مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۶، شماره ۶، شهریور ۱۳۹۸ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات ضدمیکروبی و سمیت سلولی نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه خلنگ بر روی رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) و بررسی اثرات آپوپتوتیک آن با استفاده از روش فلوسیتومتری

فریبا قدیمی آسیابر: کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

امیر میرزایی: استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران (* نویسنده مسئول) a.mirzaie@riau.ac.ir

جواد آراسته: استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: اخیرا نانوذرات فلزی بخصوص نانوذرات نقره به دلیل داشتن خواص بیولوژیکی توجه محققان را بخود جلب کرده است. هدف از این مطالعه سنتز بیولوژیک نانوذره نقره با استفاده از عصاره گیاه خلنگ (*Erica carnea*)، بررسی اثرات ضدباکتریایی و سمیت سلولی آن روی رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ابتدا نانوذرات نقره با افزودن عصاره گیاه خلنگ به نیترات نقره سنتز گردید. به دنبال آن خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن توسط روش‌های اسپکتروفتومتری جذبی فرابنفش (UV/Vis)، میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) تعیین گردید. به دنبال آن اثرات ضدمیکروبی، سمیت سلولی و آپوپتوتیک آن به ترتیب با استفاده از روش های MIC، MTT و فلوسیتومتری با استفاده از کیت Annexin-V/PI انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج جذب UV/Vis نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده دارای ماکزیمم جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر بود. هم چنین نتایج SEM و TEM نشان داد که نانوذره نقره سنتز شده کروی شکل و دارای اندازه میانگین ۱۰/۶۷ نانومتر بود. نتایج MIC نشان داد که نانوذرات نقره بر روی باکتری‌های گرم منفی تاثیر معناداری دارد. نتایج سمیت سلولی در غلظت‌های ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نشان داد که میزان ۵۰ درصد کشندگی آن ۷/۱۴ میکروگرم در میلی لیتر می‌باشد. نتایج آپوپتوزی نشان داد که نانوذره نقره میزان ۶۰٪ آپوپتوز را در رده MCF-7 القا می‌کند.

نتیجه‌گیری: با در نظر گرفتن نتایج این مطالعه می توان نتیجه گرفت که نانوذره نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه خلنگ دارای اثرات ضدباکتریایی و ضد سرطانی معناداری می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک کاندید دارویی در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه آزاد اسلامی

کلیدواژه‌ها

گیاه خلنگ،

نانوذره نقره،

سمیت سلولی،

اثرات ضدمیکروبی،

آپوپتوز

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۲/۸

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۵/۱۳

شیوه استناد به این مقاله:

Ghadimi Asiabar F, Mirzaie A, Arasteh J. Antibacterial and cytotoxicity of synthesized silver nanoparticles using *Erica carnea* extract on breast cancer cell line (MCF-7) and analysis of its apoptotic effects. Razi J Med Sci. 2019;26(6):84-94.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-02-10]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.10.0]

Razi Journal of Medical Sciences.2019;26(6):84-94. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Antibacterial and cytotoxicity of synthesized silver nanoparticles using *Erica carnea* extract on breast cancer cell line (MCF-7) and analysis of its apoptotic effects

Fariba Ghadimi Asiabar, MSc, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Amir Mirzaie, Assistant Professor, Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran (*Corresponding author) a.mirzaie@riau.ac.ir,
Javad Arasteh, Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Recently, metal nanoparticles, especially silver nanoparticles (AgNPs), have attracted the attention of researchers due to their biological properties. The aim of this study was to investigate the biological synthesis of AgNPs using *Erica carnea* extract and its antibacterial, and cytotoxic effects on breast cancer cell line (MCF-7).
Methods: In this experimental study, the AgNPs were synthesized by adding *E. carnea* extract to silver nitrate. Subsequently, its physical and chemical properties were determined by ultraviolet spectrophotometry (UV/Vis), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Subsequently, its antimicrobial, cytotoxic and apoptotic effects were investigate using minimum inhibitory concentration (MIC), MTT and flow cytometry (Annexin-V/PI kit) methods, respectively.
Results: The UV/Vis adsorption results showed that the synthesized AgNPs had a maximum absorbance at 420 nm. In addition, SEM and TEM results indicated that the AgNPs was spherical and had an average size of 10.67 nm. The results of MIC show that the AgNPs had significant effect on Gram negative bacteria. The results of cell cytotoxicity at 125.3 to 100 µg/ml concentrations showed that the IC50 value was 7.14 microgram/mL. Apoptotic results showed that AgNPs induced 60% apoptosis in the MCF-7 cell line.
Conclusion: Based on results of this study, it can be concluded that the AgNPs synthesized by the *E. carnea* extract had significant antibacterial and anticancer effects and can be used as a drug candidate for the future.

Conflicts of interest: None
Funding: Islamic Azad University

Keywords
Antibacterial,
Apoptosis, Cytotoxicity,
Erica carnea,
Silver nanoparticle

Received: 28/04/2019
Accepted: 04/08/2019

Cite this article as:
Ghadimi Asiabar F, Mirzaie A, Arasteh J. Antibacterial and cytotoxicity of synthesized silver nanoparticles using *Erica carnea* extract on breast cancer cell line (MCF-7) and analysis of its apoptotic effects. Razi J Med Sci. 2019;26(6):84-94.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-02-10]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.10.0]

مقدمه

نانوبیوتکنولوژی یکی از شاخه های علم نانوتکنولوژی می باشد، بطوری که در حوزه نانوتکنولوژی فرایندهای سنتز نانوذرات در اندازه و ساختار شیمیایی مناسب حایز اهمیت است (۱-۲). در میان نانوذرات، نانوذرات نقره یکی از نانوذرات رایج مورد استفاده در علم نانوتکنولوژی بوده که دارای کاربردهای فراوان در بیوسنسورها، علوم دارویی و پزشکی می باشد، بطوریکه می‌تواند به عنوان عوامل ضدباکتریایی و ضدسرطانی مورد استفاده قرار گیرند (۳-۴). نانوذرات نقره دارای سمیت سلولی علیه طیف وسیعی از سلول ها می باشند که از طریق استرس اکسیداتیو، تخریب DNA و میتوکندری و القای آپوپتوز سمیت سلولی ایجاد می‌کند (۵). یکی از کاربردهای نانوذرات نقره خاصیت ضدسرطانی آنها می باشد (۶). یکی از سرطان های پرشیوع دنیا، سرطان پستان می باشد بطوریکه نرخ بقا در سرطان پستان در کشورهای توسعه‌یافته بالا است به گونه‌ای که ۸۰٪ و ۹۰٪ از افراد در انگلستان و آمریکا حداقل ۵ سال زنده هستند اما نرخ بقا در کشورهای در حال توسعه پایین‌تر است (۷). در سراسر دنیا، سرطان پستان مهم‌ترین نوع سرطان در زنان است، بطوریکه ۲۵٪ از تمام موارد سرطان را به خود اختصاص می‌دهد (۸). در سال ۲۰۱۲، بر پایه مطالعات محققان در ایران سالانه هشت هزار نفر به سرطان پستان مبتلا می‌شوند و شیوع ابتلا به سرطان پستان در بین زنان ایرانی حدود ۳۰ تا ۳۵ مورد در ۱۰۰ هزار نفر است (۹). امروزه درمان های رایج سرطان شامل جراحی، اشعه درمانی و شیمی درمانی می باشد که اغلب موارد سلو ل های سالم نیز از بین می روند که این می تواند باعث اثرات سمی و عوارض جانبی در بیمار شود (۱۰). در سال های اخیر، به علت افزایش شیوع مرگ و میر ناشی از سرطان ها و نقص روش‌های شیمی درمانی و رادیوتراپی در فرم های پیشرفته سرطان، نیاز به یافتن شیوه های جدید برای کنترل سرطان احساس می شود که یکی از این روش ها استفاده از نانوذرات بخصوص نانوذرات نقره است (۱۱-۱۲). نانوذرات نقره با اختلال در انتقال پیام سلولی، باعث ایجاد اختلال در شبکه ارتباطی سلولی می شود و در آسیب به DNA و در افزایش بیان مولکول پروتئینی آپوپتوز و به راه انداختن مرگ برنامه ریزی شده سلولی آپوپتوز نقش دارند، بنابراین منجر تکثیر سیگنال‌های مرگ می‌شوند که این امر در درمان سرطان بسیار حائز اهمیت است (۱۳). هم چنین گزارشات متعددی نشان داده است که نانوذرات نقره دارای اثرات ضدمیکروبی می باشند، بطوری که با تغییر در مورفولوژی غشای باکتریایی باعث افزایش نفوذپذیری نانوذرات نقره می شود و نفوذ غیرقابل کنترل نانوذرات نقره به درون سلول اتفاق می افتد و منجر به مرگ سلول می گردد (۱۳).

بطور کلی روش های مختلف فیزیکی و شیمیایی مانند احیای شیمیایی، احیای فوتوشیمیایی، اشعه دهی فرابنفش و میکروویو و لیزر جهت سنتز نانوذرات نقره وجود دارد (۱۴). روش های شیمیایی به دلیل ایجاد ترکیبات شیمیایی سمی دارای کارایی مناسبی نیستند و در مقایسه با سایر روش ها، روش های زیستی دوستدار محیط زیست برای سنتز نانوذرات نقره ترجیح داده می شوند بطوریکه این روش ها تک مرحله ای بوده و به ترکیبات احیا و پایدار کننده نیاز ندارد. در میان روش های زیستی، گیاهان گزینه ای مناسب جهت سنتز نانوذرات نقره می باشند بطوریکه میزان احیای یون نقره بسیار بالا می باشد. روش های سنتز توسط گیاهان کم هزینه و پربازده می باشد و منجر به تولید ساختارهای کریستالی نانوذره با اندازه های مختلف می شود و این وابسته به ماهیت عصاره گیاهی، pH، دما و مدت زمان انکوباسیون دارد (۱۵). تاکنون از گیاهان مختلفی مانند Albizia ،Plumbago zeylanica adianthifolia، Acacia leucophloea, Chrysanthemum indicum L., Achillea biebersteinii, Lantana camara. جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده کرده اند (۱۶). Behboodi و همکارانش در سال ۲۰۱۹ با استفاده از عصاره گیاه Cichorium intybus نانوذرات نقره سنتز کرده و اثرات ضدسرطانی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-02-10]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.10.0]

آن را بروی رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره این گیاه آسان و ارزان می باشد و نانوذرات نقره دارای اثرات سمیت سلولی معناداری بر روی رده سلولی MCF-7 می باشد (۱۷).

اما تاکنون مطالعه ای در زمینه سنتز نانوذرات نقره توسط توسط عصاره گیاه خلنگ (Erica carnea) انجام نگرفته است. گیاهی از خانواده Ericaceae (اریکاسه) بصورت بوته ای و منشعب که انشعابات کوچک و پیچ خورده و برگ های بسیارظریفی دارد. گیاه، گل و تخم خلنگ دارای خواص درمانی است. هم چنین، روغن شکوفه‌های خلنگ برای تسکین درد مفاصل و روماتیسم بسیار مفید است. علاوه بر آن، جوشانده شکوفه‌های خلنگ برای ضد عفونی کردن و معالجه ورم مثانه و بیماری‌های مجاری ادرار مفید است (۱۸). هدف از این مطالعه سنتز بیولوژیک نانوذره نقره با استفاده از عصاره گیاه خلنگ، بررسی اثرات ضدمیکروبی، ضدسرطانی و آپوپتوتیک آن بر روی رده سلولی سرطان پستان می باشد.

روش کار

مواد شیمیایی و گیاه مورد استفاده: در این مطالعه نیترات نقره (AgNO3) از شرکت سیگما آلدریچ آلمان خریداری شد. هم چنین گیاه خلنگ از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی با شماره هرباریوم ۱۳۸۶ خریداری شد.

عصاره گیری و سنتز نانوذره نقره: اندام هوایی خشک شده گیاه خلنگ با استفاده از دستگاه خرد کن بصورت پودر درآورده شده و ۵ گرم از پودر گیاه با ۱۰۰ میلی لیتر از اتانول مخلوط شده و در دستگاه همزن به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. در ادامه عصاره بدست آمده با استفاده از کاغذ واتمن فیلتر شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد جهت انجام آزمایشان بعدی نگه داری شد. سنتز نانوذره نقره با استفاده از ۱۰۰ میلی لیتر از محلول نیترات نقره (۰/۰۱ میلی مولار) و حجم ۵ میلی لیتر از عصاره تهیه شده انجام گرفت. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه از زمان واکنش، تغییر رنگ به سمت قهوه ای تیره اتفاق افتاد که نشان دهنده احیای نیترات نقره و سنتز نانوذره نقره بود. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه از زمان واکنش، سه مرتبه شستشوی رسوب نانوذره نقره با آب مقطر انجام گرفت. تمام مراحل شستشو با دور ۱۳۰۰۰rpmبه مدت ۲۰ دقیقه سانترفیوژ گردید. در نهایت شستشوی انتهایی با اتانول انجام گرفت و محصول حاصل دردمای ۷۵ °C طی ۲ ساعت قرار داده شد (۱۹).

بررسی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات نقره سنتز شده: بعد از گذشت ۲۰ دقیقه از زمان واکنش و تغییر رنگ واکنش به قهوه ای تیره، آنالیز طیف سنجی مرئی فرابنفش نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه طیف سنجی UV-Vis (Agilent, Spectrophtometer, USA) بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

میکروسکوپ الکترونی نگاره و گذاره: به منظور بررسی مورفولوژی نانوذرات نقره سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و گذاره (TEM) استفاده شد. در مکروسکوپ SEM، یک قطره از نمونه سوسپانسیون نانوذرات نقره پس از پوشش دهی با پودر طلا در ولتاژ زیر ۳۰ KV و تحت فشار خلاء (10^{-5} Torr) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مدل XL30 شرکت فیلیپس ساخت کشور ژاپن مورد مطالعه قرار گرفت. در میکروسکوپ TEM، یک قطره از نمونه بر روی گرید قرار گرفته و پس از خشک شدن با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی گذاره TEM (Leo 906) (TEM مدل ۱۰۰ KV Zeiss)، ساخت کشور آلمان با ولتاژ شتاب دهنده ۱۲۰Kv تصویر برداری شد.

بررسی اثرات ضدمیکروبی: در این مطالعه به منظور بررسی اثرات ضدمیکروبی نانوذرات نقره سنتز شده از روش کمترین غلظت بهینه (MIC) استفاده گردید. MIC به کمترین غلظت نانوذره نقره که توانایی مهار رشد باکتری را بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون دارا بود، در نظر گرفته شد. در ابتدا یک کشت تازه از باکتری های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853)، باسیلوس سوبتیلیس (ATCC 23857)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) و اشرشیا کلی (ATCC 25922) تهیه گردید. به دنبال آن از تمامی باکتری های مورد مطالعه غلظت نیم مک فارلند و هم چنین از نانوذرات نقره سنتز شده غلظت های ۱۲۵-۳/۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه گردید. در

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-02-10]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.10.0]

نهایت در چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه ای میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث، ۹۵ میکرولیتر از غلظت های نانوذره نقره و ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری های مورد مطالعه اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گذاری گردید و میزان MIC بررسی گردید (۲۰).

بررسی اثرات سیتوتوکسیک نانوذرات نقره: اثرات سیتوتوکسیک نانوذره نقره سنتز شده بر روی رده سلول سرطانی پستان (MCF-7) با استفاده از روش رنگ سنجی MTT انجام گرفت. در ابتدا تعداد ۱۰۰۰۰سلول MCF-7 در پلیت های کشت سلول کاشته شد و به دنبال آن سلول ها تحت تیمار غلظت های ۱۰۰- ۳/۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر از نانوذره نقره قرار گرفتند.بعد از مدت ۲۴ ساعت، میزان ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT به چاهک ها اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با میزان ۵٪ CO2 انکوبه گردید. به دنبال آن به چاهک ها DMSO به منظور حل شدن کریستال های فورمازان اضافه گردید و میزان جذب چاهک ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از الایزا ریدر (ELISA reader, Oraganon Teknika، هلند) خوانده شد و میزان کشندگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد:

۱۰۰×(جذب نوری سلول‌های کنترل بر جذب نوری سلول های تیمار شده)= میزان بقای سلولی

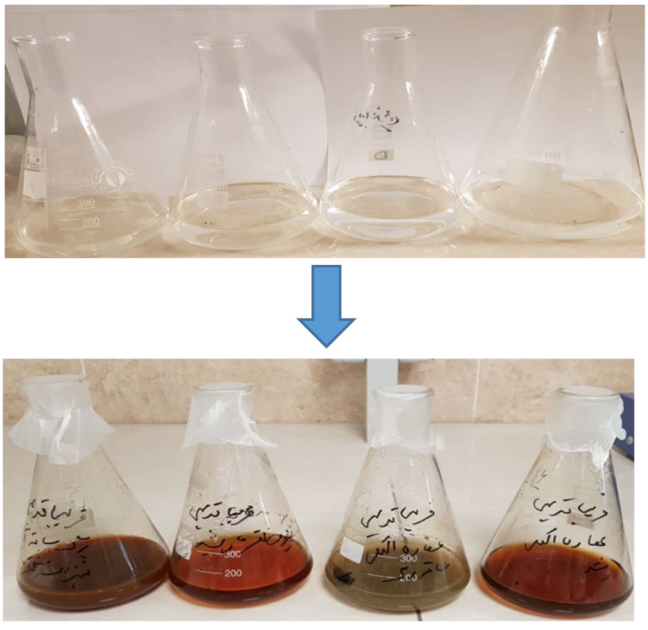
همچنین میزان دوز ۵۰ درصد کشندگی (IC50 یا Half maximal inhibitory concentration) نیز محاسبه شد (۲۱).

بررسی میزان القای آپوپتوز : به منظور بررسی میزان القای آپوپتوز در سلول های MCF-7 تیمار شده با نانوذرات نقره از روش فلوسیتومتری استفاده گردید. در ابتدا تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول با غلظت IC50 نانوذره نقره تیمار شده و سلول های تیمار نشده به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت میزان آپوپتوز توسط روش Annexin V/propidium iodide (PI) بر طبق دستورالعمل کیت مربوطه انجام گرفت و در نهایت نتایج توسط دستگاه فلوسیتومتری خوانش گردید (۲۲).

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند. اطلاعات به صورت mean±standard deviation (SD) نمایش داده شده و P<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سنتز نانوذرات نقره و طیف سنجی UV-Vis: بیوسنتز



A B C

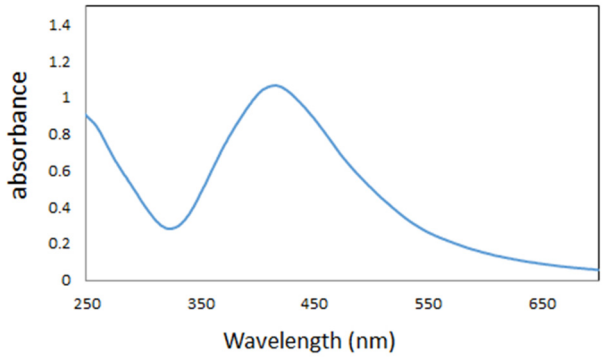
شکل ۱ – سنتز نانوذرات نقره. همانطور که ملاحظه می شود پس از افزودن عصاره گیاه به نیترات نقر بی رنگ، رنگ آن به قهوه ای تیره تغییر رنگ می دهد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-02-10]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.10.0]

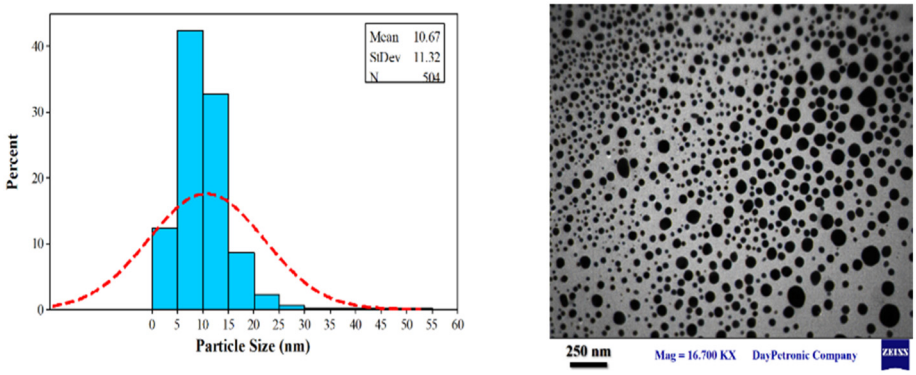
نانوذرات نقره با تغییر رنگ محلول طی یک ساعت از زمان واکنش صورت گرفت. رنگ محلول با افزودن عصاره ی گیاهی E. carnea به محلول نیترات نقره از بی رنگ به رنگ مایل به قرمز طی ۳۰ دقیقه و به تدریج در طی ۶۰ دقیقه از زمان واکنش، به قهوه ای تیره تغییر یافت. تغییر رنگ نشان دهنده احیای نیترات نقره و تشکیل نانوذرات نقره در محلول است (شکل ۱) و وجود پیک در طول موج ۴۳۸ نانومتر برای نانوذرات نقره با دستگاه طیف سنجی UV-vis طی زمان های مختلف واکنش تایید شد (شکل ۲).

میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) و نگاره (SEM): نتایج میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM نشان داد

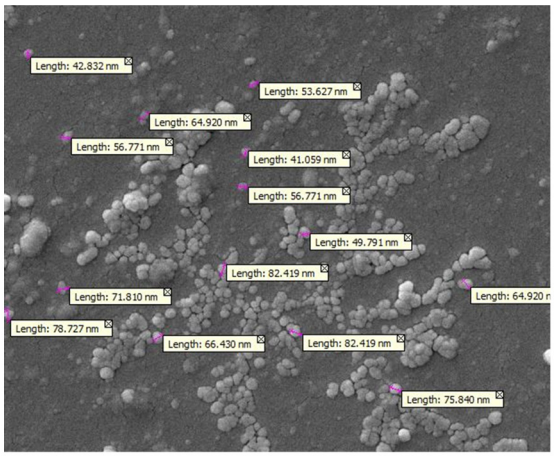


A

شکل ۲- طیف سنجی UV-Vis نانوذرات نقره سنتز شده. وجود پیک در طول موج ۴۳۸ نانومتر سنتز نانوذره نقره را تایید می کند.



A

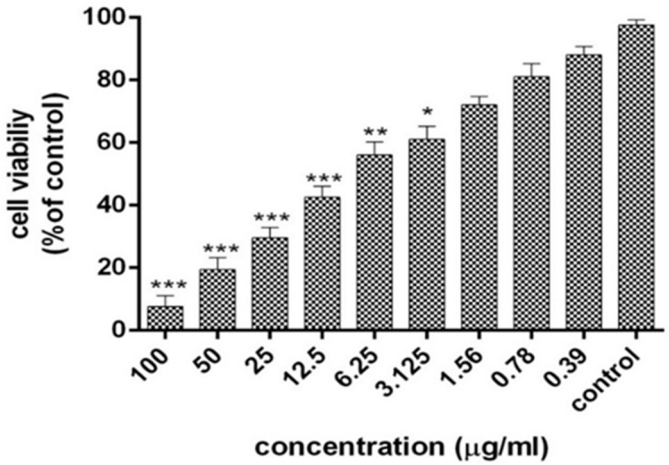


C

شکل ۳- نتایج میکروسکوپ الکترونی TEM (B)، SEM (C) و میانگین سایز نانوذرات (A).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-02-10]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.10.0]



شکل ۴- درصد بقای سلول های MCF-7 در برابر غلظت های مختلف نانوذره نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت
نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه های کنترل گزارش شده است (*: P <۰/۰۵ ، **: P <۰/۰۱ ، *** P <۰/۰۰۱ : n=3).

جدول ۱- اثرات ضدمیکروبی نانوذرات نقره سنتز شده.

میزان MIC (میکروگرم در میلی لیتر)	باکتری های مورد مطالعه
۲۵	*استافیلوکوکوس اورئوس*
۱۲/۵	*باسیلوس سوبتیلیس*
۳/۱۲۵	*اشرشیا کلی*
۶/۲۵	*سودوموناس آئروژینوزا*

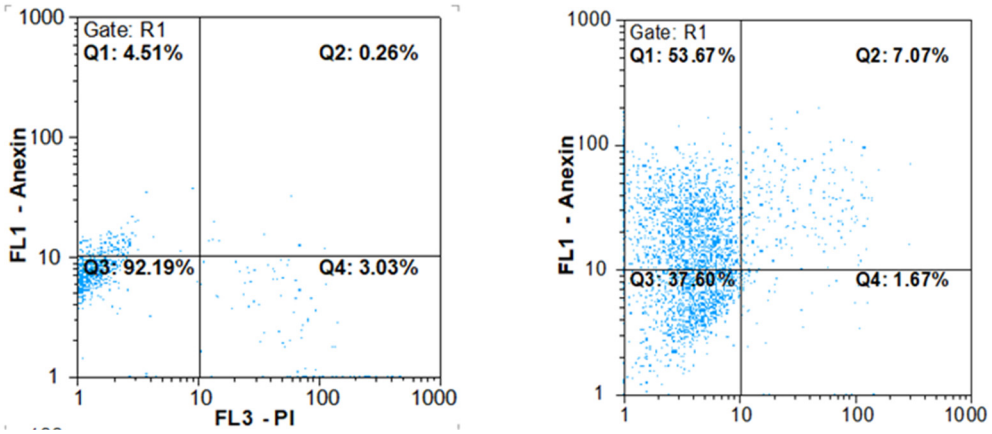
که نانوذره سنتز شده دارای ساختار کروی می‌باشد. هم نتایج نشان داد که نانوذره نقره سنتز شده دارای میانگین سایز ۱۰/۶۷ نانومتر بود (شکل ۳).

بررسی اثرات ضدمیکروبی: در این مطالعه، به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذره نقره از روش MIC استفاده شد. در روش MIC سویه های باکتریایی تحت غلظت‌های ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از نانوذره نقره قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره روی باکتری های گرم منفی بیشترین تاثیر را داشتند بطوریکه کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) نانوذره نقره مربوط به باکتری های اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا بود (جدول ۱).

نتایج سیتوتوکسیک نانوذرات نقره: اثرات سیتوتوکسیک نانوذرات نقره سنتز شده برروی سلول سرطانی MCF-7 با روش MTT انجام گرفت و درصد زنده بودن سلول ها پس از ۲۴ ساعت اندازه گیری شد. تیمار سلول های رده سرطان MCF-7 با غلظت های مختلف در مدت ۲۴ ساعت نشان داد که سمیت سلولی نانوذره نقره سنتز شده وابسته به دوز می باشد و در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بیشترین اثرات سیتوتوکسیک مشاهده شد و میزان IC50 برابر با ۷/۱۴ میکروگرم در میلی لیتر بود (شکل ۴).

بررسی میزان آپوپتوز: به منظور تعیین میزان آپوپتوز القا شده در سلولهای MCF-7 تیمار شده شده با نانوذرات نقره، این سلولها با FITC Annexin V/ PI رنگ آمیزی شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری مطالعه شدند. در طی فاز اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین به خارج از غشا سلولی منتقل به هسته سلول در PI رنگ می‌شود و رنگ Annexin V شده و توسط زمان نکروز متصل می شود. نتایج فلوسایتومتری در شکل ۵ نشان نشان داده شده است. مربع سمت چپ پایین (Q3) میزان سلول های زنده، مربه سمت چپ بالا (Q1) میزان آپوپتوز تاخیری، مربع سمت راست بالا (Q2) میزان آپوپتوز اولیه و مربع سمت راست پایین (Q4) میزان نکروز سلولی می باشد. همانطور که ملاحظه می شود میزان آپوپتوز سلول ۶۰٪ می باشد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-02-10]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.10.0]



شکل ۵- میزان القای آپوپتوز در سلول های MCF-7 تیمار شده با نانوذرات نقره.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه برای اولین بار نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه خلنگ سنتز گردید و اثرات بیولوژیکی آن مورد مطالعه قرار گرفت. بطور کلی، امروزه از روش های مختلف فیزیکی، شیمیایی و زیستی جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده می کنند. با توجه به مشکلات عمده ای که در روش های شیمیایی و فیزیکی برای تولید نانوذرات وجود دارد، نیاز به روش هایی آسان، کم هزینه، ایمن، سازگار با محیط زیست وجود دارد. یک راهکار کم هزینه و سازگار با محیط زیست برای سنتز نانوذرات نقره استفاده از عصاره گیاهان مختلف است (۲۳). همانطور که ذکر گردید، در این مطالعه از عصاره گیاه خلنگ جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده گردید و نتایج نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده کروی و دارای میانگین سایز ۱۰/۶۷ نانومتر بود. به نظر می رسد عصاره گیاه دارای ترکیبات آمینواسیدی، فنولیک اسید و فلاوونوئیدها می باشد که سبب احیای نقره فلزی به نانوذرات نقره می شود. مطالعات بسیاری نشان می دهد که پروتئین‌ها و آنزیم‌های موجود در عصاره گیاهی نقش بسزایی در سنتز نانوذره نقره دارند. تاکنون اط گیاهان مختلف جهت شنتز نانوذرات نقره استفاده کردند (۲۴).

مطالعات بسیاری در زمینه سنتز نانوذرات نقره توسط عصاره گیاهان به انجام رسیده است. Salehi و همکارانش در سال ۲۰۱۶ با استفاده از عصاره گیاه Artemisia marschalliana Sprengel نانوذره نقره سنتز کردند و نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره سنتز شده دارای سایز کمتر از ۵۰ نانومتر بوده و دارای اثرات ضدسرطانی و ضدمیکروبی می باشد (۲۵). خلیلی و همکارانش در سال ۲۰۱۷ با استفاده از عصاره گیاه Artemisia tournefortiana نانوذرات نقره را سنتز کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره سنتز شده دارای میانگین اندازه ۲۲/۸۹ نانومتر بوده و دارای خاصیت ضدمیکروبی و ضدسرطانی معنادار می باشد (۲۶). سنتز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاهی آرتمیزیا آنوآ (Artemisia annua) توسط باساوگودا و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش شد. در مطالعه آن ها اثرات ضد باکتریایی و ضد آنزیم تیروزیناز نانو ذرات نقره مورد مطالعه قرار گرفت .این محققان بیان کردند که نانو ذره نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاهی به عنوان احیا کننده قوی، مقرون به صرفه می باشد (۲۷).

هم چنین در این مطالعه اثرات ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده بر روی باکتری های پاتوژن مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج تست اثرات ضدمیکروبی نشان داد که نانوذرات نقره بر روی باکتری های گرم منفی اثرات ضدمیکروبی معناداری دارد. مطالعات نشان داده است که یون های نقره به دلیل داشتن بار مثبت به غشای خارجی باکتری های گرم منفی که دارای بار منفی می باشد راحت تر متصل شده و وارد سلول می شود و به همین دلیل نانوذرات نقره بر روی باکتری های گرم منفی تاثیر بیشتری دارد. تاکنون مکانیسم دقیقی برای خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره پیشنهاد نشده است اما گزارشات نشان می دهد که تغییر مورفولوژی غشای باکتریایی باعث افزایش

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-02-10]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.10.0]

نفوذپذیری نانوذرات نقره می شود و نفوذ غیرقابل کنترل نانوذرات نقره به درون سلول اتفاق می افتد و منجر به مرگ سلول می گردد. هم چنین یکی دیگر از دلایل اثرات ضدمیکروبی نانوذرات نقره می تواند آزادسازی یون‌های نقره از نانوذرات نقره باشد که به اکسیژن، گوگرد و نیتروژن بیومولکول های عملکردی در سلول می شود که منجر به مرگ سلول های باکتریایی می شود. هم چنین نانوذرات نقره می‌توانند باعث تولید رادیکال های سمی اکسیژن در سلول های باکتریایی شده و بر روی DNA اثر بگذارند (۲۸).

در ادامه اثرات ضدسرطانی و آپوپتوزی نانوذرات نقره بر روی رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) انجام گرفت. نتایج نشان داد که اثرات سیتوتوکسیک نانوذرات نقره وابسته به دوز بوده و در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر دارای بیشترین اثرات سیتوتوکسیک می باشد. هم چنین نتایج نشان داد که نانوذرات نقره توانایی القای آپوپتوز به میزان ۶۰٪ را دارند. Foldbjerg R و همکارانش در سال ۲۰۱۱ اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره را بروی رده سلولی سرطان ریه (A549) مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره دارای اثرات سمیت سلولی وابسته به دوز می باشد. هم چنین نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره باعث آسیب به DNA شده و باعث تولید رادیکال های سمی اکسیژن (ROS) می شود (۲۹). Mousavi و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره برگ گیاه آرتمیزیا تورکومونیکا (Artemisia turcomonica) سنتز کرده و اثرات ضدسرطانی آن را بر روی رده سلولی سرطان ریه مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشات داد که اندازه میانگین نانوذره نقره سنتز شده ۲۲ نانومتر است و نانوذره نقره سنتز شده دارای اثرات سمیت سلولی معناداری برروی رده سلولی سرطان ریه می باشد (۳۰). صالح زاده و همکارانش در سال ۱۳۹۷ اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره سنتز شده زیستی را بر روی رده سلولی سرطان پستان T47D مورد مطالعه قرار دادند و نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده دارای اندازه میانگین ۱۰ تا ۵۰ نانومتر بوده و دارای سمیت سلولی وابسته به دوز و زمان می باشد (۳۱).

نقطه نظر مشابه مطالعه ما با مطالعات انجام شده، اثرات معنادار سمیت سلولی نانوذرات نقره می باشد که با افزایش غلظت نانوذرات نقره، سمیت سلولی نیز افزایش می یابد، در واقع اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره وابسته به دوز می باشد. هم چنین نانوذرات نقره می توانند در رده های سلولی سرطانی آپوپتوز را القا کنند. مطالعات نشان داده است که اکثر محققان به دنبال یافتن ترکیبات ضدسرطانی که اثرات خود را از طریق آپوپتوز نشان می دهند، می باشند. مسیر مرگ سلولی می تواند شامل فعال‌سازی رویدادهای پروآپوپتوتیک اندامک میتوکندری در سلول باشد که با آزاد سازی سیتوکروم c از آن آغاز می شود. علاوه بر این اثرات نانوذرات نقره در افزایش بیان ژن پروتئاز کاسپاز ۳ در سلول های سرطانی و القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی در مطالعات مختلف نشان داده شده است (۳۲). به طور کلی القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی یکی از رویکردهای جذاب در در درمان سرطان به شمار می رود که به نظر می رسد نانوذرات نقره می‌توانند جایگزین مناسب برای درمان باشند.

بطور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که سنتز بیولوژیک نانوذرات نقره توسط عصاره گیاه خلنگ بسیار راحت، کم هزینه و دارای بازده تولید بالا می باشد. هم چنین نانوذرات نقره سنتز شده دارای اندازه کوچک و کروی شکل می باشند که براحتی از عرض غشای سلول عبور کرده و باعث اثرات سمیت سلولی در سلول های سرطانی و باکتریایی می شوند. بنابراین می توان با مطالعات بیشتر از نانوذرات نقره سنتز شده به عنوان کاندید دارو و آنتی بیوتیک به ترتیب جهت اهداف درمانی سرطان و عفونت های میکروبی استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از تمامی کسانی که در انجام این تحقیق همکاری نموده اند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Salata O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. J Nanobiotechnol; 2004. 2(1):3-10.

2. Sánchez-Moreno P, de Vicente J, Nardecchia S, Marchal JA, Boulaiz H. Thermo-Sensitive Nanomaterials: recent advance in synthesis and

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-02-10]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.10.0]

biomedical applications. Nanomaterials (Basel); 2018. 8(11):10-16.
3. Ge L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing MM. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. Int J Nanomed; 2014. 9(1):2399-407.
4. Barkat MA, Harshita, Beg S, Naim MJ, Pottoo FH, Singh SP, Ahmad FJ. Current progress in synthesis, characterization and applications of silver nanoparticles: precepts and prospects. Recent Pat Antiinfect Drug Discov; 2018.13(1):53-69.
5. Mohammed AE, Al-Qahtani A, Al-Mutairi A, Al-Shamri B, Aabed KF. Antibacterial and cytotoxic potential of biosynthesized silver nanoparticles by some plant extracts. Nanomaterials (Basel); 2018. 8(6):36-42.
6. Rojas K, Stuckey A. Breast cancer epidemiology and risk factors. Clin Obstet Gynecol; 2016. 59(4):651-672.
7. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast cancer: epidemiology and etiology. Cell Biochem Biophys; 2015. 72(2):333-8.
8. Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and mortality and epidemiology of Breast cancer in the world. Asian Pac J Cancer Prev; 2016. 17(S3):43-6.
9. Ramaswami R, Harding V, Newsom-Davis T. Novel cancer therapies: treatments driven by tumour biology. Postgrad Med J; 2013. (1057):652-8.
10. Spicer J1, Chowdhury S, Harper P. Targeting novel and established therapies for non-small cell lung cancer. Cancer Lett; 2007. 250(1):9-16.
11. Ullah Khan S, Saleh TA, Wahab A, Khan MHU, Khan D, Ullah Khan W, et al. Nanosilver: new ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold. Int J Nanomedicine; 2018. 13:733-762.
12. Buttacavoli M, Albanese NN, Di Cara G, Alduina R, Faleri C, Gallo M. Anticancer activity of biogenerated silver nanoparticles: an integrated proteomic investigation. Oncotarget; 2017. 9(11):9685-9705.
13. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. Int J Mol Sci; 2016. 17(9).
14. Aboelfetoh EF, El-Shenody RA, Ghobara MM. Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using green algae (Caulerpa serrulata): reaction optimization, catalytic and antibacterial activities. Environ Monit Assess; 2017.189(7):349.
15. Ajitha B, Ashok KRY, Sreedhara RP. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Lantana camara leaf extract. Mater Sci Eng C; 2015. 49(1):373–381.
16. RHS A-Z encyclopedia of garden plants. United Kingdom: Dorling Kindersley. 2008. p. 1136.
17. Behboodi S, Baghbani-Arani F, Abdalan S, Sadat Shandiz SA. Green engineered biomolecule-capped silver nanoparticles fabricated from Cichorium intybus extract: in vitro assessment on apoptosis properties toward human breast cancer (MCF-7) cells. Biol Trace Elem Res. 2019.187(2):392-402.
18. Mohammad Yasir, Jaspreet Singh, Manish Kumar Tripathi, Pushpendra Singh, Rahul Shrivastava.Green synthesis of silver nanoparticles u sing leaf extract of common Arrowhead Houseplant and its anticandidal activity. Pharmacogn Mag; 2017. (Suppl 4): S840–S844.
19. Escárcega-González CE, Garza-Cervantes JA, Vázquez-Rodríguez A, Montelongo-Peralta LZ, Treviño-González MT, Díaz Barriga Castro E. In vivo antimicrobial activity of silver nanoparticles produced via a green chemistry synthesis using Acacia rigidula as a reducing and capping agent. Int J Nanomedicine; 2018. 13:2349-2363.
20. Khorrami S, Zarrabi A, Khaleghi M, Danaei M, Mozafari MR. Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties. Int J Nanomed; 2018. 27;13:8013-8024.
21. Baharara J, Ramezani T, Divsalar A, Mousavi M, Seyedarabi A. Induction of Apoptosis by Green Synthesized Gold Nanoparticles Through Activation of Caspase-3 and 9 in Human Cervical Cancer Cells. Avicenna J Med Biotechnol; 2016. 8(2):75-83.
22. Patil MP1, Kim GD. Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. Appl Microbiol Biotechnol; 2017. 101(1):79-92.
23. Mashwani ZU, Khan MA, Khan T, Nadhman A. Applications of plant terpenoids in the synthesis of colloidal silver nanoparticles. Adv Colloid Interface Sci; 2016. 234:132-41.
24. Moshfegh A, Jalali A, Salehzadeh A, Sadeghi A. Biological synthesis of silver nanoparticles by cell-free extract of Polysiphonia algae and their anticancer activity against breast cancer MCF-7 cell lines. Micro & Nano Letters; 2019. 14: 581-584.
25. Salehi S, Sadat Shandiz SA, Ghanbar F, Darvish MR, Shafiee Ardestani M, Mirzaie A, JafariM.Phytosynthesis of silver nanoparticles using Artemisia marschalliana Sprengel aerial partextract a nd assessment oftheir antioxidant, anticancerand anti bacterial properties. Int J Nanomed; 2016. 11:1835–1846.
26. Khalil M, Gurbuz M, Simone TM, Mousa SA. Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers. Int J Nanomedicine; 2009.4:1-7.
27. Vijayakumar M. Biosynthesis characterisation and anti-bacterial effect of plant mediated
28. Silver nanoparticles using Artemisia nilagirica. Ind Crop Prod; 2013. 41: 235-42.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-02-10]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.10.0]

29. Patra JK, Baek KH. Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of silky hairs of corn and investigation of its antibacterial and anticandidal synergistic activity and antioxidant potential. IET Nanobiotechnol; 2016.10(5):326-333.

30. Foldbjerg R, Dang DA, Autrup H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. Arch Toxicol; 2011. 85(7):743-50.

31. Mousavi B, Tafvizi F, Zaker Bostanabad S. Green synthesis of silver nanoparticles using Artemisia turcomanica leaf extract and the study of anti-cancer effect and apoptosis induction on gastric cancer cell line (AGS). Artif Cells Nanomed Biotechnol; 2018. 23:1-12.

32. Salehzadeh A, Sadat Shandiz A, Naeemi AS. Cytotoxicity effectiveness of biosynthesized silver nanoparticles on breast cancer T47D cell line, using macro algae Laurencia caspica extract. Sci J Ilam Uni Med Sci. 2018. 26(1):52-61.

33. Zhu B, Li Y, Lin Zh, Zhao M, Xu T, Wang Ch, et al. Silver nanoparticles induce HePG-2 cells apoptosis through ROS-mediated signaling pathways. Nanoscale Res Lett; 2016. 11:198-206.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-02-10]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.6.10.0]