی‌است که در بیشتر موارد سلول‌های سالم نیز دچار مرگ می‌شوند و می‌تواند عوارض جانبی در بیمار به‌همراه داشته باشد. بنابراین نیاز به جستجو در شیوه‌های نوین درمانی برای کنترل سرطان ضروری می‌باشد [۴]. در این میان علم نانوتکنولوژی کمک ارزنده‌ای به پیشرفت در کشف و توسعه راه‌کارهای نوین درمانی سرطان نموده است؛ برای مثال، می‌توان به استفاده از نانوذرات اصلاح شده برای تحویل هدفمند و انتخابی دارو به بافت سرطان اشاره کرد [۵]. نانوذرات فلزی به‌دلیل خواص فیزیکی منحصر به فرد، به‌عنوان کاندیدای جذاب برای رساندن بسیاری از بیومولکول‌های بزرگ و کوچک دارویی به خدمت گرفته شده‌اند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به نانوذرات نقره اشاره کرد. این نانوذرات طی سالیان گذشته به‌دلیل ویژگی‌های مشخصی از قبیل رسانایی مناسب [۶]، خواص ضد میکروبی [۷]، درمان زخم‌ها و التیام سوختگی‌های شدید [۸] به‌عنوان محصولی مهم در نانوتکنولوژی مورد استفاده بوده‌اند [۹، ۱۰]. روش‌های مختلفی از جمله فیزیکی، شیمیایی و زیستی برای سنتز نانوذرات نقره وجود دارد. روش‌های زیست-سازگار سنتز نانوذرات نقره اهمیت کاربرد آن را در درمان‌های انسانی بالا می‌برد. روش‌های زیستی سنتز نانوذرات با استفاده از باکتری‌ها، اکتینومیست‌ها، قارچ‌ها و گیاهان به‌عنوان روش جایگزین بسیار ساده و مقرون به صرفه نسبت به روش‌های شیمیایی

با وجود پیشرفت‌های قابل‌توجه در فناوری‌های پزشکی برای تشخیص و درمان سرطان، این بیماری هنوز به‌عنوان عامل تهدیدکننده مرگ‌ومیر مطرح است [۱]. در این میان، سرطان کولون یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در مردان و زنان به‌شمار می‌رود و سالانه باعث مرگ بسیاری از افراد در جهان می‌شود [۲]. امروزه بسیاری از گزینه‌های درمانی سرطان شامل جراحی، شیمی درمانی، پرتو درمانی و مراقبت تسکینی در دسترس است که بسته به محل و درجه سرطان، ترکیبی از روش‌های مختلف جهت درمان مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳].

^۱ کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
^۲ استادیار، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
^۳ استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
*** نشانی نویسنده مسئول:**
گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا
دوره‌نویس: ۰۲۱۳۶۷۲۴۷۶۷
تلفن: ۰۹۱۲۶۰۲۲۷۸۶
پست الکترونیک: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۸/۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۱۸

اضافه گردید. پس از گذشت ۵ دقیقه از زمان واکنش و کاهش یون‌های Ag^+ به Ag^0 ۳ مرتبه شستشوی رسوب با آب مقطر طی سانتریفیوژ با دور RPM ۱۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت [۲۱]. تغییرات رنگ واکنش بعد از افزودن عصاره به محلول نیترات نقره به صورت عینی مشاهده شد و طیف جذبی نانوذرات نقره با استفاده از روش اسپکتروسکوپی با دستگاه طیف‌سنجی UV-vis (Biotech EPOCH, US) در دامنه طول موج ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر ارزیابی شد. آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD) امکان شناخت نوع ساختار کریستالوگرافی نانوذرات نقره را فراهم می‌کند. در این تحقیق آزمون اشعه ایکس توسط دستگاه PERT Panalitical, X, PRO ساخت کشور هلند با تشعشع لامپ CuK α و زاویه ۲ θ در دامنه ۰ تا ۱۱۰ درجه انجام شد. به منظور بررسی ریخت‌شناسی اندازه نانوذرات نقره سنتز شده، تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی گذاره انجام شد؛ نمونه پودر نانوذرات به مدت ۱۵ دقیقه اولتراسونیک شده و روی گرید دارای فیلم کربنی قرار داده شد. پس از خشک شدن گرید بدون حرارت خشک و در مجاورت هوای اتاق، با استفاده از دستگاه میکروسکوپی الکترونی گذاره (Leo 906) (TEM مدل KV Zeiss)، ساخت کشور آلمان عکس‌برداری شد. در این مطالعه دو رده سلولی سرطانی کولون (HT29) و سلول جنینی کلیه (HEK293) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI₁₆₄₀ (Roswell Park Memorial Institut-) (۱ درصد (ute) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک و ۲ میلی‌مولار ال‌گلوتامین شرکت سیگما در انکوباتور با دمای ۳۷°C و ۵ درصد CO₂ انکوبه گردید. سپس، به منظور بررسی اثرات نانوذرات نقره روی رشد و تکثیر سلول‌ها روش رنگ‌سنجی MTT (۵،۴،۳) - دیمتیل تیازولیل-۲،۲-، ۵- دی‌فنیل تترازولیوم بروماید (سیگما، آلمان) انجام شد. در ابتدا سوسپانسیون سلولی از هر دو رده سلولی سرطانی و نرمال تهیه شد و ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد؛ به گونه‌ای که هر میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی ۱۰۰۰۰ سلول بود. پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان انکوباسیون و اطمینان از چسبندگی سلول‌ها به بستر پلیت، غلظت‌های مختلف ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذرات نقره به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون، ۲۰ میکرولیتر از رنگ MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و ظرف حاوی سلول‌ها به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. سپس، محتوای چاهک‌ها به دقت تخلیه شد و با حجم ۵۰ میکرولیتر دی‌متیل

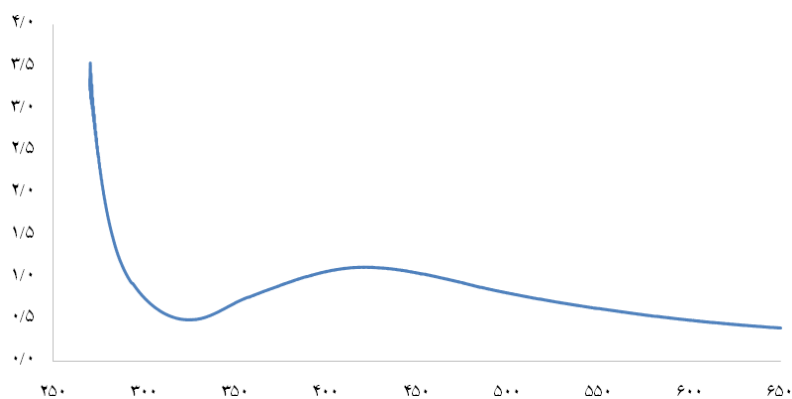
و فیزیکی می‌باشد [۱۵-۱۱]. در این میان، عصاره‌های بسیاری از گیاهان از جمله مریم گلی (*Salvia officinalis*)، ویتکس (*Vitex negundo*) و مرزنجوش (*Origanum vulgare*) [۱۸-۱۶] به عنوان منابعی پایدار، در سنتز نانوذرات نقره مورد استفاده قرار گرفته است [۱۶]. یکی از عصاره‌های گیاهی که برای سنتز نانوذرات نقره مورد توجه بوده، گیاه درمنه (*Artemisia*) است. این گیاه که از خانواده Asteraceae است، بین ۲۰۰ تا ۵۰۰ گونه یا زیرگونه و ۵ زیرجنس را شامل می‌شود [۱۹]. کشور ایران دارای ۳۴ گونه *Artemisia* می‌باشد؛ بیشتر گونه‌ها چندساله بوده و فقط ۱۰ گونه یک یا دوساله هستند. در ایران چند گونه انحصاری نیز وجود دارد که از آن جمله می‌توان *A. mela*-*A. Kermanensis*، *A. tourneforti* و *A. khorasanica nolepis* را نام برد [۱۹]. آرتیمیزیا غنی از موادی است که دارای اثرات گوناگونی از جمله اثر ضد التهاب، ضد تومور، ضد زخم معده، آنتی‌اکسیدان، ضد مالاریا، کاهش‌دهنده سوءهاضمه، ضد تکثیر سلولی و انقباض کیسه صفرا می‌باشد. این جنس بیشتر حاوی ترکیبات تریپونیدی و فلاونوئیدی است و بیش از ۱۶۰ ترکیب فلاونوئیدی از این جنس استخراج شده است. تریپونید یا ایزوتریپونیدها نقش مهمی را در متابولیسم گیاه بازی می‌کنند. تریپونیدها نه تنها بزرگ‌ترین گروه از تولیدات طبیعی را تشکیل می‌دهند (حداقل ۳۰۰۰۰ ترکیب)، که از نظر تنوع ساختاری نیز دارای دسته وسیعی می‌باشند که می‌توانند عامل احیا کننده نمک نقره به‌شمار روند [۲۰]. بنابراین، در تحقیق حاضر سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از اندام‌های هوایی عصاره الکلی گیاهی *آرتیمیزیا تورنفرتیانا* برای اولین بار به عنوان عامل کاهش‌دهنده و یا احیاءکننده از محلول نیترات نقره بررسی گردید. پس از تأیید ساختار کریستالوگرافی و اندازه نانوذرات نقره سنتز شده، اثرات سمیت این نانوذرات روی رده‌های سلولی سرطانی کولون (HT29) و نرمال (HEK293) مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی کاربردی از فروردین تا شهریورماه ۱۳۹۵ انجام گرفت. به منظور تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه، اندام هوایی *آرتیمیزیا تورنفرتیانا* به روش پرکولاسیون با استفاده از حلال اتانول ۸۰ درجه به مدت ۴۸ ساعت تهیه شد و پس از صاف نمودن عصاره حاصل، با استفاده از دستگاه تقطیر در خلأ تا حد خشکی تغلیظ شد. نیترات نقره (AgNPs) استفاده شده جهت سنتز نانوذرات نقره از شرکت مرک آلمان خریداری شد. برای سنتز نانو ذرات نقره ۲ میلی‌لیتر از حجم عصاره گیاهی به غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار نیترات نقره تحت شرایط هم‌زدن و دمای اتاق

نتایج

پس از گذشت ۵ دقیقه، سنتز سبز نانوذرات نقره با کاهش یون‌های Ag^+ به وضوح قابل رویت بود. بعد از تیمار عصاره گیاه درمنه با نترات نقره تغییر رنگ مخلوط واکنش به قهوه‌ای مایل به رنگ قرمز رخ داد، در صورتی که در عصاره به‌عنوان شاهد تغییر رنگ رخ نداد. تغییر رنگ واکنش به‌عنوان یک شاخص ریخت-شناسی جهت تشخیص سنتز نانوذرات نقره می‌باشد که به رزونانس پلاسمون سطحی ناشی از نوسانات جمعی الکترون‌های آزاد القاء به‌وسیله تعامل با میدان الکترومغناطیسی بر می‌گردد. پیک جذبی طیف‌سنجی ماورا بنفش نانوذرات نقره در محدوده ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر گزارش شد. در این واکنش وجود پیک جذبی در طول موج ۴۳۰ نانومتر با دستگاه طیف‌سنجی UV-vis نشان‌دهنده سنتز سبز نانوذرات نقره بود (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱- طیف جذبی UV-vis نانوذرات نقره سنتز شده طی واکنش. همان‌طور که مشخص است طیف ثبت شده در طول موج ۴۲۵ نانومتر برای نانوذرات نقره سنتز شده طی مدت زمان یک ساعت از انجام واکنش تایید شد.

تعیین اندازه نانوذرات نقره سنتز شده از طریق عکس میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) نیز مورد بررسی قرار گرفت (شکل شماره ۴). البته در برخی نقاط تجمع و آگلومره شدن این نانوذرات دیده می‌شود که می‌توان با سونیکاسیون پخش نموده و سپس با دستگاه میکروسکوپ بررسی نمود. به‌منظور بررسی اثرات نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز روی تکثیر سلول‌های سرطانی کولون و نرمال از روش MTT استفاده گردید. اثرات سمیت سلولی با غلظت‌های مختلف ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تیمار گزارش شد. نتایج سنجش توان زیستی سلول‌ها بر اساس روش رنگ‌سنجی MTT در شکل شماره ۵ و جدول شماره ۱ ارائه شده است. مقایسه میانگین توانایی زیستی

سولفوکساید (DMSO) جایگزین گردید. این یک تست رقابتی متابولیکی میتوکندری است که عملکرد آنزیم دهیدروژناز میتو-کندریایی در تجزیه ترازولیوم توسط سلول‌های زنده را نشان می‌دهد [۱۳]. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه انکوباسیون و اطمینان از حل شدن ذرات رنگ، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه قرائت‌گر الیزا قرائت شد. غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می‌شد، به‌عنوان IC_{50} لحاظ شد [۱۴]. درصد بقای سلولی مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$OD \times 100 / OD \text{ (کنترل/نمونه تیمار شده)} = \text{میزان بقای سلولی}$$

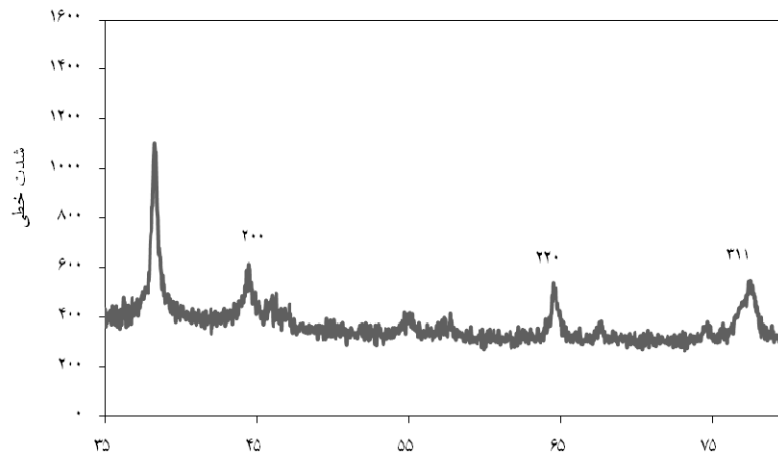
تحلیل آماری این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۲ با آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) انجام شده و در صورت مشاهده اختلاف معنی‌دار جهت آزمون تعقیبی از آزمون Tukey استفاده شد. آزمایش‌های این تحقیق به صورت سه بار تکرار انجام گرفت و حداقل سطح معنی‌دار بودن $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

آنالیز پراش اشعه ایکس تشکیل کریستال‌های نقره را در نمونه تایید نمود. الگوی پیک‌های حاصل از طیف پراش اشعه ایکس در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. پیک‌هایی قوی و مجزا در زوایای ۲ تا ۳۸، ۴۴، ۶۴، ۷۷ درجه دیده می‌شود که به‌ترتیب با سطوح کریستالی ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰ و ۳۱۱ نقره هم‌خوانی دارد. در نتیجه نانوذرات نقره با ساختار مکعبی مراکز سطحی (Face-centered cubic; FCC) در نمونه تایید شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره TEM نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه آرتیمیژیا تورنفرتیانا در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج سنتز سبز نانوذرات نقره نشان داد که اندازه ذرات در محدوده ۱۰ تا ۳۰ نانومتر هستند و غالباً شکل کروی دارند. مطالعه ریخت‌شناسی و

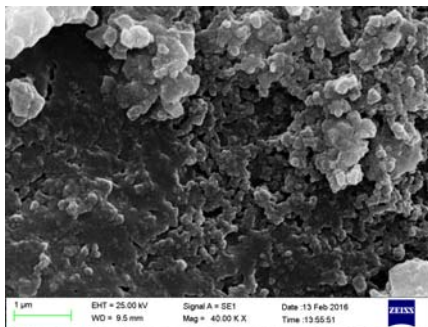
سمیت نانوذره نقره بر سرطان کولون، ...

به ترتیب غلظت ۴۰/۷۱ میکروگرم در میلی لیتر و غلظت ۶۱/۳۸ میکروگرم در میلی لیتر در ۲۴ ساعت منجر به مرگ ۵۰ درصد از سلول های HT29 و HEK293 شده است.

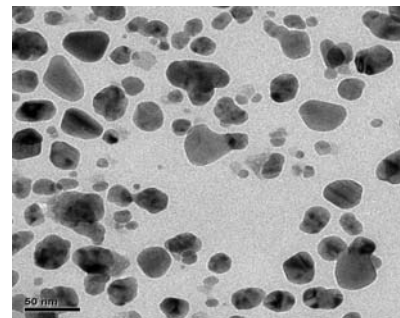
سلول های رده سرطانی و نرمال حاصل از آزمون MTT مهار قوی به صورت وابسته به غلظت نانوذرات را پس از گذشت زمان ۲۴ ساعت نشان داد. بدین ترتیب با تعیین مقدار IC_{50} مشخص شد که



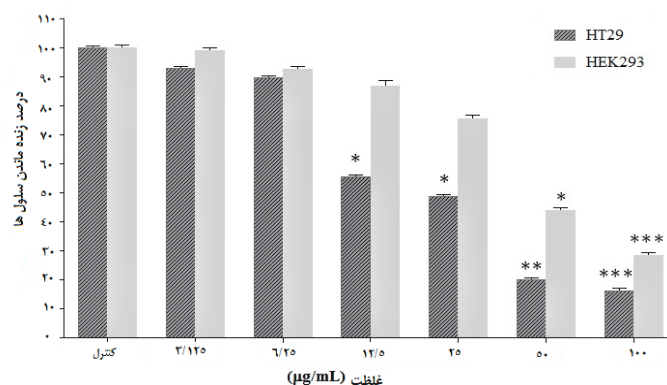
شکل شماره ۲- الگوی پراش اشعه ایکس به دست آمده از نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره الگوی پیک های XRD مربوط به ساختار مکعبی مراکز سطحی (Face-centered cubic; FCC) ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰ و ۳۱۱ در طیف نمونه نقره دیده می شود. زوایای 2θ مربوط به الگوی نقره در ۳۸، ۴۴، ۶۴ و ۷۷ درجه مشاهده شد.



شکل شماره ۴- میکروگراف الکترونی روبشی از نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز



شکل شماره ۳- عکس میکروسکوپی الکترونی گذاره از نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز



شکل شماره ۵- اثر غلظت های متفاوت نانوذرات نقره زیستی روی بقای سلول های رده سرطانی HT29 و نرمال HEK293 با استفاده از آزمایش MTT. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه های کنترل و به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است.

$P < 0.001$:***, $P < 0.01$:**, $P < 0.05$:*

جدول شماره ۱- میانگین توان زیستی رده‌های سلولی با نانوذرات در مدت زمان ۲۴ ساعت با روش رنگ‌سنجی MTT

رده سلولی/غلظت نانوذره	۳/۱۲۵μg/ml	۶/۲۵μg/ml	۱۲/۵μg/ml	۲۵μg/ml	۵۰μg/ml	۱۰۰μg/ml
HT29	۹۳/۸۸±۰/۹۲	۸۹/۷۶±۰/۸۲	*۵۵/۶۸±۰/۷۹	*۴۸/۶۸±۰/۹۲	**۱۹/۹۷±۰/۸۱	***۱۶/۱۰±۱/۰۲
HEK293	۹۸/۹۸±۱/۲۲	۹۲/۶۷±۱/۱۷	۸۶/۸۹±۱/۸۹	۷۵/۶۹±۱/۶۲	*۴۳/۷۲±۰/۹۱	***۲۸/۴۷±۰/۸۹

مقادیر به‌دست آمده به صورت درصد بقاء در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به‌صورت میانگین ± انحراف از معیار گزارش شده و تفاوت میانگین‌ها در سطح

$P < 0/05$ در نظر گرفته شده است. * $P < 0/05$ ، ** $P < 0/01$ ، *** $P < 0/001$

بحث

امروزه مرکز توجه مطالعات سرطان جستجوی عوامل سرطان با ضریب بالاتر و قابلیت پذیرش بیشتر برای بیماران می‌باشد. در این میان انتقالات هدفمند نانوذرات دارویی اختصاصیت بالایی به سلول‌ها داشته و چشم‌انداز درمانی گسترده‌ای با کاهش سمیت از خود نشان داده‌اند [۷،۶]. در این میان، توسعه نانوذرات نقره به‌عنوان عامل ضد سرطان و ضد میکروبی در کانون توجه پژوهشگران قرار گرفته است. با توجه به مشکلات عمده‌ای که در روش‌های شیمیایی و فیزیکی تولید نانوذرات وجود دارد، نیاز به روش‌های آسان در مقیاس بالا، ایمن، مقرون‌به‌صرفه و بدون به‌کارگیری ترکیبات شیمیایی ضروری به‌نظر می‌رسد. در سال‌های اخیر راه‌کاری ساده، سازگار با محیط زیست و مقرون‌به‌صرفه برای سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاهان مطرح شده است. به‌نظر می‌رسد که مولکول‌های زیستی موجود در عصاره‌های گیاهی مانند ترپونوئید، فنل و فلاونوئیدها نقش موثری در احیای یون‌های نقره به شکل نانوذرات نقره بازی می‌کنند [۲۳،۲۲]. احیاءکننده‌های مختلف شیمیایی در حلال‌های متفاوت برای سنتز نانوذرات فلزی طی مطالعات اخیر گزارش شده است. برای مثال در سال ۲۰۱۳ Jia و همکاران از تری‌اتانول آمین به‌عنوان عامل احیاءکننده برای سنتز نانوذرات نقره با قطر حدود ۴۰ نانومتر استفاده نموده‌اند [۱۰]. تاکنون از عصاره‌های مختلف گیاهان برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شده و اثرات بیولوژیکی آنها مورد ارزیابی قرار گرفته است. Ramar و همکاران در سال ۲۰۱۴ با استفاده از عصاره گیاه *Solanum trilobatum* نانوذرات نقره با ابعاد ۱۲/۵ تا ۴۹/۹ نانومتر را سنتز نموده و خاصیت سمیت سلولی آن را روی رده سرطانی پستان MCF-7 بررسی نموده‌اند [۲۴]. همچنین، در پژوهشی دیگر Devi و همکاران سنتز سبز نانوذرات نقره را از طریق عصاره جلبک *Ulva lactuca* نشان دادند. آنها نانوذراتی با ابعاد ۲۰ تا ۵۶ نانومتر را گزارش نمودند و اثرات ضد سرطانی آن روی رده‌های سلولی سرطانی کبد HepG-2، پستان MCF-7، کولون HT29 و سلول نرمال Vero را نشان دادند. در تحقیق آنها اثرات ضد سرطانی بیشتر با میزان IC_{50} برابر ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر طی ۲۴ ساعت تیمار در مورد رده

سلولی سرطان کبد نسبت به دیگر رده‌های سرطانی و رده سلولی نرمال نشان داده شده است [۲۲]. تاکنون مطالعات محدودی در زمینه سنتز سبز نانوذرات نقره با گونه‌های گیاه درمنه (آرتمیزیا) انجام گرفته و مطالعه‌ای در خصوص سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه بومی آرتمیزیا تورنفورتیانا انجام نشده است. در یک مطالعه سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاهی *Artemisia annua* انجام گرفته و اثرات ضد باکتریایی و ضد آنزیم تیروزینازای این نانوذرات مورد ارزیابی قرار گرفته و بیان شده است که این عصاره به‌عنوان عامل احیاءکننده قوی و کم-هزینه برای سنتز نانوذرات نقره می‌باشد [۲۵]. Mata و همکاران اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی عصاره برگ گیاه *Abutilon indicum* را روی رده‌های سلولی سرطان روده بزرگ انسان (COLO 205) و نرمال کلیه (MDCK) مورد ارزیابی قرار داده‌اند. مشاهدات آنها نشان داده که نانوذرات نقره علاوه بر مهار وابسته به غلظت، منجر به تغییرات ریخت‌شناسی مانند تراکم کروماتین‌ها و ایجاد تغییر در غشای سلول‌ها شده و این تغییرات منجر به القای آپوپتوز در رده سرطانی شده است [۲۶]. در سال ۲۰۱۶ صالحی و همکاران نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia marschallina* با ابعاد متوسط حدود ۸ نانومتر سنتز نموده و اثرات سمیت و آپوپتوزی این نانوذرات را روی رده سلولی سرطانی معده (AGS) مطالعه نمودند؛ ایشان بیان نموده‌اند که این نانوذرات اثرات مرگ سلولی آپوپتوتیک بالاتری نسبت به نکرور سلول‌ها دارند [۲۳]. در تحقیق حاضر سنتز سبز نانوذرات نقره از عصاره گیاه بومی آرتمیزیا تورنفورتیانا انجام گرفت که گامی موثر در پیشرفت شیمی سبز به‌منظور سبز نگه داشتن محیط زیست بوده است. این عصاره دارای توانایی بالایی در سنتز سریع، ساده، مقرون‌به‌صرفه و بدون وجود هیچ‌گونه ترکیب شیمیایی بود. نتایج نشان داد که اثر کشندگی سلول‌ها بستگی به زمان و غلظت نانوذرات دارد. اثرات نانوذرات نقره سنتز شده روی مهار تکثیر سلول سرطانی کولون (HT29) و سلول کلیه جنینی انسان (HEK293) با انجام آنالیز سمیت سلولی MTT در طی ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. همچنین در این مطالعه مقدار IC_{50} محاسبه شده برای نانوذرات

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر نانوذرات نقره برای اولین بار با استفاده از گیاه بومی *آرتمیزیا تورنفورتیانا* سنتز شده و اثرات سمی آن روی تکثیر سلول سرطانی کولون (HT29) و سلول نرمال کلیه جنینی انسان (HEK293) با روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد اثر کشندگی نانوذره روی سلول‌ها بستگی به غلظت آن‌ها دارد. همچنین، اثر مهاری نانوذره روی سلول‌های سرطانی نسبت به سلول نرمال بیشتر بود که این ویژگی می‌تواند نانوذره سنتز شده را به‌عنوان گزینه مناسبی در درمان سرطان مطرح کند.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر حاصل نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک میکروبیولوژی (دانشگاه پیشوا واحد ورامین) بوده است که در آزمایشگاه شرکت دانش‌بنیان بیوتکنولوژی جاوید انجام شده است. نویسندگان از کلیه همکاران و پرسنل گرامی آزمایشگاه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

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] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2): 87-108.
- [3] Fock MM. The epidemiology and prevention of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 40(3): 250-60.
- [4] Szymanski MS, Porter RA. Preparation and quality control of silver nanoparticle-antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays. *J Immun Methods* 2013; 387: 262-9.
- [5] Prabhu V, Uzzaman S, Grace V, Guruvayoorappan C. Nanoparticles in drug delivery and cancer therapy: the giant rats tail. *J Cancer Therapy* 2011; 2(3): 325-334.
- [6] Abbai R, Mathiyalagan R, Markus J, Kim YJ, Wang C, Singh P, Ahn S, El-Agmy Farh M, Yang DC, Green synthesis of multifunctional silver and gold nanoparticles from the oriental herbal adaptogen: *Siberian ginseng*. *Int J Nanomed* 2016; 11: 3131-343.
- [7] Wan G, Ruan I, Yin Y, Yang T, Ge M, Cheng X, Effects of silver nanoparticles in combination with antibiotics on the resistant bacteria *Acinetobacter baumannii*. *Int J Nanomedicine* 2016; 11: 3789-800.
- [8] Faraha MA, Alib MA, Chen SM, Li Y, Al-Hemaid FM, Abou-Tarboush FM, et al. Silver nanoparticles synthesized from *Adenium obesum*

نقره در رده سلولی سرطانی کولون کمتر از مقدار محاسبه شده IC_{50} در رده سلولی نرمال بود. این نشان می‌دهد احتمالاً اثرات مهاری بیشتر نانوذرات نقره روی سیستم فسفریلاسیون اکسیداسیون تنفسی میتوکندری سلول است. بنابراین، باتوجه به فعالیت بالای تنفسی میتوکندریال سلول‌های سرطانی نسبت به سلول نرمال، استفاده از این نانوذرات می‌تواند یک روش امیدبخش در درمان سرطان باشد [۲۴]. القاء مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده توسط نانو- مواد یکی از رویکردهای جذاب در حوزه نانوبیوتکنولوژی و در درمان سرطان به‌شمار می‌رود [۷، ۲۴]. نانوذرات نقره سبب تحریک آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوزول شده و در افزایش بیان مولکول پروتئینی کاسپاز و القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) نقش دارند [۱۱]. همچنین، تفاوت در ریخت- شناسی بین غشاء سلول‌های سرطانی و طبیعی از لحاظ اندازه منافذ آنها می‌تواند عامل دیگری در تفاوت قابل‌ملاحظه در میزان سمیت نانوذرات بین سلول‌های سرطانی و نرمال در این مطالعه باشد [۲۸، ۲۷].

- leaf extract induced DNA damage, apoptosis and autophagy via generation of reactive oxygen species. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016; 141: 158-69.
- [9] Huang L, Dai T, Xuan Y, Tegos GP, Hamblin MR. Synergistic combination of chitosan acetate with nanoparticle silver as a topical antimicrobial: efficacy against bacterial burn infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(7): 3432-8.
- [10] Jia Z, Sun H, Gu Q. Preparation of Ag nanoparticles with triethanolamine as reducing agent and their antibacterial property. *Colloid Surf A Physicochem Eng Asp* 2013; 419, 174-9.
- [11] Philip D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa*. *Physica E Low-Dimens Syst Nanostruct*. 2010; 42 (5): 1417-24.
- [12] Ashrafi SJ, Rastegar MF, jafarpour B. Kumar SA. Use of plant pathogenic fungi *Fusarium moniliforme* for biosynthesis of silver nano particles with emphasis to time. *Eur Cell Mater* 2010; 20(3): 1-8.
- [13] Khatami M, Pourseyedi S. *Phoenix dactylifera* (date palm) pit aqueous extract mediated novel route for synthesis high stable AgNPs with high antifungal and antibacterial activity, *IET Nanobiotechnol* 2015; 9(4): 184-190
- [14] Mishra A, Sardar M. Alpha-amylase mediated synthesis of silver nanoparticles. *Sci Adv Mater* 2012; 4(1):143-146
- [15] Jing Y, Wang H, Wang Z, Tan X, Song C, Zhang R, Li J, Cui Y. Interaction between antitumor drug and silvernanoparticles:combined fluorescence

- and surface enhanced Raman scattering study. *Chin Opt Lett* 2009; 7(10): 894-7.
- [16] Sankar R, Karthik A, Prabu A, Karthik S, Shivashangari KS, Ravikumar V. *Origanum vulgare* mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013; 108: 80-4.
- [17] Daoud S, Alqahtani MAM, Alkhalifah D H M, Elobeid M, Mohammed A. Biosynthesis of silver nanoparticles using *salvia officinalis* extract and assessment of their antibacterial activity. *Int J Curr Res* 2015; 7: 21548-52.
- [18] Prabhu D, Arulvasu C, Babu G, Manikandan R, Srinivasan P. Biologically synthesized green silver nanoparticles from leaf extract of *Vitex negundo* L. induce growth-inhibitory effect on human colon cancer cell line HCT15. *Process Biochem* 2013; 48 (2): 317-24.
- [19] Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. The Artemisia L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. *Molecules* 2012; 17 (3): 2542-66.
- [20] Vijaykumar PPN, Pammi SVN, Kollu P, Satyanarayana KVV, Shameem U. Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using *Boerhaavia diffusa* Plant Extract and Their Antibacterial Activity. *Ind Crops Prod* 2014;52: 562-566.
- [21] Singh H, Du J, Yi TH, Green and rapid synthesis of silver nanoparticles using *Borago officinalis* leaf extract: anticancer and antibacterial activities. *Artificial cells Nanomed Biotechnol* 2016; 45(7): 1310-6.
- [22] Devi JS, Bhimba BV. Anticancer Activity of Silver Nanoparticles Synthesized by the Seaweed *Ulva lactuca* in vitro. *Scientific Reports* 2012; 1(4): 242-50.
- [23] Salehi S, Shandiz SAS, Ghanbar F, Darvish MR, Shafiee Ardestani M, Mirzaie A, et al. Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Artemisia marschalliana* Sprengel aerial parts extract and assessment of their antioxidant, anticancer, and antibacterial properties. *Int J Nanomedicine* 2016; (11): 1835-46.
- [24] 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* 2014; 140: 223-8.
- [25] Basavegowda N, Idhayadhulla A, Lee YR, Preparation of Au and Ag nanoparticles using *Artemisia annua* and their in vitro antibacterial and tyrosinase inhibitory activities. *Mater Sci Eng C mater Biol Appl* 2014, 43: 58-64.
- [26] Mata R, Nakkala JR, Sadras SR. Biogenic silver nanoparticles from *Abutilon indicum*: Their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects in vitro. *Colloid Surface B Biointerfaces* 2015; 128: 276-86.
- [27] Basavaraja S, Balaji SD, Lagashetty A, Rajasabd AH, Venkataraman A. extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Mater Res Bull* 2008; 43, 1164-70.
- [28] Vaidyanathan R, Kalishwaralal K, Gopalram S, Gurunathan S. Nanosilver-the burgeoning therapeutic molecule and its green synthesis. *Biotechnol Adv* 2009; 27(6): 924-37.