



Research Article

Evaluation of Anti-oxidant and Anti-cancer Properties of Silver Nanoparticles Synthesized by Apigenin toward Breast Cancer MCF-7 Cell Line

Mahsa Zarei ¹, Ali Es-haghi ^{2*}, Ehsan Karimi ³

¹ Graduate Student of Biochemistry, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

² Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

³ Assistant Professor of Biotechnology, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

* **Corresponding author:** Ali Es-haghi, Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran. E-mail: eshaghi5510@mshdiau.ac.ir

DOI: [10.21859/nkjmd-110302](https://doi.org/10.21859/nkjmd-110302)

How to Cite this Article:

Zarei M, Es-haghi A, Karimi E. Evaluation of Anti-oxidant and Anti-cancer Properties of Silver Nanoparticles Synthesized by Apigenin toward Breast Cancer MCF-7 Cell Line. *J North Khorasan Univ Med Sci.* 2019; **11**(3):5-13. DOI: 10.21859/nkjmd-110302

Received: 16 Jan 2019

Accepted: 01 Jun 2019

Keywords:

Silver Nanoparticle
Apigenin
Antioxidant
Anti-cancer

Abstract

Introduction: Cancer is one of the most common diseases in the modern societies, which results from the non-stop growth of cells in the body. Due to the advancement of nanobiotechnology, highly effective herbal metabolites can be used to treat cancer. Apigenin is a natural flavonoid that is found in abundance in fruits, vegetables and herbs. The purpose of this study was to investigate the antioxidant and anti-cancer properties of silver nanoparticles synthesized by apigenin on MCF-7 cell line.

Methods: In this study, silver nanoparticles were synthesized using apigenin. Antioxidant effects of synthesized nanoparticle were evaluated using ABTS and DPPH assays. The cytotoxicity effects of silver nanoparticles were evaluated by MTT assay towards breast cancer cells.

Results: The obtained results showed that the silver nanoparticles synthesized using apigenin had a significant effect on scavenging free radicals. Also, these nanoparticles had a cytotoxicity property towards MCF-7 cells and reduced the survival of cancer cells in a dose-dependent manner.

Conclusions: Based on our results, silver nanoparticles synthesized using apigenin have cytotoxicity as well as antioxidant properties towards MCF-7 cancer cells and can be proposed as a suitable nanoparticle in the field of pharmacy and medicine.



بررسی خاصیت آنتی کسیدانی و ضد سرطانی نانوذره نقره سنتز شده به وسیله آپیژنین بر علیه

سلولهای سرطان پستان رده MCF-7

مهسا زارعی^۱، علی اسحاقی^{۲*}، احسان کریمی^۳

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران
^۲ استادیار بیوشیمی و عضو هیات علمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
^۳ استادیار بیوتکنولوژی و عضو هیات علمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
 * نویسنده مسئول: علی اسحاقی، استادیار بیوشیمی و عضو هیات علمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. ایمیل: eshaghi5510@mshdiau.ac.ir

DOI: 10.21859/nkjms-110302

چکیده	تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۶
مقدمه: سرطان یکی از بیماری‌های شایع در جوامع امروزی است که در نتیجه رشد بدون توقف سلول‌های بدن ایجاد می‌شود. با توجه به پیشرفت علم نانوبیوتکنولوژی می‌توان از مواد مؤثره گیاهی در اندازه بسیار ریز در درمان انواع سرطان استفاده نمود. آپیژنین یک فلاونوئید طبیعی است که به فراوانی در بسیاری از میوه‌ها، سبزیجات و گیاهان یافت می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی ویژگی‌های آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی نانوذره نقره سنتز شده به کمک آپیژنین می‌باشد.	تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۱۱
روش کار: در این پژوهش ابتدا نانوذرات نقره با استفاده از آپیژنین سنتز شد. سپس، اثرات آنتی اکسیدانی آن با استفاده از روش‌های ABTS و DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. اثرات ضد سرطانی نانوذره بر روی سلول‌های سرطانی پستان به وسیله روش MTT بررسی شد.	واژگان کلیدی: نانوذره نقره آپیژنین آنتی‌اکسیدان ضد سرطانی
یافته‌ها: نتایج حاصل از فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذره نقره سنتز شده به کمک آپیژنین نشان داد که این نانوذره تأثیر معنی داری بر حذف رادیکال‌های آزاد دارد. همچنین نانوذره نقره سنتز شده دارای خاصیت سلول کشی بر علیه سلول‌های MCF-7 بود و میزان بقای سلول‌های سرطانی را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش داد.	
نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان می‌دهد که نانوذره نقره سنتز شده به کمک ماده مؤثره آپیژنین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی مناسب می‌باشد. همچنین قادر است در غلظت پایین سلول‌های سرطانی را از بین ببرد و در غلظتی مشابه بر سلول نرمال سمیت نداشته باشد که همین امر این نانوذره را کاندیدی مناسب جهت استفاده در علوم پزشکی و داروسازی قرار می‌دهد.	

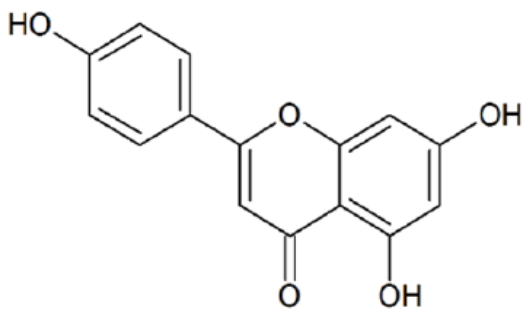
مقدمه

موارد سرطان ثبت شده در سال ۱۳۸۶، میزان شیوع این بیماری به رتبه نخست ارتقا یافته است. بر اساس آمار سازمان جهانی، سرطان پستان در سال ۲۰۱۲ با متوسط سنی ۲۸ سال و یک در صد هزار نفر از جمله مهمترین سرطان در جمعیت زنان ایرانی گزارش شده است [۵].

گیاهان دارویی اهمیت فراوانی در جوامع مختلف دارند. در همین راستا استفاده از بعضی گیاهان دارویی به صورت سنتی در بین مردم رواج دارد. به همین دلیل تحقیقات گسترده‌ای در خصوص اهمیت و خواص گیاهان دارویی و یافتن فرآورده‌های دارویی از آنها در حال انجام می‌باشد [۶]. در سال‌های اخیر، استفاده از گیاهان دارویی به دلیل ارزان بودن و اثرات جانبی کمتر رو به افزایش است. تولید بیشتر گیاهان دارویی در بخش کشاورزی به دلیل ایجاد فرصت‌های مناسب سرمایه گذاری حائز اهمیت بوده و لازم است که در این زمینه تحقیقات گسترده‌تری به خصوص در ایران رواج پیدا کند [۷]. گیاهان دارویی

سرطان گروه گسترده‌ای از بیماری‌های غیر مسری و مزمنی را شامل می‌شود که می‌تواند در هر فرد با هر گروه سنی بروز پیدا کند. این بیماری، به عنوان یکی از مشکلات عدیده‌ای به شمار می‌رود که سلامتی را به خطر می‌اندازد و سلامت روانی و جسمی جامعه را دچار مشکل می‌کند [۱]. شایع‌ترین سرطان‌ها در جوامع انسانی شامل سرطان ریه، معده، روده و کبد می‌باشند. در خانم‌ها سرطان پستان، در آقایان سرطان پروستات و در کودکان سرطان‌های خون، مغز و غدد لنفاوی بیشترین مبتلایان را دارد [۲]. سرطان پستان یک مسئله بزرگ برای زنان در سراسر جهان است. در کشور ما سالانه بیش از ۵۰۲۰۰۰ نفر به دلیل ابتلا به سرطان، زندگی خود را از دست می‌دهند [۳]. سرطان پستان حدود یک سوم از سرطان‌های زنان را شامل می‌شود. این سرطان دومین سرطان بعد از سرطان ریه و شایع‌ترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است [۴]. این سرطان در بین زنان شرق ایران یکی از شایع‌ترین انواع سرطان به شمار می‌رود. بر اساس گزارش کشوری،

دارویی برای به حداقل رساندن عوارض جانبی و تاثیرگذاری بیشتر دارو و همچنین جهت ژن درمانی استفاده می‌شود. نانوذرات به عنوان ذراتی با اندازه‌های در محدوده ۱۰۰-۱۰ نانومتر تعریف می‌شوند. ترکیبات دارویی می‌تواند توسط آنها محصور شده و یا به آنها متصل شوند [۱۸]. روش‌های مختلفی برای تولید نانوذرات نقره وجود دارد، ولی استفاده از گیاهان بدلیل کم هزینه و سازگار محیط زیست بودن در سنتز نانوذرات بسیار مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از گیاهان و عصاره‌های گیاهی آن‌ها به دلیل در دسترس بودن امروزه مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش نانوذره نقره به کمک ماده مؤثره آپیزین سنتز شد و برخی از اثرات زیستی آن از جمله خاصیت آنتی اکسیدانی و خاصیت ضد سرطانی آن بر علیه سلول‌های سرطان پستان رده سلولی MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت. ساختار آپیزین مورد استفاده در این پژوهش در تصویر ۱ نشان داده شده است.



تصویر ۱: ساختار ماده مؤثره آپیزین

روش کار

مواد: رده سلولی سرطان پستان MCF-7 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. تریپسین-EDTA، محیط کشت RPMI164، آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین، سرم جنینی گاو FBS از کمپانی GIBCO خریداری شدند. آپیزین، رنگ MTT، DPPH، ABTS، ویتامین C از شرکت سیگما تهیه شدند. میکروسکوپ الکترونی SEM ساخت شرکت Philips، Eindhoven، کشور هلند استفاده شد. الیزا پلیت ریدر ساخت شرکت STAT FAX کشور آمریکا مورد استفاده قرار گرفت.

سنتز نانوذرات نقره طبق روش یزدی و همکاران با کمی تغییرات صورت گرفت [۱۹]. به طور خلاصه، از آپیزین به عنوان عامل کاهنده زیستی برای یون‌های نقره استفاده شد. ۳ گرم از پودر آپیزین در ۴۵ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر مخلوط شد. سپس به مدت ۴ ساعت در شیکر قرار داده شد. ۵ میلی لیتر از محلول تهیه شده به ۹۵ میلی لیتر نیترات نقره (۱۰ میلی مولار) اضافه شد و محلول به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. مخلوط کردن محلول آپیزین با محلول نیترات نقره منجر به تغییر رنگ محلول از قهوه‌ای روشن به قهوه‌ای تیره شد که این تغییر رنگ ممکن است دلیل بر سنتز نانو ذرات نقره به کمک آپیزین باشد. برای پیگیری ویژگی‌های نانوذرات نقره سنتز شده، از تکنیک‌های مختلفی مانند، طیف سنجی مرئی فرابنفش (UV-Visible) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده شد [۱۹]. یکی از دستگاه‌هایی که نمونه را به صورت محلول آنالیز می‌کند، دستگاه طیف سنجی مرئی فرابنفش (UV-Visible) می‌باشد. در فلزات، زمانی

منبع بسیار متنوعی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی هستند و برای درمان بیماری‌ها در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند که عمده آنها دارای خواص ضد میکروبی، ضد سرطانی، ضد دیابت، ضد آترواسکلروز، تنظیم کننده‌های دستگاه ایمنی و حتی اثرات ضد انعقادی نیز هستند [۸].

امروزه با توجه به اثرات مفید آنتی اکسیدان‌ها، به ویژه آنتی اکسیدان‌های طبیعی در درمان و پیشگیری از بیماری‌ها، علاقه زیادی به پیدا کردن آنتی اکسیدان‌های طبیعی از منابع گیاهی وجود دارد. مطالعات در مورد گیاهان نشان می‌دهد که اکثر آنها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی هستند [۹]. متابولیت‌های ثانویه در گیاهان شامل: آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، استروئیدها، ساپونین‌ها، فنول‌ها، فلاونوئیدها و اسیدهای آمینه هستند که از آنها جهت تولید داروهای مختلف استفاده می‌شوند. این روند زمینه ساز تلاش‌های موفق برای تولید بعضی از داروهای ارزشمند شده است [۱۰]. فلاونوئیدها دارای اسکلت ساختاری پلی فنول یا دی فنیل پروپان هستند و متشکل از دو حلقه معطر بنزن هستند. این ترکیبات خانواده بزرگی از متابولیت‌های ثانویه هستند و تاکنون ۶۰۰۰ نوع فلاونوئید مختلف شناسایی شده‌اند [۱۱]. فلاون‌های عمده شامل کومپفرول، کوئرستین و میرستین می‌باشند. دو فلاون اصلی لوتئولین و آپیزین می‌باشند که خود شامل ۶۲ نوع متفاوت است که در انواع سبزیجات، میوه‌ها و گیاهان استوایی خوراکی یافت می‌شوند [۱۲]. فلاونوئیدها دارای خواص شناخته شده‌ای شامل: حذف رادیکال‌های آزاد، مهار کننده برخی از آنزیم‌های و خواص ضدالتهابی می‌باشند. برخی شواهد نشان می‌دهند که اثرات زیستی این ترکیبات مربوط به فعالیت آنتی اکسیدانی آنهاست [۱۳]. آنتی اکسیدان‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلفی در بدن نظیر القای آپوپتوز، اثر ضد التهابی، اثر تقویت ایمنی، توقف چرخه سلولی و تمایز سلولی عمل می‌کنند [۱۴].

آپیزین یک فلاونوئید طبیعی با جرم مولکولی ۲۷۰/۲۴ گرم بر مول است که به فراوانی در بسیاری از میوه جات، سبزیجات، گیاهان و ادویه جات وجود دارد و به فراوانی در برگ گیاهانی مانند برگ جعفری و گل خشک بابونه یافت می‌شود [۱۵]. این ماده همچنین به میزان قابل توجهی در پیاز، پرتقال، چای و جوانه گندم وجود دارد [۱۱]. آپیزین یک فلاونوئید فعال زیستی شناخته می‌شود که دارای خواص ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی می‌باشد. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهند که کاهش خطر ابتلا به سرطان‌های خاص، به ویژه سرطان پستان، دستگاه گوارش، پوست، پروستات و برخی از بدخیمی‌های هماتولوژیک با رژیم غذایی غنی از فلاون‌ها مرتبط است. علاوه بر این، آپیزین می‌تواند در سایر بیماری‌هایی که از طریق فرآیند استرس اکسیداتیو تحت تأثیر قرار می‌گیرد از قبیل اختلالات قلب و عروق و عصبی مؤثر می‌باشد. اگرچه همچنان انجام تحقیقات بیشتری در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد [۱۶].

نانوبیوتکنولوژی، یک علم در حال ظهور است که از نانوذرات برای کاربردهای مختلف پزشکی استفاده می‌کند. این علم در حال توسعه، امکان استفاده از نانوذرات جهت تشخیص و درمان سرطان‌های انسان را افزایش داده است. نانوذرات یک جایگزین بالقوه داروها برای درمان بیماری هستند، زیرا آنها به علت ساختار و اندازه بسیار کوچک اثرات بیولوژیکی منحصر به فرد دارند [۱۷]. نانوذرات در زمینه تحقیقات

۷۲ ساعت در شرایط کشت نگهداری شدند. هر غلظت از نانوذرات نقره در سه تکرار مجزا برای هر زمان آنکوباسیون در نظر گرفته شد، به نحوی که برای هر غلظت حداقل ۳ تکرار موجود باشد. جهت آماده سازی محلول، ۵ میلی گرم از پودر زرد رنگ MTT در ۱ میلی لیتر از بافر فسفات نمکی حل شد. محلول حاصل با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرومتر استریل گردید و در تاریکی و دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بدین منظور به هر یک از خانه‌ها ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در آنکوباتور قرار گرفت. بنابراین پس از ۴ ساعت نگهداری در آنکوباتور، محیط حاوی MTT هر چاهک خارج شد و ۱۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) به آن اضافه گردید. در نهایت جذب نوری محلول حاصل در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزایدر خوانده شد. میزان زنده‌مانی سلول به وسیله معادله‌ی زیر محاسبه شد [۲۰].

$$\text{درصد زنده‌مانی سلول} = \frac{\text{جذب نمونه تیمار شده}}{\text{جذب نمونه کنترل}} \times 100$$

جهت ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی نانو ذره نقره آپیژنین، محلول DPPH ۰/۱ میلی مولار در اتانول ۹۵٪ حل شد. سپس محلول آماده شده با ۱ میلی لیتر از محلول DPPH و ۱۰۰ میکرولیتر نانو ذره نقره آپیژنین مخلوط شد. سپس محلول مذکور ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در این تست از ویتامین C به عنوان یک آنتی اکسیدان استاندارد استفاده گردید. هر آزمایش با سه بار تکرار انجام شد و درصد فعالیت آنتی اکسیدانی نانو ذره نقره سنتز شده با آپیژنین به کمک رابطه زیر ارزیابی گردید:

$$\text{درصد مهار رادیکال DPPH} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

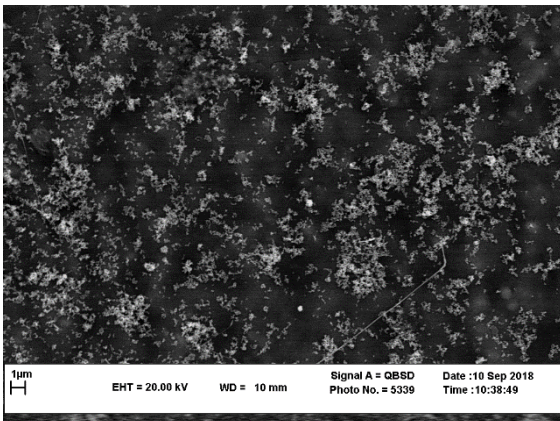
در این رابطه A_c : نشان دهنده‌ی جذب محلول شاهد است که حاوی ۰/۵ میلی لیتر محلول DPPH ۰/۱ میلی مولار و ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر می‌باشد و A_s : نشان دهنده جذب محلول حاوی نمونه نانوذره نقره سنتز شده و محلول DPPH می‌باشد.

سنجش میزان فعالیت نانوذره نقره آپیژنین در مهار رادیکال‌ها با کمک تست ABTS نیز انجام شد. مولکول ABTS (۲،۲-آزینو بیس (۳-اتیل بنزوتیازولین ۶- سولفونیک اسید)) ماده‌ای است که برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از آن استفاده می‌گردد. اساس این روش به صورتی است که در مرحله اول باید رادیکال‌های ABTS به حالت کاتیونی تولید شود و در مرحله بعد با اضافه کردن نمونه حاوی نانو ذره نقره سنتز شده در یک دوره زمانی، کاهش جذب محلول ثبت می‌شود. برای تهیه محلول رادیکال ABTS، ۲ میلی لیتر ABTS ۷ میلی مولار و ۱ میلی لیتر پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی مولار با یکدیگر مخلوط گردید و به مدت ۱۶ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محلول حاصل با افزودن آب، تا رسیدن به جذب ۰/۷۵۶ در طول موج ۷۴۳ نانومتر رقیق شد. سپس ۱ میلی لیتر از محلول رقیق شده‌ی رادیکال ABTS با ۱۰۰ میکرولیتر نانو ذره نقره آپیژنین مخلوط شد و جذب محلول واکنش تا حدود دقیقه‌ی هفتم، یعنی تا زمانی که فعالیت نمونه به بیشترین مقدار خود برسد کنترل شد. درصد فعالیت حذف رادیکال از رابطه زیر بدست آمد [۲۱].

که اندازه‌ی ذره به چند ده نانو می‌رسد، یک جذب خیلی قوی مشاهده می‌شود که منشأ آن، نوسان الکترون‌ها در نوار هدایت از سطح یک ذره به ذره دیگر است. به این نوسان که یک جذب قوی در ناحیه مرئی دارد، جذب پلاسمون سطح گفته می‌شود، به طور ساده می‌توان گفت که دریایی از الکترون‌های غیر مستقر بر سطح یک نانوذره فلزی شناورند، جذب نور منجر به تشدید نوسان این الکترون‌های سطحی می‌شود. رنگ محلول‌های کلئیدی طلا و نقره با اندازه ذرات نانو به همین پدیده ربط داده می‌شود. مثلاً نانو ذرات طلا، رنگ قرمز بسیار درخشانی را ایجاد می‌کند. فرکانس و عرض جذب پلاسمون وابسته به شکل و اندازه‌ی نانوذرات فلزی است، و به همان نسبت به ثابت دی الکترونیک محیط و فلز هم وابسته است. فلزات مثل مس، نقره و طلا دارای یک رزونانس پلاسمون مرئی بسیار قوی هستند، این در حالی است که بسیاری از دیگر فلزات واسطه، فقط یک باند جذبی ضعیف و پهن در ناحیه‌ی فرابنفش دارند. برای مثال پیک جذبی نانو ذرات طلا حدوداً در طول موج ۵۲۰ نانومتر می‌باشد که بسته به شرایط و اندازه ذرات و جنس آنها محل پیک جذبی تغییر می‌کند. مثلاً نانو ذرات اکسید روی، قله جذب اصلی در طول موج حدوداً ۳۸۰ نانومتر دارند. البته همانطور که گفته شد برای نمونه‌های مختلف این طول موج متفاوت می‌باشد. در واقع دانستن محدوده پیک جذبی به ما اطلاعاتی در مورد اندازه ذرات می‌دهد.

مثلاً اگر محل پیک جذبی به سمت طول موج‌های کوچکتر باشد یعنی نانو ذرات تولید شده دارای اندازه کوچکی می‌باشند. ولی هر چه محل پیک جذبی به سمت طول موج‌های بلندتر باشد، اندازه ذرات بزرگتر بوده است. میکروسکوپ الکترونی روبشی، یکی از انواع بسیار معروف میکروسکوپ‌های الکترونی است که خصوصاً کاربردهای بسیاری در فناوری نانو پیدا کرده است. با این میکروسکوپ سطح نانوذره تولید شده مورد بررسی قرار می‌گیرد. بررسی خاصیت سلول کشی نانوذرات سنتز شده با استفاده از روش MTT صورت گرفت. این تکنیک یک روش سنجش کالریمتری برای اندازه گیری توان حیاتی سلول می‌باشد و همچنین برای بررسی تأثیر داروها بر رشد سلول‌ها، سمیت سلولی ترکیبات دارویی فرآورده‌های گیاهی و سایر مواد شیمیایی به کار می‌رود. اساس این آزمایش بر پایه کاهش بلورهای زردرنگ تترازولیوم توسط آنزیم آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی و تولید بلورهای نامحلول بنفش رنگ فورمازان است. تنها سلول‌های زنده می‌توانند بلورهای تترازولیوم را به بلورهای فورمازان تبدیل کنند. آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندری در زنجیره تنفسی و سایر سیستم‌های انتقال الکترون، نمک MTT را احیاء نموده و آن را به بلورهای غیر محلول بنفش رنگ فورمازان تبدیل می‌کند. بلورهای فورمازان در خارج از سلول با افزودن حلال مناسبی مانند دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل می‌گردند. مقدار رنگ ایجاد شده از طریق اسپکتروفوتومتری در طول موج ۵۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری می‌شود. روش کار به این صورت است که در هر یک از چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه‌ای، $10^2 \times 5$ سلول کشت داده شد و پس از رسیدن به پراکنش سطحی ۰/۸، محیط رویی با محیط جدید حاوی غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره سنتز شده با آپیژنین (غلظت‌های ۰/۱۵۶، ۰/۰۳۱۲، ۰/۰۶۲۵، ۰/۰۱۲۵، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵ و ۰/۰۸ میلی مولار) جایگزین شد و در سه پلیت مجزا سلول‌ها برای ۲۴، ۴۸،

تیمار بستگی دارد. در زمان‌ها و غلظت‌های ابتدایی سلول‌ها از توان حیاتی بالاتر و بیشتری برخوردار بودند و در زمان‌ها و غلظت‌های بعدی، این سلول‌ها غالباً به میزان بیشتری دچار مرگ شدند. با افزایش زمان تیمار اثر سمیت نیز افزایش می‌یابد و با افزایش غلظت نانوذره نیز درصد زیستایی سلول‌ها کاهش می‌یابد. مقدار IC_{50} بعد از مدت زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با نانوذره نقره سنتز شده با آپیزین $0.47/0$ میلی مولار تعیین گردید. با افزایش غلظت تیمار زیستایی سلول‌ها کاهش یافت و سمیتی که بر آنها اعمال می‌گردد افزایش یافت، همچنین تغییرات بیشتر در زمان‌ها و غلظت‌های بالا مشهود است.



تصویر ۳: تصویر میکروسکوپ SEM از نانوذرات نقره سنتز شده با ماده مؤثره آپیزین

جهت بررسی اینکه آیا نانوذره نقره سنتز شده اثری بر سلول‌های طبیعی دارد یا خیر اثر آن بر سلول‌های نرمال فیروبلاست پوستی (HDF: Human Dermal Fibroblast) بررسی شد. غلظت‌های متفاوت $0.06/0$ ، $0.125/0$ ، $0.25/0$ و $0.5/0$ میلی مولار و زمان‌های مختلف مورد بررسی کاملاً مشابه با تست MTT بر روی سلول‌های سرطانی در نظر گرفته شده است تا میزان اثر سمیت نانوذره بر روی سلول‌های سرطانی و سلول‌های نرمال مقایسه شود. نتایج در تصویر ۵ نشان داده شده است. نمونه کنترل سلول نرمال HDF بدون تیمار با نانوذره نقره و درصد زیستایی آن‌ها بعد از گذشت ۷۲ ساعت، 100% می‌باشد. در غلظت $0.06/0$ در مدت زمان ۷۲ ساعت تیمار با نانوذره نقره سنتز شده میزان زیستایی سلول‌های نرمال $97/7$ درصد، در غلظت $0.125/0$ میلی مولار در مدت زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار با نانوذره نقره میزان زیستایی سلول‌های $95/6$ ، در غلظت $0.25/0$ تیمار با نانوذره نقره درصد زیستایی سلول‌های HDF $93/53$ درصد و در نهایت در غلظت $0.5/0$ میلی مولار میزان زیستایی سلول‌ها برابر $90/26$ درصد می‌باشد. با توجه به این نتایج، نتیجه گیری می‌شود که نانوذره نقره سنتز شده با ماده مؤثره آپیزین در مدت زمانهای ۷۲ ساعت در غلظت $0.5/0$ میلی مولار اثر سمیت بسیار جزئی بر روی سلول‌های نرمال داشته است.

جهت بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی نانوذره نقره آپیزین از روش DPPH و ABTS استفاده شد. اساس روش DPPH بر مبنای احیاء رادیکال آزاد DPPH به وسیله آنتی اکسیدان‌ها در غیاب سایر رادیکال‌های آزاد در محیط می‌باشد که نتیجه این عمل باعث ایجاد رنگی در محیط می‌شود که شدت آن با دستگاه طیف سنجی ماوراء- بنفش قابل اندازه گیری است. در این تحقیق از

$$ABTS = \frac{A_C - A_S}{A_C} \times 100$$

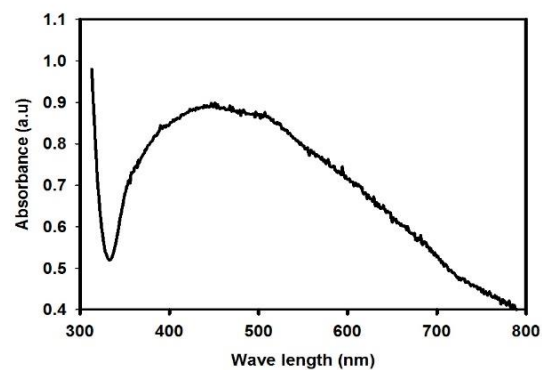
در این رابطه A_C : نشان دهنده جذب محلول شاهد است و A_S : نشان دهنده جذب محلول حاوی نمونه نانوذره اکسید نقره سنتز شده می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به کمک نرم افزار SPSS انجام گرفت. جهت بررسی میزان فعالیت سیتوتوکسیک و آنتی اکسیدانی نانوذره و مقایسه آن با نمونه استاندارد ابتدا تمامی جذب‌های به دست آمده از دستگاه اسپکتروسکوپی به فرمول‌های خاص خود منتقل و اعداد حاصل به نرم افزار SPSS منتقل گردید و از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) استفاده شد. سپس قیاس میانگین‌ها با روش حداقل تفاوت معنی دار (LSD: Least Significant Differences) صورت گرفت. مقدار Error bar بر روی نمودارها میانگین انحراف معیار و سطح اطمینان $P < 0.05$ برای محاسبات در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

جهت پیگیری تشکیل نانوذرات نقره به کمک آپیزین از تکنیک اسپکتروسکوپی مرئی-ماورابنفش استفاده شد. محلول بدست آمده در طول موج $300-900$ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مورد بررسی قرار گرفت. بعد از تشکیل نانوذرات جذب آنها در طول موج بالاتر از 400 نانومتر افزایش می‌یابد. همانطور که در تصویر ۲ مشخص می‌باشد، پیک منحنی در محدوده $400-500$ نانومتر، نشان دهنده وجود تشکیل نانوذرات نقره می‌باشد.

تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی SEM که نانوذره نقره سنتز شده با استفاده از ماده مؤثره آپیزین را مشخص می‌کند، در تصویر ۳ نشان داده شده است.

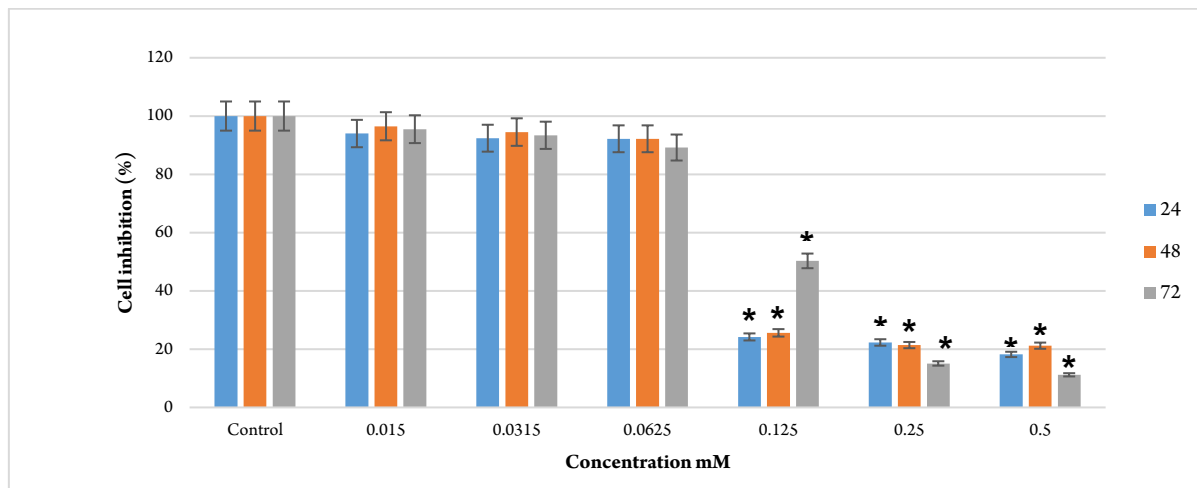


تصویر ۲: پیک منحنی ثبت شده به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتری در محدوده $400-500$ نانومتر که نشان دهنده وجود تشکیل نانوذرات نقره به کمک ماده آپیزین می‌باشد.

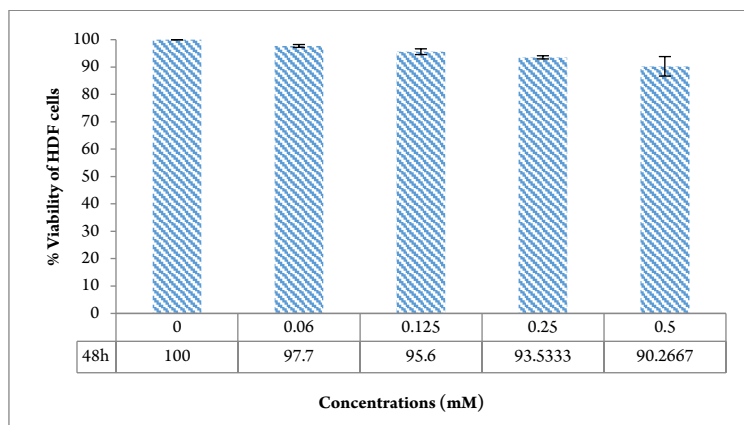
در این مطالعه جهت بررسی خاصیت سلول کشی نانوذرات نقره سنتز شده، اثر آن بر روی رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) بررسی شد. بعد از کشت سلول‌ها، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوذره تیمار شدند و بعد از مدت زمان 24.48 و 72 ساعت درصد زیستایی سلول‌ها به کمک روش MTT تعیین شد. نتایج بدست آمده نشان داد که نانوذره نقره سنتز شده اثرات مهاری قابل توجهی بر رشد سلول‌های سرطانی پستان دارد. از نتایج بدست آمده در تصویر ۴ مشخص می‌شود که القای سیتوتوکسیسیته نانوذره نقره آپیزین به غلظت نانوذره و مدت زمان

رادیکال‌های آزاد بوسیله نانو ذره نقره سنتز شده و ویتامین C به ترتیب ۷۲/۲۳ و ۸۹/۶ درصد می‌باشد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانو ذره نقره تأثیر معنی داری بر مهار رادیکال‌های آزاد DPPH دارد.

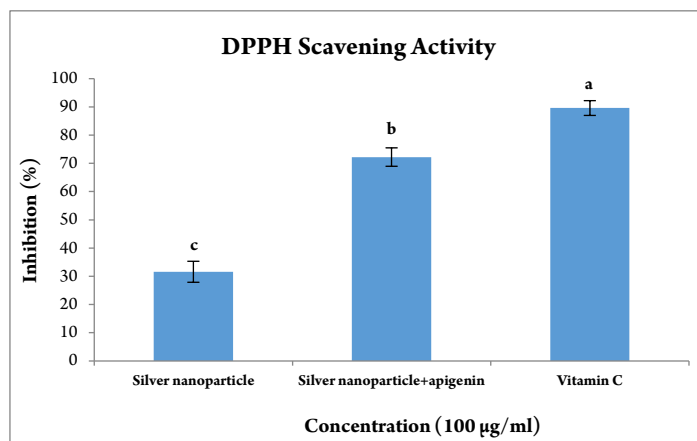
ویتامین C به عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد استفاده شده است. نتایج حاصل از این آزمایش در نمودار ۴ نشان داده شده است. همانطور که در تصویر ۶ مشخص می‌باشد، در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذره نقره، درصد میزان مهار



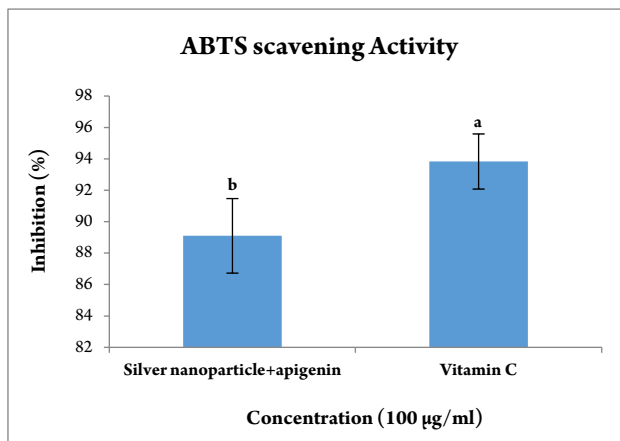
تصویر ۴: نمودار حاصل از بررسی سمیت نانو ذره نقره سنتز شده توسط آپیتین در سلول‌های MCF-7. در محور عمودی درصد زیستایی سلول‌ها نشان داده شده است و محور افقی غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره که با سلول‌ها تیمار شده‌اند. اثر نانوذره نقره آپیتین بر توان حیاتی سلول‌های سرطانی پستان در زمان ۴۸، ۷۲ و ۲۴ ساعت پس از تیمار با نانوذره نقره آپیتین نشان داده شده است. با افزایش غلظت، زیستایی سلول‌ها کاهش یافته است. علامت * بیانگر آن است که داده‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی دار می‌باشد.



تصویر ۵: بررسی اثر سمیت نانوذره نقره سنتز شده به وسیله آپیتین بر روی سلول‌های نرمال فیبروبلاست پوستی HDF



تصویر ۶: نمودار بررسی میزان مهار رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف نانوذره نقره سنتز شده توسط آپیتین. در محور عمودی درصد مهار رادیکال DPPH نشان داده شده است. در این آزمایش از ویتامین C به عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد استفاده شده است. هر آزمایش سه بار تکرار شده است. داده‌ها بر اساس \pm میانگین انحراف معیار گزارش شده است. حروف نامشابه بیانگر این است که داده‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی دار می‌باشد.



تصویر ۷: نمودار بررسی میزان مهار رادیکال ABTS در غلظت‌های مختلف نانوذره نقره سنتز شده توسط آپیتین. در محور عمودی درصد مهار رادیکال ABTS نشان داده شده است. در این آزمایش از ویتامین C به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد استفاده شده است. هر آزمایش سه بار تکرار شده است. داده‌ها بر اساس ضمیماتین انحراف معیار گزارش شده است. حروف نامشابه بیانگر این است که داده‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی دار می‌باشد.

شد که القای فوری آسیب سلولی به دلیل از دست دادن یکپارچگی غشای سلولی، استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در سلول‌هایی که با نانوذرات نقره تیمار شدند، وجود داشت [۲۴]. همچنین نتایج پژوهش انجام شده به وسیله رامار و همکاران نشان داده که نانوذره نقره سنتز شده به وسیله عصاره میوه *Solanum trilobatum* باعث فعال شدن مسیر آپوپتوز توسط کاسپاز ۳ و ۹ می‌شود [۲۵]. بر اساس پژوهش ندی سحو و همکاران، نانوذره نقره متابولیت های ثانویه‌ای نظیر هسپریدین، نارینگین و دایسمین دارای سمیت سلولی قابل توجهی نسبت به سلول‌های سرطانی مختلف می‌باشند و می‌توانند از پیشروی آنها جلوگیری کنند [۲۶].

Birt و همکارانش در چندین مطالعه تأیید کردند که آپیتین دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد جهش زایی، ضد سرطان زا، ضد التهابی و ضد تکثیر سلول می‌باشد. همچنین مشخص شده است که آپیتین دارای خواص ضد جهش زایی در برابر ژنوتوکسیک ناشی از نیتروپیرین در سلول‌های تخمدان هامستر چینی است. همچنین نشان داده شده است که آپیتین مهار کننده موتاژن ناشی از بنزوپرایتن و آمینواتراسن است [۱۱]. طبق تحقیقاتی که در سال ۱۹۹۹ توسط F Yin و همکارانش انجام شد، نشان داده شد که چندین فلاونوئید می‌تواند از تکثیر سلول‌های خاصی از سلول‌های سرطانی تیروئید انسان جلوگیری کند. در میان تست‌های انجام شده مشخص شد که آپیتین و لوتولین موثرترین مهارکننده‌های سلول‌های توموری بودند. آن‌ها با استفاده از روش وسترن بلات نشان دادند که اثر مهار آپیژنین روی تکثیر سلول ARO همراه با مهار تایروزین اتوفسفیریلایسون گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی EGFR می‌باشد و کاهش و فسفریلایسون از طریق کاهش MAP کیناز اتفاق می‌افتد و در نهایت درمان با آپیتین منجر به مهار رشد سلول سرطانی تیروئید وابسته به لنفوسیت می‌شود. به طور خلاصه می‌توان گفت آپیتین یک مهار کننده امیدوارکننده مسیرهای انتقال پیام درون سلولی است که تنظیم رشد و بقای سلول‌های سرطانی آناپلاستیک تیروئید را تنظیم می‌کند. آپیتین ممکن است یک رویکرد جدید برای درمان کارسینوم آناپلاستیک انسان ارائه کند که در حال حاضر هیچ درمانی موثری برای آن وجود ندارد [۲۷].

جذب رادیکال ABTS روشی کارآمد برای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات دهنده هیدروژن می‌باشد. رادیکال ABTS نسبتاً پایدار است و به راحتی توسط آنتی اکسیدان‌ها احیاء می‌شود. همانطور که در تصویر ۷ مشاهده می‌شود در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذره نقره و ویتامین C به عنوان کنترل، جذب رادیکال ABTS توسط نانوذره نقره و ویتامین C به ترتیب برابر ۸۹/۱ و ۹۸/۳ درصد می‌باشد که نشان دهنده قابلیت بالا و معنی دار فعالیت آنتی اکسیدانی نانو ذره نقره آپیتین می‌باشد.

بحث

در مطالعه حاضر اثرات آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی نانوذره نقره سنتز شده به کمک ماده مؤثره آپیتین بر سلول‌های سرطان پستان رده MCF-7، مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که این نانوذره توانایی بالایی در حذف رادیکال‌های آزاد و مهار رشد سلول‌های سرطان پستان (MCF-7) دارد. مطالعات بسیاری بیانگر اثر سیتوتوکسیک نانوذرات مختلف فلزی از جمله نانو ذره نقره بر سلول‌های سرطانی می‌باشند که در ذیل به برخی از آن‌ها پرداخته شده است. طبق مطالعات انجام شده در سال ۲۰۱۲، نانوذره نقره سنتز شده به کمک عصاره برگ *Annona squamosa* سمیت سلولی در برابر سلول‌های سرطانی انسانی MCF-7 نشان داد و مقدار IC_{50} آن به ترتیب ۸۰، ۶۰ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب در ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون بود [۲۲]. در پژوهش حاضر مقادیر IC_{50} پس از مدت زمان ۴۸ ساعت ۰/۰۴۷ میلی مولار برآورد شد که نشان دهنده این است که نانوذره نقره آپیتین اثر بهتری در از بین بردن سلول‌های سرطانی دارد. پژوهش انجام شده به وسیله Gurunathan و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده به کمک *Ganoderma neo-japonicum* دارای اثرات سیتوتوکسیک با ویژگی‌های آپوپتوزی هستند و نشان می‌دهد که گونه‌های اکسیژن فعال تولید شده توسط نانوذرات نقره در آپوپتوز نقش مهمی دارند. اثرات آپوپتوزی نانوذرات نقره با فعال شدن کاسپاز ۳ و تکه تکه شدن DNA همراه است [۲۳]. در مطالعات Jeyaraj M و همکاران مشخص

رفتن سلول‌ها از طریق آپوپتوزیس صورت می‌گیرد یا از روش‌های دیگر که برای این منظور می‌توان از روش‌های رنگ آمیزی مثل هوخست، فلوسایتومتری و بیان ژنهای آپوپتوزی استفاده نمود. در همین راستا می‌توان اثرات ضد رگ زایی نانوذره را نیز بررسی نمود. همچنین اثرات آنتی باکتریال نانوذره سنتز شده بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی شود. در صورت امکان اثر نانوذره در محیط *in vivo* بر روی موش‌هایی که دچار سرطان پستان هستند بررسی شود.

نتیجه‌گیری

در آزمایش حاضر اثر سمیت سلولی نانوذره نقره آپیژنین بر سلول‌های سرطان پستان رده MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمایش نشان می‌دهد که آپیژنین دارای سمیت سلولی قابل توجهی بر روی رده سلولی مذکور می‌باشد و می‌تواند سلول‌های سرطانی MCF-7 را بدون تأثیر بر روی سلول‌های طبیعی بدن از بین ببرد. طبق بررسی‌های صورت گرفته در ارتباط با فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذره نقره آپیژنین، مطالعه حاضر طبق تکنیک‌های صورت گرفته، نشان می‌دهد که نانوذره نقره آپیژنین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی می‌باشد و استفاده از آن می‌تواند در جهت حذف رادیکال‌های آزاد مؤثر باشد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر بخشی از نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد به شماره پایان نامه ۱۷۲۲۰ می‌باشد. این کار توسط آزمایشگاه تحقیقاتی بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد حمایت گردید. بدین وسیله از کلیه کارشناسان آزمایشگاه که در انجام این پژوهش همکاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(4):212-36. doi: 10.3322/caac.20121 pmid: 21685461
- Hartge P, Devesa SS, Grauman D, Fears TR, Fraumeni JF, Jr. Non-Hodgkin's lymphoma and sunlight. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(5):298-300. doi: 10.1093/jnci/88.5.298 pmid: 8614009
- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(1):10-30. doi: 10.3322/canjclin.55.1.10 pmid: 15661684
- Yadav NK, Poudel B, Thanpari C, Chandra Koner B. Assessment of biochemical profiles in premenopausal and postmenopausal women with breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(7):3385-8. doi: 10.7314/apjcp.2012.13.7.3385 pmid: 22994765
- Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 2003;314(1):15-23. doi: 10.1007/s00441-003-0745-x pmid: 12883993
- Dolatkhahi M, Yousefi M, Bagher Nejad J, Dolatkhahi A. Introductory study of the medicinal plant species of Kazeroon, Fars province. *J Herb Drugs.* 2010;1(3):47-56.
- Rafieian-Kopaei M, Baradaran A, Rafieian M. Plants antioxidants: From laboratory to clinic. *J Nephropathol.* 2013;2(2):152-3. doi: 10.12860/JNP.2013.26 pmid: 24475444
- SharafatiChaleshtori R, Chaleshtori FS, Rafieian M. Biological characterization of Iranian walnut (*Juglans regia*) leaves. *Turk J Biol.* 2011;35(5):635-9.

در بررسی‌های انجام شده و مطالعات متعددی که بر روی آنتوسیانین و نانوذرات نقره صورت گرفته است نشان می‌دهد که نانوذرات نقره سنتز شده به کمک آنتوسیانین دارای خواص آنتی اکسیدانی بسیار خوبی می‌باشد که می‌توان از آنها به عنوان عامل قوی برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن استفاده نمود [۲۸]. فعالیت آنتی اکسیدانی صورت گرفته بر روی فلاونوئیدهایی همچون روتین و کوئرستین نشان می‌دهد که فلاونوئیدها دارای فعالیت‌های آنتی اکسیدانی به شدت قوی هستند و به سرعت و با توجه به دوز و زمان می‌توانند رادیکال‌های آزاد را از بین ببرند [۲۹]. در مطالعه‌ای که به وسیله کوکیلا و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد، فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره تولید شده با استفاده از عصاره پوست پرتقال به عنوان عامل کاهنده، مورد سنجش قرار گرفت و قابلیت جذب رادیکال‌های آزاد به کمک تست DPPH و ABTS در شرایط *in vitro* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره تولید شده دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی بالایی می‌باشند و در نتیجه می‌توانند به عنوان جاذب بالقوه رادیکال در برابر صدمات مخرب ناشی از استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار گیرند [۳۰]. مطالعه حاضر طبق تکنیک‌های صورت گرفته، نشان می‌دهد که نانوذره نقره آپیژنین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی می‌باشد و استفاده از آن می‌تواند در جهت حذف رادیکال‌های آزاد مؤثر باشد. نتایج این بررسی نشان داد که خواص آنتی اکسیدانی نمونه‌ها وابسته به غلظت آن‌هاست و با افزایش غلظت، فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش می‌یابد. نانوذرات نقره در مقایسه با آنتی اکسیدان استاندارد (آسکوربیک اسید) فعالیت آنتی اکسیدانی بسیار خوبی را نشان دادند. در انتها پیشنهاد می‌شود که اثرات نانوذره نقره سنتز شده بر روی سایر سلول‌های سرطانی نیز بررسی شود. همچنین مشخص شود که از بین

- Balandrin M, Klocke J. Medicinal, aromatic, and industrial materials from plants. *Medicinal and Aromatic Plants I*: Springer; 1988. p. 3-36.
- Vanisree M, Lee C-Y, Lo S-F, Nalawade SM, Lin CY, Tsay H-S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sin.* 2004;45(1):1-22.
- Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol.* 2007;30(1):233-45. pmid: 17143534
- Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med.* 1995;155(4):381-6. pmid: 7848021
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 1999;64(4):555-9. doi: 10.1016/s0308-8146(98)00102-2
- Danaraddi S, Hunasgi S, Koneru A, Ramalu S, Vanishree M. Natural ways to prevent and treat oral cancer. *J Oral Res Rev.* 2014;6(1):34. doi: 10.4103/2249-4987.140213
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5):727-47. doi: 10.1093/ajcn/79.5.727 pmid: 15113710
- Shukla S, Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res.* 2010;27(6):962-78. doi: 10.1007/s11095-010-0089-7 pmid: 20306120
- Barar J, Javadzadeh AR, Omid Y. Ocular novel drug delivery: impacts of membranes and barriers. *Expert Opin Drug Deliv.*

- 2008;5(5):567-81. doi: 10.1517/17425247.5.5.567 pmid: 18491982
18. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles - A review. *Tropic J Pharmac Res* 2007;5(1). doi: 10.4314/tjpr.v5i1.14634
 19. Taghavizadeh Yazdi ME, Khara J, Sadeghnia HR, Esmaeilzadeh Bahabadi S, Darroudi M. Biosynthesis, characterization, and antibacterial activity of silver nanoparticles using *Rheum turkestanicum* shoots extract. *Res Chem Intermediates*. 2017;44(2):1325-34. doi: 10.1007/s11164-017-3169-z
 20. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*. 1986;94(1-2):57-63. doi: 10.1016/0022-1759(86)90215-2
 21. Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, Jaafar HZ. Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*. 2010;15(9):6244-56. doi: 10.3390/molecules15096244 pmid: 20877220
 22. Vivek R, Thangam R, Muthuchelian K, Gunasekaran P, Kaveri K, Kannan S. Green biosynthesis of silver nanoparticles from *Annona squamosa* leaf extract and its in vitro cytotoxic effect on MCF-7 cells. *Process Biochemistry*. 2012;47(12):2405-10. doi: 10.1016/j.procbio.2012.09.025
 23. Gurunathan S, Raman J, Abd Malek SN, John PA, Vikineswary S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: a potential cytotoxic agent against breast cancer cells. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:4399-413. doi: 10.2147/IJN.S51881 pmid: 24265551
 24. Jeyaraj M, Sathishkumar G, Sivanandhan G, MubarakAli D, Rajesh M, Arun R, et al. Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: an experimental report. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;106:86-92. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.01.027 pmid: 23434696
 25. Ramar M, Manikandan B, Marimuthu PN, Raman T, Mahalingam A, Subramanian P, et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Solanum trilobatum* fruits extract and its antibacterial, cytotoxic activity against human breast cancer cell line MCF 7. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2015;140:223-8. doi: 10.1016/j.saa.2014.12.060 pmid: 25613692
 26. Sahu N, Soni D, Chandrashekhar B, Satpute DB, Saravanadevi S, Sarangi BK, et al. Synthesis of silver nanoparticles using flavonoids: hesperidin, naringin and diosmin, and their antibacterial effects and cytotoxicity. *Int Nano Letters*. 2016;6(3):173-81. doi: 10.1007/s40089-016-0184-9
 27. Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO). *Anticancer Res*. 1999;19(SB):4297-303. pmid: 10628390
 28. Demirbas A, Yilmaz V, Ildiz N, Baldemir A, Ocsay I. Anthocyanins-rich berry extracts directed formation of Ag NPs with the investigation of their antioxidant and antimicrobial activities. *J Molecul Liq*. 2017;248:1044-9. doi: 10.1016/j.molliq.2017.10.130
 29. Selvaraj K, Chowdhury R, Bhattacharjee C. Isolation and structural elucidation of flavonoids from aquatic fern *Azolla microphylla* and evaluation of free radical scavenging activity. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2013;5(3):743-9.
 30. Kokila T, Ramesh P, Geetha D. A biogenic approach for green synthesis of silver nanoparticles using peel extract of *Citrus sinensis* and its application. *Int J ChemTech Res*. 2015;7(2):804-13.