Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

Synthesis and Toxicity Study of Silver Oxide Nanoparticles on Human Gingival Fibroblasts

A. Mozaffari (DDS, MS)[1], M. Sharifyrad (PhD)[*2], M. Ranjbaran (PhD)[3], M. Radpour (DDS)[4]

1.Department of Periodontics, School of Dentistry, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, I.R.Iran.
2.Pharmaceutical Nanotechnology Research Center, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, I.R.Iran.
3.Metabolic Diseases Research Center, Research Institute for Prevention of Non-Communicable Diseases, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, I.R.Iran.
4.Student Research Committee, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, I.R.Iran.

***Corresponding Author: M. Sharifyrad (PhD)**
Address: Pharmaceutical Nanotechnology Research Center, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, I.R.Iran.
Tel: +98 (24) 33473635. **E-mail:** M.rad4294@gmail.com

Article Type
Research Paper

Received:
Oct 10th 2023
Revised:
Dec 18th 2023
Accepted:
Mar 2nd 2024

ABSTRACT

Background and Objective: Silver oxide nanoparticles have very high activity against a wide range of microbes and parasites and also have lower toxicity to human cells compared to other biocides and heavy metals. The present study was conducted to determine the cytotoxic effects of silver oxide nanoparticles on gingival fibroblasts.

Methods: This experimental in vitro study was conducted on 15 samples in 4 groups at concentrations of 10, 20, 30 and 40 µg/ml within 2, 24, 48 and 72 hours. Dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM) were used to determine the properties of silver oxide nanoparticles, and the MTT technique was used to determine the toxicity of silver oxide nanoparticles.

Findings: According to the results, after 2 hours of proximity to silver oxide nanoparticles, the mean difference was statistically significant between the control group (0.19±0.01) and the 40 µg/ml group (0.17±0.01), and also between the 10 µg/ml group (0.19±0.01) and the 40 µg/ml group (0.17±0.01) ($p<0.001$). After 48 hours of proximity, the mean difference in OD between the control group and concentrations of 40 µg/ml (0.25±0.01) and 30 µg/ml (0.25±0.01) was statistically significant ($p<0.001$). After 72 hours, the mean difference in OD between the control group and concentrations of 40 µg/ml (0.30±0.01) and 30 µg/ml (0.31±0.01) was statistically significant ($p<0.001$).

Conclusion: The results of the study showed that the highest viability was related to the concentration of 10 µg/ml and after 2 hours. Therefore, this concentration of silver oxide nanoparticles has acceptable biocompatibility.

Keywords: *Silver Oxide Nanoparticles, Gingival Fibroblasts, Cytotoxicity.*

Cite this article: Mozaffari A, Sharifyrad M, Ranjbaran M, Radpour M. Synthesis and Toxicity Study of Silver Oxide Nanoparticles on Human Gingival Fibroblasts. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2025; 27: e20.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.20]

Copyright © 2024 Babol University of Medical Sciences. Published by Babol University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

ساخت و بررسی سمیت نانوذرات اکسید نقره بر روی فیبروبلاست‌های لثه‌ای انسانی

آسیه مظفری (DDS, MS)[۱]، مطهره شریفی راد (PhD)[۲*]، مهدی رنجبران (PhD)[۳]، محمد رادپور (DDS)[۴]

۱. گروه پریودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۲. مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک، پژوهشکده پیشگیری از بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۴. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

نوع مقاله
مقاله پژوهشی

دریافت: ۱۴۰۲/۷/۱۸
اصلاح: ۱۴۰۲/۹/۲۷
پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲

چکیده

سابقه و هدف: نانوذرات اکسید نقره دارای فعالیت بسیار زیاد در برابر طیف گسترده‌ای از میکروب‌ها و انگل‌ها هستند و نیز سمیت پایین‌تری برای سلول‌های انسان نسبت به سایر فلزات سنگین زیست کش دارند. هدف از این مطالعه تعیین اثرات سایتوتوکسیسیته نانوذرات اکسید نقره بر روی فیبروبلاست‌های لثه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در شرایط آزمایشگاهی بر روی تعداد ۱۵ نمونه در ۴ گروه با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ µg/ml در زمان‌های ۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. برای تعیین خصوصیات نانوذرات اکسید نقره از پراکندگی نور دینامیکی (DLS) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، همچنین جهت سمیت نانوذرات اکسید نقره از روش MTT استفاده شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج، در ۲ ساعت مجاورت با نانوذرات اکسید نقره، تفاوت میانگین بین گروه کنترل (۰/۰۱±۰/۱۹) با گروه غلظت ۴۰ (۰/۰۱±۰/۱۷) و گروه غلظت ۱۰ (۰/۰۱±۰/۱۹) با گروه غلظت ۴۰ (۰/۰۱±۰/۱۷) از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<0/001$). در ۴۸ ساعت مجاورت، تفاوت میانگین OD بین کنترل با غلظت‌های ۴۰ (۰/۰۱±۰/۲۵) و ۳۰ (۰/۰۱±۰/۲۵) از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<0/001$). همچنین در ۷۲ ساعت، تفاوت میانگین OD بین کنترل با غلظت‌های ۴۰ (۰/۰۱±۰/۳۰) و ۳۰ (۰/۰۱±۰/۳۱) از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<0/001$).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که بالاترین میزان viability مربوط به غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در زمان ۲ ساعت است. لذا این غلظت از نانوذرات اکسید نقره سازگاری زیستی قابل قبولی دارد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات اکسید نقره، فیبروبلاست لثه، سمیت سلولی.

استناد: آسیه مظفری، مطهره شریفی راد، مهدی رنجبران، محمد رادپور. ساخت و بررسی سمیت نانوذرات اکسید نقره بر روی فیبروبلاست‌های لثه‌ای انسانی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۱۴۰۴؛ ۲۷: e۲۰.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.20]

▣ این مقاله مستخرج از پایان نامه محمدرادپور دانشجوی رشته دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر مطهره شریفی راد
آدرس: زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی دارویی. تلفن: ۰۲۴-۳۳۴۷۳۶۳۵
رایانامه: M.rad4294@gmail.com

مقدمه

نانو مواد معمولاً به ذرات جامد ریز با قطر ۱ تا ۱۰۰ نانومتر اشاره دارند. نانو مواد به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی تقویت شده و منحصر به فرد مانند اندازه‌های بسیار کوچک، نسبت سطح به حجم بزرگ‌تر و واکنش پذیری شیمیایی افزایش یافته، در درمان‌های ضد باکتری امیدوار کننده هستند. نانوذرات در طبیعت وجود دارند و تا حد زیادی در زندگی روزمره ما استفاده می‌شوند (۲و۱). با پیشرفت تکنولوژی، نانوذرات نقره به عنوان اجزای ضد میکروبی موثر در مواد پروتز، چسب‌ها و ایمپلنت‌ها، برای توقف پوسیدگی، برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم و برای القای استخوان سازی معرفی شده‌اند. در نتیجه، منطقی است پیش‌بینی شود که در آینده نزدیک، AgNP (nanoparticle) ها نقش مهمی در مراقبت‌های بهداشتی دهان و دندان ایفا کنند (۳).

نانوذرات به قدر کافی کوچک هستند که می‌توانند از کوچک‌ترین مویرگ‌های موجود در بدن و نیز غشاهای بیولوژیکی عبور کرده و روی فیزیولوژی هر نوع سلول در بدن موثر باشند (۵و۴). اخیراً گزارشاتی مبنی بر سمیت آن‌ها بر بافت‌های کبدی، طحال، کلیه و نیز دستگاه تناسلی ارائه شده است (۶) و حتی مشخص شده است نانوذرات نقره با قطر کمتر از ۸۰ نانومتر از سد مغزی عبور می‌کنند (۹-۷). بر اساس گزارش‌ها، آسیب‌های عصبی و تنفسی، مشکلات گردش خون و برخی دیگر از اثرات سمی نانوذرات مهمترین نگرانی در استفاده از نانوذرات هستند (۱۲-۱۰). تکنیک‌های کشت سلولی جهت ارزیابی سازگاری زیستی مواد دندانپزشکی بسیار مفید می‌باشند. این تکنیک‌ها ارزان‌تر، تکرار پذیرتر و قابل اعتمادتر هستند. یکی از سلول‌هایی که در مطالعات سمیت سلولی مورد توجه قرار گرفته است، فیبروبلاست است که سلول اصلی در سنتز و تشکیل رشته‌های کلاژن و سلول‌های مزانشیمی است که می‌تواند به سمنتوبلاست و استئوبلاست‌ها متمایز شود (۱۵-۱۳).

Satyavani و همکاران، نانوذرات را از برگ Suaeda monoica (S.monoica) با استفاده از ۱ میلی‌مولار نیترات نقره سنتز کردند و اثر نانوذرات نقره سنتز شده را بر رده سلولی سرطان حنجره اپیدرموئید انسان با استفاده از تکنیک رنگ سنجی MTT مورد ارزیابی قرار دادند. اثر نانوذرات نقره بر روی رده سلولی سرطان حنجره اپیدرموئید انسانی، سمیت وابسته به دوز را برای سلول آزمایش شده نشان داد و زنده‌مانی سلول‌های Hep-2 به ۵۰٪ (IC50) در غلظت ۵۰۰ نانومولار کاهش یافت (۱۶).

در سال‌های اخیر، برخی از دانشمندان با استفاده از نانوذرات نقره به این نتیجه رسیدند که کاربرد نانوذرات در سیستم‌های دارویی حامل می‌تواند باعث افزایش سرکوب تومورها و کاهش عوارض جانبی داروها شود. در کنار این، ترکیب داروهای سنتی با نانو فناوری فرصتی برای توسعه داروهای ضد میکروبی جدید فراهم می‌آورد (۱۷).

Tunç به بررسی فعالیت‌های ضد سرطانی، ضد میکروبی و اثرات پروآپوپتوتیک نانوذرات نقره (AgNPs) و نانوذرات نقره بارگذاری شده با کاربوپلاتین (AgNPs-Car) پرداخت. برای شناسایی و تحلیل نانوذرات سنتز شده، از روش‌های DLS، EDX-STEM و FTIR استفاده نمود. اثرات ضد تکثیر و پروآپوپتوتیک این نانوذرات نیز با استفاده از آزمایش‌های XTT و Annexin V ارزیابی گردید. همچنین برای سنجش فعالیت ضد میکروبی، تست MIC (حداقل غلظت مهارکننده) به کار گرفته شد. نتایج نشان داد که فعالیت ضد سرطانی AgNPs-Car در سلول‌های MCF-7 (آدنوکارسینوم پستان انسان)، A549 (کارسینوم ریه انسان) و C6 (گلیوم مغزی) بسیار بالا بود. بیشترین فعالیت سیتوتوکسیک انتخابی در سلول‌های C6 مشاهده شد. علاوه بر این، نشان داده شد که AgNPs-Car و AgNPs باعث تجزیه DNA شده و در نهایت موجب افزایش آپوپتوز در سلول‌ها می‌گردند. در ارزیابی فعالیت ضد میکروبی AgNPs و AgNPs-Car بر روی میکروارگانیسم‌های پاتوژن گرم مثبت و منفی و قارچ‌های مخمری، نتایج نشان داد که AgNPs-Car موفق‌ترین نتایج را نسبت به دیگر نانو مواد داشت. به طور کلی، AgNPs-Car در هدف‌گیری سلول‌های گلیوم C6 با تسهیل ورود دارو به داخل سلول، عملکرد بسیار موفقی داشت. همچنین فعالیت ضد سرطانی این نانوذرات در سلول‌های MCF-7 و A549 بالا بود، در حالی که سمیت آن‌ها نسبتاً پایین بود. به دلیل ویژگی‌ها و اثرات مثبت نانوذرات نقره، این مواد برای طراحی سیستم‌های دارویی حامل ترجیح داده می‌شوند (۱۸).

به دلیل اهمیت استفاده از اکسید نقره و نیز امکان استفاده ارزان قیمت و عملی در پیشگیری از بیماری‌ها و نیز قابل اجرا بودن مطالعه و همچنین کمبود مطالعات در این زمینه، این مطالعه با هدف تعیین اثرات سایتوتوکسیته نانوذرات اکسید نقره بر روی فیبروبلاست‌های لثه‌ای در غلظت‌های مختلف در زمان‌های متفاوت انجام شد.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین با کد IR.QUMS.REC.1400.415، در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) انجام شد. با توجه به مطالعات آماری، تعداد ۱۵ نمونه برآورد شد. نانوذرات Ag_2O در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ و ۴۰ ppm تهیه شدند. از محیط

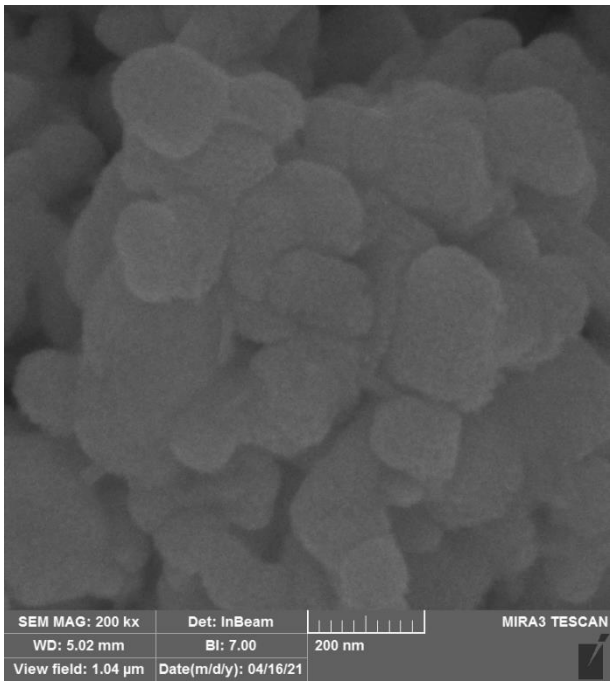
[DOI: 10.22088/jbums.27.1.20]

کشت بدون FBS برای به دست آوردن غلظت مورد نیاز از نانوذرات استفاده شد زیرا در صورت استفاده از الکل یا آب به عنوان حلال، احتمال وجود اثرات سیتوتوکسیک خود این مواد و تاثیر روی جواب آزمایش وجود دارد، لذا RPMI به عنوان ایمن‌ترین ماده مورد استفاده قرار گرفت (۱۶).

برای هر کدام از غلظت‌های مواد مورد آزمایش حداقل سه چاهک از ۴ پلیت (برای زمان‌های مختلف ۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) اختصاص داده شد و ۳ چاهک نیز برای گروه کنترل در نظر گرفته شد. در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت سلولی تعداد ۱۰۰۰۰ سلول فیبروبلاست قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (فشار ۵٪ CO_2، رطوبت ۹۸٪، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد)، محیط کشت رویی تخلیه شد. سپس نانوذرات Ag_2O با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ و ۴۰ ppm در محیط کشت در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه روی سلول‌ها اثر داده شده و در ۳ چاهک کنترل محیط کشت کامل به عنوان یک ماده ۱۰۰٪ غیر توکسیک ریخته شد.

کشت سلولی فیبروبلاست‌ها: برای اجرای این تحقیق از سلول‌های فیبروبلاست لثه‌ای C۱۶۵ (Human Gingival Fibroblast=HGF) خریداری شده از انستیتو پاستور ایران استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا سلول‌ها از وضعیت منجمد خارج شده و با محیط کشت (GIBCO RPMI) در فلاسک‌های مخصوص، کشت داده شده و درون انکوباتور تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، فشار یک اتمسفر، رطوبت ۱۰۰٪ و غلظت ۵٪ دی اکسید کربن قرار گرفتند. قبل از هر مرحله پاساژ، حیات سلولی توسط میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفت. پاساژ سلولی به منظور تکثیر سلول‌ها و رسیدن آن‌ها به تعداد لازم انجام شد. برای انجام پاساژ سلولی ابتدا محیط کشت درون فلاسک خارج و سپس با سرم فیزیولوژی گرم داخل فلاسک شستشو داده شد و محتوای آن دور ریخته شد. سپس با EDTA و تریپسین عمل جداسازی سلول‌ها از کف پلیت انجام و محیط کشت جدید وارد آن شد. نیمی از محتوای فلاسک به فلاسک دیگری منتقل شده و سپس این محیط‌ها به مدت ۱ هفته درون انکوباتور قرار گرفتند. بعد از طی شدن چند مرحله پاساژ و اطمینان از حیات سلولی، تعداد ۱۰۰۰۰ عدد سلول درون هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای قرار داده شدند. سپس حجم سلول‌ها با محیط کشت کامل یعنی RPMI جهت تغذیه سلول به همراه پنی سیلین ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جهت جلوگیری از رشد باکتری‌ها به ۱۰۰ لاندا رسانده شده و پلیت‌ها به مدت تقریبا ۲۰ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. طی این مدت عمل coating یعنی چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت انجام شد و مجدداً زنده مانی و زیست پذیری تمام چاهک‌ها ارزیابی شد. برای سنتز نانوذرات در این مطالعه از روش احیاء شیمیایی استفاده شد.

برای مطالعه اندازه نانوذرات نقره از پراکندگی نور دینامیکی (DLS) و میکروسکوپ FE-SEM استفاده شد. همچنین به منظور بررسی مورفولوژی نانوذرات نقره ساخته شده از تصویر برداری میکروسکوپ FE-SEM استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE SEM) از نانوذرات Ag_2O سنتز شده با بزرگنمایی ۲۰۰ kx

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.20]

برای زنده مانی و زیست پذیری سلول‌ها در زمان‌های ۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مجاورت با نانوذرات با استفاده از تست MTT مورد سنجش قرار گرفت. به این ترتیب که بعد از گذشت زمان‌های مورد نظر محیط‌های کشت سلولی را از انکوباتور خارج کرده و یک دهم حجم رویی سلول‌ها به هر چاهک محلول Dimethylthiazol-2 yl 2-5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) اضافه شد و پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس پلیت را بیرون آورده و با کشیدن محیط رویی به چاهک‌ها ایزوپروپانل اسیدی اضافه شد تا کریستال‌های بنفش رنگ فومارازون ایجاد شده در سلول‌هایی که زنده مانده‌اند، حل شده و مایع رنگی یکنواختی ایجاد شد. این مایع رنگی را به چاهک‌های پلیت الایزا منتقل کرده و جذب آن با استفاده از دستگاه ELISA READER در طول موج ۵۷۰ نانومتر با فیلتر رفرنس ۶۲۰ قرائت شد. نتایج حاصله بر حسب چگالی نوری رنگ (Optic Density=OD) ارزیابی شد، بدین صورت که هرچه عدد قرائت شده توسط دستگاه ELISA-reader بیشتر بود یعنی آنزیم‌های میتوکندریال بیشتری توانسته‌اند عمل احیاء MTT را انجام دهند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ انجام شد. جهت مقایسه میزان حیات سلول‌های فیبروبلاست در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و بررسی اثر همزمان غلظت و زمان از آنالیز واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) استفاده شد. مقایسه دو به دو با آزمون تعقیبی Tukey انجام شد و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظرگرفته شد.

یافته ها

در زمان ۲ ساعت اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مختلف نانو ذرات اکسید نقره از نظر میانگین Optical Density (OD) مشاهده شد ($p=۰/۰۱۴$). بیشترین میزان زنده مانی و زیست پذیری سلول‌های فیبروبلاست با غلظت ۱۰ (۰/۰۱±۰/۱۹) می‌باشد که ۹۸/۸۵٪ سلول‌ها حیات خود را حفظ کردند. در مقایسه دو به دو بین غلظت‌های مختلف، فقط تفاوت میانگین بین گروه کنترل با گروه غلظت ۴۰ (۰/۰۱±۰/۱۷) و گروه غلظت ۱۰ با گروه غلظت ۴۰ از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۱).

در زمان ۲۴ ساعت، بیشترین میزان زنده مانی و زیست پذیری سلول‌های فیبروبلاست با غلظت ۱۰ (۰/۰۱±۰/۲۳) می‌باشد که ۹۶/۷۴٪ سلول‌ها حیات خود را حفظ کردند. به طور کلی اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مختلف نانو ذرات اکسید نقره از نظر میانگین OD مشاهده نشد ($p=۰/۴۲۷$) (جدول ۲).

جدول ۱. میزان زنده مانی و زیست پذیری سلول‌های فیبروبلاست در زمان ۲ ساعت

غلظت نانو ذرات اکسید نقره (µg/ml)	تعداد	زنده مانی و زیست پذیری فیبروبلاست‌ها (٪)	Mean±SD	p-value
کنترل	۵	۱۰۰	۰/۰۱±۰/۱۹^{a}	۰/۰۱۴
۱۰	۵	۹۸/۸۵	۰/۰۱±۰/۱۹^{a}	۰/۰۱۴
۲۰	۵	۹۵/۲۲	۰/۰۲±۰/۱۸^{ab}	۰/۰۱۴
۳۰	۵	۹۲/۷۳	۰/۰۱±۰/۱۸^{ab}	۰/۰۱۴
۴۰	۵	۹۰/۲۳	۰/۰۱±۰/۱۷^{bc}	۰/۰۱۴

حروف کوچک مشابه نشان دهنده عدم اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۲. میزان زنده مانی و زیست پذیری سلول‌های فیبروبلاست در زمان ۲۴ ساعت

غلظت نانو ذرات اکسید نقره (µg/ml)	تعداد	زنده مانی و زیست پذیری فیبروبلاست‌ها (٪)	Mean±SD	p-value
کنترل	۵	۱۰۰	۰/۰۳±۰/۲۴	۰/۴۲۷
۱۰	۵	۹۶/۷۴	۰/۰۱±۰/۲۳	۰/۴۲۷
۲۰	۵	۹۵/۴۸	۰/۰۲±۰/۲۳	۰/۴۲۷
۳۰	۵	۹۱/۲۲	۰/۰۱±۰/۲۱	۰/۴۲۷
۴۰	۵	۹۰/۵۵	۰/۰۲±۰/۲۲	۰/۴۲۷

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.20]

بیشترین میزان زنده مانی و زیست پذیری سلول‌های فیبروبلاست، در ۴۸ ساعت مجاورت آن‌ها با نانو ذرات اکسید نقره با غلظت ۱۰ (۰/۰۱±۰/۲۷) و ۲۰ (۰/۰۱±۰/۲۷) می‌باشد که ۹۲/۶۲٪ سلول‌ها حیات خود را حفظ کردند. در مقایسه دو به دو بین غلظت‌های مختلف، تفاوت میانگین OD بین گروه کنترل با غلظت‌های ۴۰ (۰/۰۱±۰/۲۵) و ۳۰ (۰/۰۱±۰/۲۵) از نظر آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۱) (جدول ۳).

در زمان ۷۲ ساعت، بیشترین میزان زنده مانی و زیست پذیری سلول‌های فیبروبلاست با غلظت ۱۰ (۰/۰۱±۰/۳۴) می‌باشد که ۹۳/۵۵٪ سلول‌ها حیات خود را حفظ کردند. در مقایسه دو به دو بین غلظت‌های مختلف، تفاوت میانگین OD بین گروه کنترل با غلظت‌های ۴۰ (۰/۰۱±۰/۳۰) و ۳۰ (۰/۰۱±۰/۳۱) از نظر آماری معنی‌دار بود. همچنین غلظت ۴۰ با غلظت ۱۰ و ۲۰ (۰/۰۱±۰/۳۳) تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۰۰۱) (جدول ۴).

با کنترل اثر زمان، تفاوت معنی‌داری از نظر میزان زنده مانی و زیست پذیری سلول‌های فیبروبلاست بین غلظت‌های مختلف مشاهده گردید (p<۰/۰۰۱) (نمودار ۱). همچنین با تطبیق اثر غلظت، تغییرات زمان به طور مستقل معنی‌دار بود. میانگین زنده مانی و زیست پذیری در طول زمان در غلظت‌های مختلف روندی افزایشی داشت. همچنین در تمامی زمان‌ها، بیشترین میانگین زنده مانی و زیست پذیری مربوط به غلظت ۱۰ بود.

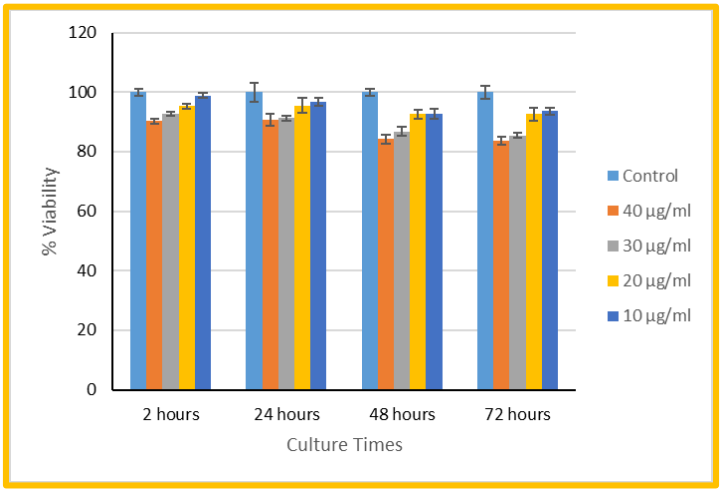
جدول ۳. میزان Viability سلول‌های فیبروبلاست در زمان ٤٨ ساعت

غلظت نانو ذرات اکسید نقره (µg/ml)	تعداد	Viability فیبروبلاست‌ها (٪)	Mean±SD	p-value
کنترل	۵	۱۰۰	۰/۲۹±۰/۰۱^{a}	۰/۰۰۱
۱۰	۵	۹۲/۶۲	۰/۲۷±۰/۰۱^{ab}	۰/۰۰۱
۲۰	۵	۹۲/۶۲	۰/۲۷±۰/۰۱^{ab}	۰/۰۰۱
۳۰	۵	۸۶/۸۲	۰/۲۵±۰/۰۱^{b}	۰/۰۰۱
۴۰	۵	۸۴/۲۳	۰/۲۵±۰/۰۱^{b}	۰/۰۰۱

حروف کوچک مشابه نشان دهنده عدم اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد.

جدول ٤. میزان زنده مانی و زیست پذیری سلول‌های فیبروبلاست در زمان ۷۲ ساعت

غلظت نانو ذرات اکسید نقره (µg/ml)	تعداد	زنده مانی و زیست پذیری فیبروبلاست‌ها (٪)	Mean±SD	p-value
کنترل	۵	۱۰۰	۰/۳۶±۰/۰۲^{a}	۰/۰۰۰۱
۱۰	۵	۹۳/۵۵	۰/۳۴±۰/۰۱^{ab}	۰/۰۰۰۱
۲۰	۵	۹۲/۶۰	۰/۳۳±۰/۰۲^{ab}	۰/۰۰۰۱
۳۰	۵	۸۵/۳۸	۰/۳۱±۰/۰۱^{bc}	۰/۰۰۰۱
۴۰	۵	۸۳/۶۰	۰/۳۰±۰/۰۱^{cd}	۰/۰۰۰۱



نمودار ۱. میانگین درصد زنده مانی و زیست پذیری سلول‌های فیبروبلاست با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ٤٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۲ و ٢٤ و ٤٨ و ۷۲ ساعت

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.20]

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه نشان داد که بیشترین میزان زنده مانی و زیست پذیری سلول‌های فیبروبلاست، در ۲ ساعت مجاورت آن‌ها با نانوذرات اکسید نقره با غلظت ۱۰ می‌باشد که ۹۸/۸۵٪ سلول‌ها حیات خود را حفظ کردند.

نتایج مطالعه Mohsenzadeh و همکاران بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی نشان دادند تا غلظت‌های کمتر از ۱۰ ppm سمیتی برای سلول‌ها وجود ندارد (۱۹). در نتیجه کلی کمترین سمیت در زمان کمتر و غلظت کمتر از ۱۰ می‌باشد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

در مطالعه Yen و همکاران نشان داده شد اثر سیتوتوکسیک نانوذرات با اندازه کوچک به ماکروفاژها نسبت به اندازه متوسط یا بزرگ در هر دو نانوذرات نقره و طلا بارزتر است و AuNP ها تأثیر بیشتری نسبت به AgNP های هم اندازه داشتند. یافته‌ها همچنین ایمنی زیستی نانوذرات نقره را برای کاربردهای ضدمیکروبی در دوز کمتر از ۱۰ ppm تضمین کردند که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۲۰).

طبق مطالعه Xinping و همکاران نتایج نشان داده شد که نانوذرات نقره (NPs) می‌توانند با افزایش غلظت، فعالیت ضدباکتریایی خود را به طور قابل‌توجهی افزایش دهند زیرا سمیت آن‌ها با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد که از این نظر با مطالعه حاضر همخوانی دارد (۲۱).

در مطالعه‌ای که توسط Shahoon و همکاران صورت گرفت، سمیت سلولی اشکال میله‌ای نانوذرات هیدروکسی آپاتیت بر سلول‌های فیبروبلاست در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های ۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ بررسی شد و نتایج نشان داد با افزایش زمان و غلظت، میانگین فعالیت حیاتی سلول‌ها کاهش یافت (۲۲) که با مطالعه ما همخوانی دارد.

مطابق مطالعه Movagharnia و همکاران کمترین میزان سمیت و کشندگی مربوط به غلظت ۳/۱۲۵ PPM و بیشترین آن مربوط به غلظت ۱۰۰ PPM است. در نتیجه در مورد اینکه با افزایش غلظت سمیت افزایش می‌یابد (۲۳) با مطالعه حاضر هم نظر است.

Liu و همکاران به بررسی اثرات سمی نانوذرات نقره با غلظت (۰/۰۰۵ تا ۲/۵) میکرولیتر بر میلی‌لیتر بر سلول‌های HEK۲۹۳ طبیعی در مقایسه با رده سلولی سرطانی HeLa پرداختند و نتیجه گرفتند که ۰/۴ میکروگرم در میلی لیتر حداقل مقدار IC۵۰ برای AgNP ها در میان رده‌های سلولی است که طبیعی در نظر گرفته می‌شوند (۲۴). در نتیجه همسو با مطالعه حاضر، افزایش غلظت نانوذرات، افزایش سمیت آن‌ها را در پی دارد.

همان طور که نتایج بالا نشان می‌دهد نانوذرات سنتز شده دارای اثرات متفاوتی می‌باشند. از آنجا که نانو ذرات نقره سطح به حجم بیشتری نسبت به اندازه‌های بزرگتر نقره دارند، بنابراین از نظر شیمیایی فعال‌تر بوده و به میزان بیشتری به فرم یونیزه آن تبدیل می‌شوند. نانو ذرات نقره می‌توانند با بافت‌های مختلف باند شده و اثرات سمی و مخرب به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن داشته باشند و باعث مرگ سلولی شوند. نقطه قوت مطالعه ما در انجام دقیق مطالعات آزمایشگاهی و استفاده از دستگاه‌های به روز و همچنین انجام تمام مراحل کنترلی بود که نتایج را معتبرتر می‌کند. نقطه ضعف این مطالعه گرانی بیش از حد وسایل و مواد مورد نظر بود که ما را مجبور نمود از حداقل حجم نمونه استفاده کنیم.

نظر به اینکه در محیط دهان، لایه‌های متفاوتی از سلول‌های همبندی، اپیتلیالی و سلول‌های سیستم ایمنی وجود دارد تحقیقات بیشتر مکانیسم دقیق روند تاثیر نانوذرات بر بافت‌های مختلف را روشن خواهد ساخت. با توجه به اینکه مطالعه حاضر یک مطالعه آزمایشگاهی می‌باشد و تست بر روی یک لایه سلولی کشت داده شده، انجام گرفت، لذا تعمیم نتایج این مطالعه به شرایط بالینی باید محتاطانه صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری و کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین تشکر و قدردانی می‌گردد.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.20]

References

1.Saafan A, Zaazou MH, Sallam MK, Mosallam O, El Danaf HA. Assessment of Photodynamic Therapy and Nanoparticles Effects on Caries Models. Open Access Maced J Med Sci. 2018;6(7):1289-95.

2.Schmalz G, Hickel R, van Landuyt KL, Reichl FX. Nanoparticles in dentistry. Dent Mater. 2017;33(11):1298-314.

3.Noronha VT, Paula AJ, Durán G, Galembeck A, Cogo-Müller K, Franz-Montan M, et al. Silver nanoparticles in dentistry. Dent Mater. 2017;33(10):1110-26.

4.Mirkin CA, Taton TA. Semiconductors meet biology. Nature. 2000;405(6787):626-7.

5.Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. Adv Colloid Interface Sci. 2009;145(1-2):83-96.

6.Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Appl Environ Microbiol. 2008;74(7):2171-8.

7.Petica A, Gavriliu S, Lungu M, Buruntea N, Panzaru C. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. Mater Sci Engineer B. 2008;152(1-3):22-7.

8.Pricop DA, Popescu CM, Tartau L, Creanga D. Study of silver nanoparticle interactions at the interface with biological tissues. Appl Surf Sci. 2023;621:156837.

9.Panacek A, Kvítek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizúrova N, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. J Phys Chem B. 2006;110(33):16248-53.

10.Ding Q, Cui J, Shen H, He C, Wang X, Shen SGF, et al. Advances of nanomaterial applications in oral and maxillofacial tissue regeneration and disease treatment. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2021;13(2):e1669.

11.Fernandez CC, Sokolonski AR, Fonseca MS, Stanisic D, Araújo DB, Azevedo V, et al. Applications of Silver Nanoparticles in Dentistry: Advances and Technological Innovation. Int J Mol Sci. 2021;22(5):2485.

12.Zimper U, Aaltonen J, Krauel-Goellner K, Gordon KC, Strachan CJ, Rades T. The Influence of Milling on the Dissolution Performance of Simvastatin. Pharmaceutics. 2010;2(4):419-31.

13.Tavares AM, Louro H, Antunes S, Quarré S, Simar S, De Temmerman PJ, et al. Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. Toxicol In Vitro. 2014;28(1):60-9.

14.Kandemir Demirci G, Çöven FO, Güneri P, Karavana SY, Nalbantsoy A, Köse T, et al. The solubility, pH value, chemical structure, radiopacity, and cytotoxicity of four different root canal sealers: an in vitro study. Clin Oral Investig. 2023;27(9):5413-25.

15.Bapat RA, Parolia A, Chaubal T, Dharamadhikari S, Abdulla AM, Sakkir N, et al. Recent update on potential cytotoxicity, biocompatibility and preventive measures of biomaterials used in dentistry. Biomater Sci. 2021;9(9):3244-83.

16.Satyavani K, Gurudeeban S, Ramanathan T, Balasubramanian T. Toxicity Study of Silver Nanoparticles Synthesized from Suaeda monoica on Hep-2 Cell Line. Avicenna J Med Biotechnol. 2012;4(1):35-9.

17.Paiva L, Fidalgo TKS, da Costa LP, Maia LC, Balan L, Anselme K, et al. Antibacterial properties and compressive strength of new one-step preparation silver nanoparticles in glass ionomer cements (NanoAg-GIC). J Dent. 2018;69:102-9.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.20]

18.Tunç T. Synthesis and characterization of silver nanoparticles loaded with carboplatin as a potential antimicrobial and cancer therapy. Cancer Nanotechnol. 2024;15(1):2.
19.Mohsenzadeh S, Nazarymoghaddam K. Evaluation of Cytotoxisity of Nanosilver Particles on Monocytes of White Blood Cells [Doctoral Dissertation]. Tehran, Iran: Dental Faculty of Shahed University of Medical Science; 2010.
20.Yen HJ, Hsu SH, Tsai CL. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. Small. 2009;5(13):1553-61.
21.Xinping L, Shengli L, Miaotao Z, Wenlong Z, Chuanghong L. Evaluations of Antibacterial Activity and Cytotoxicity on Ag Nanoparticles. Rare Metal Mat Eng. 2011;40(2):209-14.
22.Shahoon H, Hamedi R, Yadegari Z, Al Majd Hosseiny V, Golgounnia P, Amiri S. The Comparison of Silver and Hydroxyapatite Nanoparticles Biocompatibility on L929 Fibroblast Cells: An In vitro Study. J Nanomed Nanotechnol. 2013;4(4):1000173.
23.Movagharnia R, Baghbani-Arani F, Sadat Shandiz SA. Cytotoxicity effects of green synthesized silver nanoparticles on human colon cancer (HT29) cells. Feyz Med Sci J. 2018;22(1):31-8. [In Persian]
24.Liu X, Shan K, Shao X, Shi X, He Y, Liu Z, et al. Nanotoxic Effects of Silver Nanoparticles on Normal HEK-293 Cells in Comparison to Cancerous HeLa Cell Line. Int J Nanomedicine. 2021;16:753-61.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.20]