مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۳۹۸، دوره ۲۱، صفحه ۲۴۸-۲۴۲

ارزیابی سمیت نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز با عصاره آبی قارچ دنبلان بر روی رده سلولی سرطان پستان (MCF-7)

شهلا ندایی (MSc)[۱]، حسین اکبری (PhD) [۲*]، هاشم یعقوبی (PhD)[۱]

۱-گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران
۲-گروه فیزیک، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

دریافت: ۹۷/۶/۵، اصلاح: ۹۷/۹/۱۳، پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۹

خلاصه

سابقه و هدف: نانوذرات نقره دارای فعالیت ضدباکتری و ضد سرطان می‌باشد. اما حلال‌های آلی مورد استفاده برای تولید این نانوذرات سمی هستند و می توانند اثرات زیست محیطی مخربی داشته باشند. از این رو تمایل زیادی برای استفاده از روش های سالم برای سنتز نانوذرات نقره وجود دارد. لذا این مطالعه به منظور سنتز نانو ذرات نقره به روش زیستی از عصاره آبی قارچ دنبلان و بررسی اثرات بیولوژیکی آن بر روی سلول‌های سرطانی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی جهت سنتز نانوذرات نقره از عصاره آبی قارچ دنبلان ۱۰ میلی لیتر از عصاره قارچ به ۹۰ میلی لیتر محلول نیترات نقره ۱ میلی لیتر اضافه و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق سنتز شد. خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات سنتز شده با دستگاه‌هایXRD، FESEM و TEMمورد آنالیز و بررسی قرار گرفتند. اثرات عصاره و نانو ذرات سنتز شده با روش MTT با غلظت های ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر سلول‌های سرطانی رده MCF-7 در زمان‌های ۷۲و۴۸و۲۴ ساعت بررسی شد.

یافته‌ها: اندازه نانو ذرات بین ۱۹ تا ۳۵ نانومتر و شکل آنها به طور عمده کروی شکل بود. در سنجش سمیت سلولی با روش MTT میزان IC50 محاسبه شده برای نانو ذرات نقره و عصاره در سلولهای MCF-7 نشان داد که نانو ذرات نقره نسبت به عصاره اثرات سمیت سلولی بیشتر دارد. IC50 محاسبه شده برای عصاره و نانوذرات در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۰/۷۳، ۰/۸ و ۰/۶۴ میلی گرم بر میلی لیتر و برای نانوذرات به ترتیب ۰/۶، ۰/۵۶و ۰/۴۸ بدست آمد ($p<0/05$).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که نانو ذرات نقره تولید شده به روش سبز دارای سمیت سلولی بیشتری نسبت به عصاره آبی قارچ دنبلان است.

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات نقره، قارچ دنبلان، سنتز زیستی، MTT، سرطان سینه.

مقدمه

سرطان یک بیماری مهلک با مرگ و میر بالاست که درگیری های روانی و اقتصادی زیادی به دنبال دارد. نحوه زندگی و عوامل محیطی، از فاکتورهای مهم و مؤثر در بروز سرطان است(۱). با وجود درمان های مختلف مانند شیمی درمانی، ایمنی درمانی و رادیوتراپی، سرطان هنوز به عنوان یک چالش مهم مطرح است. بنابراین توسعه روش های مؤثر، زیست سازگار و کم هزینه برای درمان سرطان ضروری می باشد(۲). در حال حاضر اعتقاد بر این است که نانوذرات نقره می توانند به عنوان یک عامل درمانی، علاوه بر استفاده در مبارزه با باکتری ها و اثر روی بهبود زخم، برای مبارزه با ایدز، ویروس ها و به خصوص سرطان نیز به کار برده شوند (۳)، اما حلال‌های آلی مورد استفاده برای تولید این نانوذرات سمی هستند و می توانند اثرات زیست محیطی مخربی داشته باشند. از این رو تمایل زیادی برای استفاده از روش های سالم برای سنتز نانوذرات نقره وجود دارد (۴). یکی از روش‌های تولید نانوذرات، تولید به روش زیستی است و توجه به این روش برای تولید نانوذرات رو به افزایش می باشد. موادی مانند گیاهان، جلبک ها، قارچ ها، مخمرها، باکتری‌ها و ویروس‌ها در تولید زیستی نانوذرات کاربرد دارند(۵). بیشتر قارچ هایی که تولید اندام با رده زیرزمینی می کنند از دسته آسکومیست ها بوده و تحت عنوان دنبلان *Truffle* شناسایی و معرفی می شوند. در این قارچ بیش از ۱۵ نوع پروتئین، گالیک اسید، کاتچین، فلاونوئید، تانین و برخی ترکیبات دیگر از جمله بتاکاروتن و لینولئیک اسید شناسایی شده است. از خواص دارویی این قارچ بسیار ارزشمند می توان به درمان سرطان معده، هپاتیت A، B، C، نفریت، آرتروز، دردهای عصبی، بی خوابی، برونشیت، آسم، زخم معده، فشار خون و کلسترول بالا اشاره نمود(۶و۷). Al-Laith جهت بررسی اجزای آنتی اکسیدانی/آنتی رادیکالی قارچ خوراکی دنبلان بیابان تهیه شده از بحرین، ایران، مراکش و عربستان مشخص شد که قارچ ایران بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارد(۸). Zabihi و همکاران اثر عصاره هیدروالکلی قارچ دنبلان بر سطح هورمون استروژن و پروژسترون در

▣ این مقاله حاصل از پایان نامه شهلا ندایی دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل می باشد.
* مسئول مقاله: دکتر حسین اکبری
آدرس: اردبیل، میدان بسیج، مجتمع دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، گروه فیزیک. تلفن: ۰۴۵-۳۳۷۲۲۰۲۱
E-mail: yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.38.3]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.242]

مدل تجربی مالتیپل اسکلروزیس موش صحرایی ماده را مورد مطالعه قرار داده و نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی دنبلان میزان استروژن و پروژسترون را در موشهای مدل تجربی مولتیپل اسکلروزیس افزایش می‌دهد (۹).

نانوذرات با افزایش اثر بخشی درمانی و کاهش سمیت ناخواسته ی دارو های ضدسرطانی مورد توجه قرار گرفته اند و با توجه به اینکه در سنتز نانوذرات روش های شیمیایی و فیزیکی به طور کلی گران، زمان بر و برای محیط زیست خطرناک است استفاده از قارچ ها، باکتری ها، گیاهان و جلبک ها (به عنوان واسطی در سنتز نانوذرات از ترکیبات معدنی) می تواند روش دیگر در کنار روش های شیمیایی و فیزیکی برای تولید نانوذرات باشد. تولید زیستی نانوذرات، ریسک خطر پذیری برای انسان، هوا و در مجموع اکوسیستم را پایین می‌آورد (۱۱و۱۰). این مطالعه به منظور سنتز آبی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره قارچ دنبلان درمدت زمان ۷۲ ساعت و بررسی فعالیت ضد سرطانی آن بر روی سلول های سرطانی پستان MCF-7 با روش MTT انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره آبی از قارچ (*Tuber spp.*): این مطالعه تجربی کاربردی از فروردین تا شهریور ماه سال ۱۳۹۶ انجام گرفت. بدین منظور قارچ دنبلان(*Tuber spp.*) از شهر مشگین استان اردبیل(از جهاد کشاورزی استان) تهیه شد. سپس با آب مقطر به خوبی شستشو و به قطعات ریز خرد و در محیط تاریک قرار داده شد تا به طور کامل خشک شوند. جهت تهیه عصاره آبی از قارچ دنبلان، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر شده به ۱۰۰ گرم قارچ اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. عصاره آبی حاصل پس از سرد شدن توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ تخلیص و در یخچال نگهداری شد.

سنتز نانوذرات نقره از عصاره قارچ (*Tuber spp.*): جهت سنتز نانوذرات نقره از عصاره آبی قارچ دنبلان، میزان ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره آبی قارچ دنبلان به ۹۰ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره ۱ میلی‌مولار اضافه شد سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق و بر روی شیکر (دور ۲۰۰ rpm) نگهداری شد. میزان جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومترUV2550 ساخت کشور ژاپن در محدوده ۷۰۰-۳۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات حاصل توسط سانتریفیوژ (دورrpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) جداسازی شده و پس از خشک شدن در دمای اتاق، درون ظرف شیشه‌ای در بسته قرار گرفتند و تا زمان استفاده در تاریکی نگهداری شدند.

تعیین ویژگی فیزیکوشیمیایی نانوذارات نقره: به منظور تعیین اندازه، خواص ساختاری، خواص اپتیکی، مورفولوژی و ریخت شناسی نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره قارچ دنبلان(*Tuber spp.*)، بترتیب از دستگاه‌های پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی (FESEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) استفاده گردید. همچنین ثابت‌های کریستالی نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه پراش سنج پودری اشعه ایکس (XRD) مدل Philips X'pert Pro ساخت کشور هلند و جهت بررسی مرفولوژی، اندازه و همچنین توزیع پراکندگی نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره قارچ دنبلان، به ترتیب از میکروسکوپ الکترونی عبوری (LEO-912AB) ساخت کشور انگلستان و میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی (Mira-Xmu ساخت کشور چک) استفاده گردید.

بررسی اثر عصاره آبی و نانوذرات حاصل از قارچ دنبلان بر کشندگی سلول‌های MCF-7: رده سلولی سرطان سینه (MCF_7) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ ٪ سرم جنین گاوی (FBS) و۱٪ آنتی بیوتیک (Pen/Strep) کشت داده شده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۵ ٪ و CO_2 ۵ ٪ نگهداری شدند. پس از رشد سلول های MCF-7، سلول‌ها توسط EDTA-Trypsin از کف فلاسک جداسازی شده و با تراکم ۷×۱۰^{۳} بر میلی‌لیتر، سوسپانسیون شدند سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل بر هرکدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با شرایط فوق‌الذکر نگهداری شدند تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. سپس هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه به طور جداگانه با مقدار متفاوتی از عصاره آبی و نانوذرات نقره حاصل از قارچ دنبلان (۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) تیمار شدند و در مدت زمان‌های متفاوت (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ ٪ و CO_2 ۵ ٪ نگهداری شدند بعد از سپری شدن زمان تیمار، محیط کشت رویی سلول‌ها خارج شده و به هر چاهک ۱۸۰ میلی لیتر محیط کشت بدون FBS به همراه ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد. سپس پلیت‌ها در انکوباتور با شرایط فوق‌الذکر نگهداری شدند.

پس از چهار ساعت انکوباسیون، محیط کشت هر کدام از چاهک‌ها تخلیه شد و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید. به منظور محاسبه درصد زنده‌مانی سلول‌ها، ۱۰ دقیقه پس از تیمار سلول‌ها توسط DMSO، جذب هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه توسط دستگاه الایزاریدر و در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این آزمون از محلول DMSO به عنوان بلانک و سلول‌های بدون تیمار با عصاره آبی و نانوذرات حاصل از گیاه دنبلان، به عنوان گروه کنترل استفاده شد. درصد سلول‌های زنده با استفاده از معادله زیر برای هر ردیف محاسبه شد:

$$\text{درصد زنده مانی سلولها} = \frac{\text{میانگین جذب نوری سلولهای تیمار شده}}{\text{میانگین جذب نوری سلولهای شاهد}} \times ۱۰۰$$

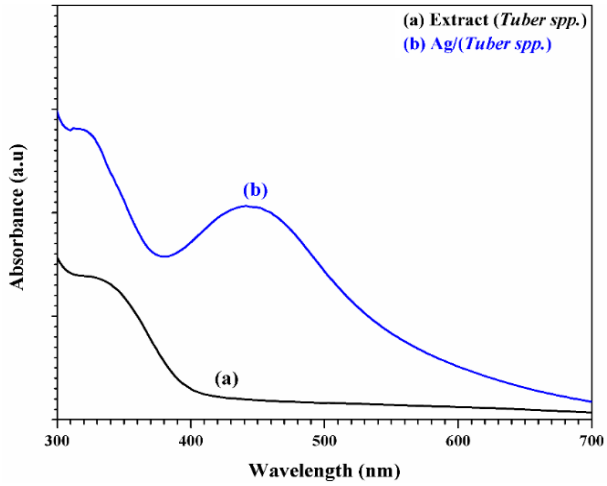
به منظور تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از این تحقیق از نرم افزار SPSS۲۲ و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و از آزمون Tukey استفاده گردید. تمامی تست‌ها حداقل در سه تکرار انجام شد و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

سنتز و طیف سنجی ماوراءبنفش مرئی نانو ذرات: پس از انجام سنتز زیستی، محلول حاصل از زرد کمرنگ به قهوه‌ای روشن تغییر رنگ داد. باتوجه به اینکه یکی از نشانه‌های احیای یون‌های نقره در فرآیند تولید نانوذرات نقره، تغییر رنگ آن به قهوه‌ای روشن می‌باشد، علاوه براین محنی های حاصل از طیف‌سنجی

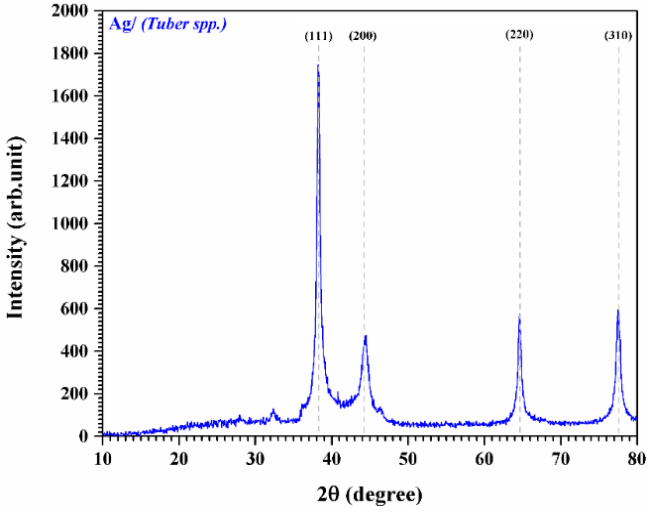
[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.38.3]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.242]

اسپکتروفتومتری توسط دستگاه UV-Vis از عصاره آبی و نانوذرات حاصل از قارچ دنبلان پیک نسبتا قوی در محدوده ۴۰۰ الی ۴۵۰ نانومتر تشکیل شد (شکل ۱).



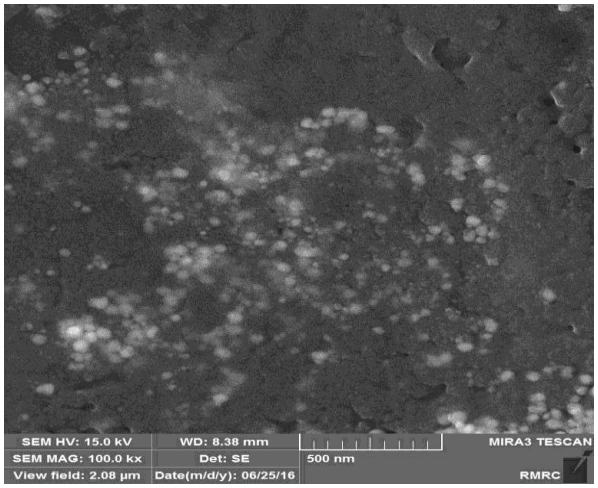
شکل ۱. جذب اسپکتروفتومتری (UV-Vis) a)عصاره، (b)نانوذرات نقره

بررسی نانوذرات نقره توسط طیف XRD: طیف پراش پرتو اشعه ایکس نانوذرات سنتز شده در زمان ۷۲ ساعت نشان داد که پیک های مشاهده شده در زوایای ۳۸/۲۲ درجه، ۴۴/۱۹، ۶۴/۶۰ و ۷۷/۵۱ درجه به ترتیب مطابق با صفحات کریستالی (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۰) می باشند که این نتایج منطبق بر طیف استاندارد بالک نقره بودند (شکل ۲).

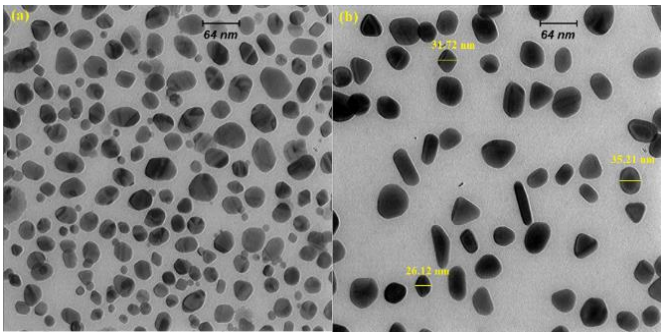


شکل ۲. الگوی پراش اشعه ایکس XRD از نانوذرات نقره سنتز شده در مدت زمان ۷۲ساعت از عصاره قارچ دنبلان(*Tuber spp.*)

بررسی خصوصیات مرفولوژیکی نانوذرات نقره توسط میکروسکوپ‌های الکترونی FESEM و TEM: تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) نانوذرات نقره حاصل از عصاره آبی قارچ دنبلان از ساختار کروی و یکنواختی نسبتا بالایی برخوردار بودند (شکل ۳). در تصویربرداری نانوذرات نقره توسط میکروسکوپ TEM علاوه بر ساختار کروی مقدار کمی از نانوذرات در اشکال مثلثی، بیضوی و میله‌ای نیز مشاهده شدند. نتایج حاصل از بررسی اندازه نانوذرات نقره توسط میکروسکوپ الکترونی TEM نشان داد، اکثر نانوذرات حاصل دارای اندازه‌ای در محدوده ۲۶ تا ۳۵ نانومتر بودند (شکل ۴).



شکل ۳. تصاویر FESEM نانوذرات سنتز شده از عصاره آبی (*Tuber spp.*)

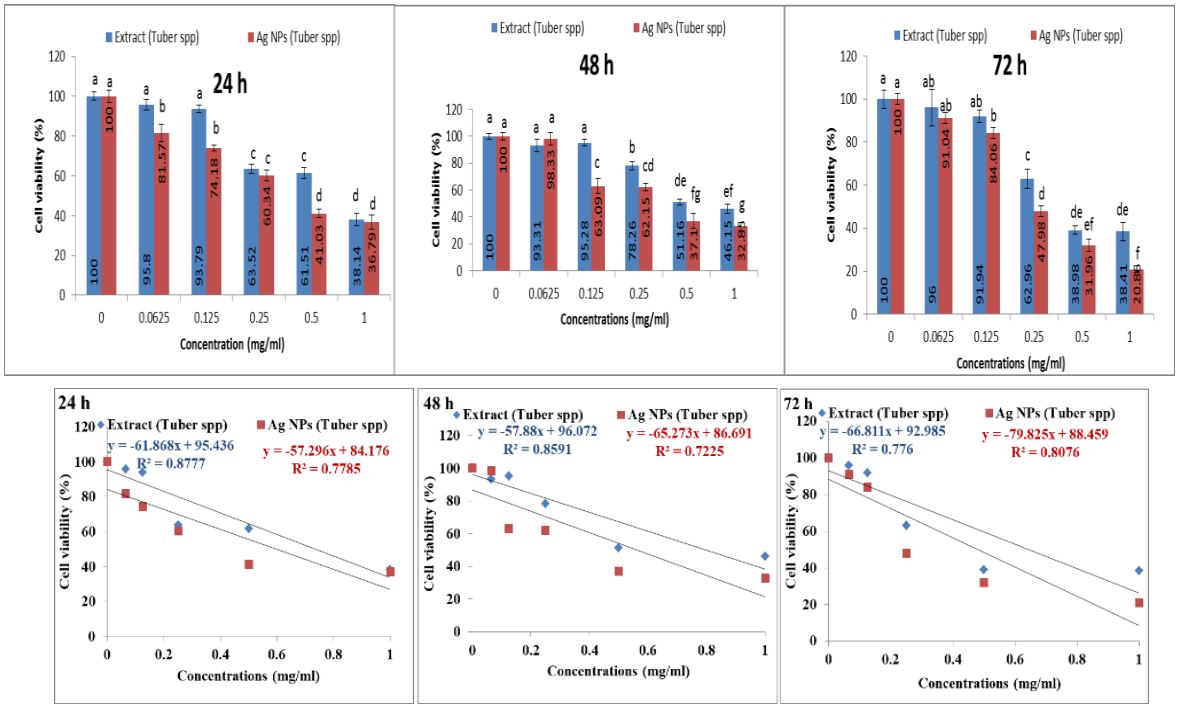


شکل ۴. a, b) تصاویر TEM نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی (*Tuber spp.*)

بررسی تاثیر نانوذرات نقره و عصاره آبی حاصل از قارچ دنبلان بر کشندگی سلول‌های MCF-7: نتایج حاصل نشان داد بین افزایش غلظت هر کدام از تیمارهای با غلظت‌های متفاوت نانوذرات نقره و عصاره آبی حاصل از قارچ دنبلان و درصد کشندگی سلول‌های MCF-7 رابطه خطی و معنی‌داری وجود دارد، به نحوی که با افزایش غلظت هرکدام از تیمارهای فوق‌الذکر، درصد کشندگی سلول-های MCF-7 افزایش یافت (نمودار۱). بطوریکه با افزایش غلظت نانوذرات و عصاره آبی حاصل از قارچ دنبلان از ۰/۰۶۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس از ۴۸ ساعت تیمار با سلول‌های MCF-7، میزان زنده‌مانی سلول به ترتیب ۶۵ و ۴۸ درصد کاهش یافت. همچنین این نتایج نشان داد نانوذرات نقره حاصل از عصاره آبی قارچ دنبلان، تاثیر کشندگی بالاتری بر سلول‌های سرطانی MCF-7 در مقایسه با عصاره آبی قارچ گیاه دنبلان دارد به گونه ای که در نسبت وزنی برابر با ۰/۱۲۵ و در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت، درصد زنده‌مانی در سلول‌های MCF-7 پس از تیمار با عصاره آبی و نانوذرات نقره حاصل از قارچ دنبلان به

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.38.3]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.242]

ترتیب برابر با ۶۳ و ۹۵ درصد بود. ره حاصل از قارچ دنبلان جهت کشندگی ۵۰ درصد از سلول‌های MCF-7 (IC50)، روند مشابهی را نشان داد. میزان IC50 بدست آمده از نانوذرات نقره حاصل از عصاره آبی قارچ دنبلان به طور معنی‌داری پایین تر از عصاره آبی قارچ گیاه دنبلان بود. به عنوان مثال میزان IC50 برای عصاره آبی قارچ دنبلان در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با ۰/۷۳، ۰/۸ و ۰/۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود در صورتی که این میزان برای نانوذرات نقره حاصل از عصاره آبی قارچ دنبلان به ترتیب برابر با ۰/۶، ۰/۵۶ و ۰/۴۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود(جدول ۱).



نمودار ۱. مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های متفاوت عصاره آبی و نانوذرات حاصل از قارچ دنبلان بر زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و میانگین زنده مانی سلول های MCF-7 (تمامی تیمارها در ۳ تکرار انجام شد، حرف کوچک غیر مشترک نشان دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد)

جدول ۱. مقدار IC50 محاسبه شده در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی سلول های MCF-7

Time / Variable	24 h (mg/ml)	48 h (mg/ml)	72 h (mg/ml)
Extract (Tuber spp)	۰/۷۳	۰/۸	۰/۶۴
Ag NPs (Tuber spp)	۰/۶	۰/۵۶	۰/۴۸

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص شد که عصاره قارچ دنبلان قادر به احیای یون Ag^{+} به نانو ذرات نقره می باشد. همچنین نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی دارای سمیت سلولی بیشتری بر روی سلول‌های سرطانی رده MCF-7 هستند. Shankar و همکاران تولید نانوذرات نقره توسط گیاه *Azadirachta indica* را انجام داده اند. این گروه اندازه نانوذرات را بین ۵ تا ۳۵ نانومتر و شکل آن ها را کروی گزارش کردند(۱۲). Sankar و همکارانش نانوذرات نقره را به روش زیستی از عصاره نوعی مرزنجوش به نام *Origanum vulgare* سنتز کردند. پس از عصاره گیری از گیاه، محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار را با نسبت ۱ به ۹ با عصاره ترکیب نموده و پس از ۱۵ دقیقه تغییر رنگ مشاهده شد و آنالیز UV-vis، یک پیک جذبی در ۴۴۰ نانومتر را نشان داد. اندازه و شکل نانوذرات با استفاده از دستگاه SEM حدود ۸۵-۶۳ نانومتر و کروی تعیین شد(۱۳). تغییر رنگ مشاهده شده از زرد به قهوه ای پررنگ نشان دهنده احیای یون‌های نقره و تشکیل نانوذرات بود که اولین نشانه از تولید نانوذرات نقره محسوب می شود که این تغییر رنگ ناشی از ارتعاشات پلاسمون سطحی در نانوذرات است. نتایج نشان داد که λ_{max} در حدود ۴۵۰ نانومتر است که با نتایج سایر محققین هم خوانی دارد (۱۵و۱۴). سایز کریستالی نانوذرات نقره از رابطه شرر $D=\frac{k\lambda}{\beta cose\ \theta}$ به دست می‌آید که اندازه کریستالی نانوذرات برابر با ۲۵ نانومتر است. که این یافته با نتایج حاصل از پژوهش سایر محققین هم خوانی دارد(۱۵). تصاویر میکروسکوپ الکترون روبشی گسیل میدانی نانوذرات نقره سنتز شده نشان داد که شکل نانوذرات کاملا کروی بوده و توزیع نانوذرات نیز یکنواخت می باشد. اندازه تقریبی نانوذرات ۷۲ ساعت حدود ۲۶/۸ نانومتر می باشد. تصویر TEM نشان داد که نانوذرات به طور عمده کروی شکل است اما اشکال دیگر مانند مثلثی هم در تصویر مشاهده می شود و اندازه آن ها بین ۲۶ تا ۳۵ نانومتر است. البته تغییرات دما و pH و مدت زمان و غلظت های مختلف

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.38.3]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.242]

بر هم کنش محلول نمکی و عصاره مورد نظر می تواند بر روی دامنه تغییرات اندازه نانو ذرات تاثیر داشته باشد(۱۳). نتایج بررسی های حاصل از آزمون MTT نشان داد که با افزایش مدت زمان تیمار به ۷۲ ساعت اثرات سمیت سلولی بیشتر شده است. به طور کلی می توان گفت که نانوذرات می توانند به صورت وابسته به غلظت و زمان منجر به کاهش زیست پذیری سلول ها شوند. شکل نانوذرات بر میزان سطح تماس و رهایش یون نقره اثر گذار خواهد بود. از آن جا که تمایل پروتئین ها برای پیوستن به لبه های نوک تیز بیشتر است، از این رو تمایل به چسبندگی به ذرات مکعبی یا مثلثی بیشتر خواهد بود (۱۶). در مطالعه ای Devi و همکاران سنتز نانوذرات نقره از طریق احیای گیاهی *Ulva lactuca* با سایز بین ۲۰ تا ۵۶ نانومتر را ارائه نمودند و اثرات ضدسرطانی آن روی رده های MCF-7، HT29، HepG2 و سلول نرمال را نشان دادند. در تحقیق آنها اثرات سمیت بیشتر با مقدار IC50 ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر در ۲۴ ساعت تیمار در مورد رده سلولی سرطان کبد نسبت به رده های دیگر و رده سلول نرمال مشاهده شد(۱۷). در نانوذرات نقره سنتز شده در این پژوهش، شکل مثلثی هم مشاهده می شود که می تواند یکی از دلایل کشندگی این نانوذرات باشد. مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل فعال سازی رویدادهای پروآپتوتیک اندامک میتوکندری در سلول باشد که با آزادسازی 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 (۱۹و۱۸). بنابراین با توجه به میزان فعالیت بالای میتوکندری در فرآیند تنفس سلول‌های سرطانی نسبت به سلول های طبیعی، بستر مناسبی برای عنصر نقره جهت تخریب سلول‌های سرطانی فراهم می شود. نتایج نشان داد عصاره قارچ دنبلان قادر به احیای یون Ag^{+} به نانو ذرات نقره می باشد. همچنین نانو ذرات نقره تولید شده به روش سبز سمیت سلولی بیشتری نسبت به عصاره قارچ دارد، این اثر از مکانیسمی پیش می رود که مانع پیشرفت چرخه سلولی از G_1 به مرحله S و افزایش مرگ سلولی و آپوپتوز در سلول‌های MCF7 می‌شود، در ضمن نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی می‌تواند به عنوان راهکاری مناسب در درمان سرطان استفاده شود ولی نیاز به انجام کارهای تکمیلی و تحقیقاتی زیادی است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل و همچنین از زحمات همکاران مرکز تحقیقات سلول های بنیادی دانشگاه جهت همکاری در این تحقیق، تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.38.3]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.242]

Cytotoxicity Effects of Green Synthesized Silver Nanoparticles by Using the Extract of Tuber Spp. on Breast Cancer (MCF-7) Cells

Sh. Nedaei (MSc)[1], H. Akbari (PhD) *[2], H. Yaghoubi (PhD)[1]

1.Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, I.R.Iran
2.Department of Physics, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 242-48
Received: Aug 27th 2018, Revised: Dec 4th 2018, Accepted: Jan 9th 2019.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Silver nanoparticles have antibacterial and anticancer activity. But the organic solvents used to produce these nanoparticles are toxic and can have devastating environmental effects. Therefore, there is a strong desire to use healthy methods for the synthesis of silver nanoparticles. Therefore, this study was performed to synthesize silver nanoparticles biologically from aqueous extract of Truffle and to study their biological effects on cancer cells.

METHODS: In this experimental study, to synthesize silver nanoparticles from aqueous extract of Truffle, 10 ml of fungus extract was added to 90 ml of 1 ml silver nitrate solution and incubated for 72 hours at room temperature. The physicochemical properties of the nanoparticles synthesized by XRD, FESEM and TEM were analyzed. Effects of Extract and Synthesized Nanoparticles were studied by MTT at concentrations of 0.025, 0.25, 0.25, 0.5 and 1 mg / ml on MCF-7 Cancer Cells at 72, 48, and 24 hours.

FINDINGS: The size of the nanoparticles was between 19 and 35 nm and their shape was mainly spherical. In cytotoxicity assay using MTT assay IC50 calculated for silver nanoparticles and extract in MCF-7 cells showed that silver nanoparticles had more cytotoxic effects than extract. The calculated IC50 for extracts and nanoparticles at 24, 48 and 72 hours were 0.73, 0.8, and 0.64 mg / ml, respectively, and for the nanoparticles were 0.6, 0.5, and 0.48, respectively ($p < 0.05$).

CONCLUSION: The silver nanoparticles produced by bio-synthesis method have a higher cytotoxicity than the truffle fungus *(Tuber spp.)* extract.

KEY WORDS: *Silver Nanoparticles, Truffle Fungus(Tuber spp.), Bio-synthesis, MTT, MCF-7 Cell Line*.

Please cite this article as follows:
Nedaei Sh, Akbari H, Yaghoubi H. Cytotoxicity Effects of Green Synthesized Silver Nanoparticles by Using the Extract of Tuber Spp. on Breast Cancer (MCF-7) Cells. J Babol Univ Med Sci. 2019;21:242-48.

*** Corresponding Author: H. Akbari (PhD)**
Address: Department of Physics, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Basij Sq., Ardabil, I.R.Iran
Tel: +98 45 33722021
E-mail: yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.38.3]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.242]

References

1.Wu S, Powers S, Zhu W, Hannun YA. Subtantial cantributian of extrinsisrisk factors to cancer development. Nature. 2016; 529(7584): 43-7.

2. El kassas HY, Attia AA. Bactericidal application and cytotoxic activity of biosynthesized silver nanoparticles with an extract of the red seaweed pterocladiella capillacea on the Hep G2 cell line. Asian Pal J Cancer Prev. 2014; 15(3): 1299-306.

3.Hekmat A, Saboury AA, Divsalar A. The effects of silver nanoparticles and doxorubicin combination on DNA structure and its antiproliferative effect against T47D and MCF-7 cell line. J Biomed Nanotechnol. 2012; 8(6):968-82.

4.Jeyaraj M, Sathishkumar G, Sivanadhan G, Mubarak Ali D, Rajesh M, Arun R, et al. Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment on experimental report. Colloids Surf B Biointerfaces. 2013; 106: 86-92.

5.Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine. 2010; 6(2): 257-62.

6.Slama A, Neffati M, Boudabous A. Biochemical composition of truffle Terfezia boudieri chatin. Acta Hort. 2010; 853: 285-90.

7.Dundar A, Yesil OF, Acay H, Okumus V, Ozdemir S, Yildiz A. Antioxdant properties, chemical composition and nutritional value of Terfezia boudieri (chatin) from Turkey. Food Sci Technol Int. 2012; 18(4): 317-28.

8.Al-Laith AAA. Antionidant compaoents and antionidant/ antiradical activities of desert truffle (tirmania nivea) from various Middle Easternorigins. J Food Compos Analys. 2010; 23(1): 15-22.

9.Zabihi E, Motavallibashi SE, Bamdad Kh, Pilevaribadi F, Sheikhkanloui Milan H. The effect of hydroalcoholic extract of truffle on estrogen and progesterone levels in experimental model of multiple sclerosis (ms) in female rats. Arak Med Univ J. 2017; 20(3): 48-56. [In Persian]

10. Salehi S, Shandiz SA, Ghanbar F, Darvish MR, Ardestani MS, Mirzaie A, et al. Phyto-synthesis of silver nanoparticles using Artemisia marschalliana Sprengel aerial parts extract and assessment of their antioxidant, anticancer, and antibacterial properties. Int J Nanomdicine. 2016; (11): 1835-46.

11.Singh H, Du J, Yi TH. Green and rapid synthesis of silver nanoparticles using Borago officinalis leaf extract: anticancer and antibacterial activities. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2016; 45(7): 1310-6

12.Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry M. Rapid synthesis of Au, Ag and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (Azadirachta indica) leaf broth. J Colloid Interface Sci. 2004; 275(2): 496-502.

13.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; 1(108): 80-4.

14.Patil MP, Kim GD. Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. Appl Microbiol Bio-technol. 2017; 101(1): 79-92.

15.Aboelfetoh EF, El-Shenody RA, Ghobara MM. Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using green algae (Caulerpa serrulata): reaction optim-ization, catalytic and antibacterial activities. Environ Monit Assess. 2017; 189(7): 349.

16. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnol Adv. 2009; 27(1): 76-83.

17. Devi SJ, Bhimba BV. Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized by the seaweed ulva lactuca invitro. Sci Rep. 2012; 1(4):1-5.

18. Khatami M, Kharazi S, Kishani Farahani Z, Azizi H, Augusto Lima Nobre M. The anti-cancer effect of octagon and spherical silver nanoparticles on MCF-7 breast cancer cell line. Tehran Univ Med J. 2017; 75 (1):72-6. [In Persian]

19. Riaz Ahmed KB, Nagy AM, Brown RP, Zhang Q, Malghan SG. Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. Toxicol In Vitro. 2017; 38: 179-92.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1398.21.1.38.3]
[DOI: 10.22088/jbums.21.1.242]