Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
No 42, Volume 11, Issue 2

Research Article

Study of Apoptotic Properties of Silver Nanoparticles Green Synthesized Using *Amaranthus cruentus* Extract in Breast Cancer Cells (MDA)

Hadiseh Yousefi Rad [1], Ali Neamati [2,*], Touran Ardalan [3]

[1] MSc. of Biochemistry, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad Iran
[2] Associate Professor of Physiology, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad Iran
[3] Assistant Professor of Chemistry Physic, Department of Chemistry, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad Iran
*** Corresponding author:** Ali Neamati, Associate Professor of Physiology, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad Iran. E-mail: neamati.ali@gmail.com

DOI: 10.29252/nkjmd-110208

How to Cite this Article:
Yousefi Rad H, Nemati A, Ardalan T. Study of Apoptotic Properties of Silver Nanoparticles Green Synthesized Using *Amaranthus cruentus* Extract in Breast Cancer Cells (MDA). *J North Khorasan Univ Med Sci.* 2019; **11**(2):53-58. DOI: 10.29252/nkjmd-110208

Received: 11 Sep 2018
Accepted: 19 Feb 2019

Keywords:
Silver Nanoparticles
Cancer
Apoptosis
Amaranthus cruentus

Abstract

Introduction: There are different treatment methods for cancer therapy, including surgical, anatomy, biopsy, chemotherapy and radiotherapy, but the side effects of these methods as well as their inefficiency for complete omission of cancer have led researchers to find a way to safety remove cells and cancerous tumors. The aim of this study was evaluation of cytotoxicity effects and apoptotic properties of silver nanoparticles synthesized by *Amaranthus cruentus* in breast cancer cells.

Methods: In this study the green method was used to synthesize silver nanoparticles by using *Amaranthus cruentus* extract. Then, MDA-MB-231 cells were treated with different concentrations of nanoparticles. The cytotoxicity effects of silver nanoparticles and Bax and Bcl-2 genes expressions were analyzed by using MTT assay and real-time PCR respectively.

Results: The results of MTT assay showed silver nanoparticles inhibit the proliferation of MDA cells depending on the concentration and time. Concentration 47µg/ml in 24h, 45 µg/ml in 48h and 31 µg/ml in 72h caused the death of 50% of MDA cells. Also, the result of real-Time PCR for treated cells showed Bax gene expression was increased, while the expression of the Bcl-2 gene was decreased.

Conclusions: Silver nanoparticles cause apoptosis in MDA cells and using these nanoparticles can be considered as a promising strategy in the treatment of breast cancer.

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸

مقاله پژوهشی

بررسی خصوصیات آپوپتوزی نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط گیاه *Amaranthus cruentus* در سلول‌های سرطان پستان رده MDA

حدیثه یوسفی‌راد [۱]، علی نعمتی [۲،*]، توران اردلان [۳]

[۱] کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
[۲] دانشیار فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
[۳] استادیار شیمی فیزیک، گروه شیمی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** علی نعمتی، دانشیار فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. ایمیل: neamati.ali@gmail.com

DOI: 10.29252/nkjms-110208

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۳۰

واژگان کلیدی:
نانو ذرات نقره
سرطان، آپوپتوز
Amaranthus cruentus

چکیده

مقدمه: برای درمان سرطان روش‌های درمانی متفاوتی از جمله جراحی، تشریح، بافت برداری، شیمی درمانی وپرتودرمانی وجود دارد، اما اثرات جانبی این روش‌ها و ناکارآمد بودنشان برای حذف کامل سرطان باعث شده‌است که محققان به دنبال روشی ایمن برای ازبین بردن بی خطر سلول‌ها وتومورهای سرطانی باشند. هدف از مطالعه حاضر بررسی سمیت و خصوصیات آپوپتوتیکی نانو ذرات نقره سنتز شده به روش سبز با استفاده از گیاه تاج خروس (*Amaranthus cruentus*) بر سلول‌های سرطانی پستان می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه، سنتز سبز نانو ذره نقره با استفاده از گیاه تاج خروس انجام شد. سپس سلول‌های رده MDA با غلظت‌های متفاوت نانو ذره نقره تیمار شدند. اثرات سمیت نانو ذره نقره با روش MTT و تغییرات بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 با روش Real-time PCR آنالیز شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد این نانو ذرات باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی MDA به طور وابسته به غلظت و زمان شده‌اند، غلظت ۴۷ میکروگرم بر میلی لیتر در ۲۴ ساعت، غلظت ۴۵ میکروگرم بر میلی لیتر در ۴۸ ساعت و غلظت ۳۱ میکروگرم بر میلی لیتر در ۷۲ ساعت منجر به مرگ ۵۰ درصد سلول‌ها شده است، هم‌چنین نتایج حاصل از Real time PCR مشخص کرد که بیان ژن Bax در سلول‌های تحت تیمار با نانو ذره افزایش، در حالی که بیان ژن Bcl-2 کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نانو ذرات نقره سنتز شده به روش سبز توسط گیاه تاج خروس باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی MDA می شود و استفاده از این نانو ذرات می‌تواند به عنوان یک استراتژی امیدوار کننده در درمان سرطان پستان مورد توجه قرار گیرد.

مقدمه

سرطان از جمله بیماری‌های مزمن و غیر واگیر است که شامل گروه وسیعی از بیماری‌ها می‌باشد. این بیماری همچون سایر بیماری‌های خطرناک، در هر فرد، گروه سنّی و هر نژادی رخ می‌دهد و به عنوان یک معضل عمده بهداشتی بر سلامت جامعه محسوب می‌گردد [۱]. روش‌های درمانی متفاوتی از جمله جراحی، تشریح، بافت برداری، شیمی درمانی وپرتودرمانی وجود دارد، اما اثرات جانبی این روش‌ها و ناکارآمد بودنشان برای حذف کامل سرطان باعث شده‌است که محققان به دنبال روشی ایمن برای ازبین بردن بی خطرسلول‌ها وتومورهای سرطانی باشند [۲, ۳].

امروزه استفاده از نانو ذرات در درمان بیماری‌ها از جمله سرطان رایج می‌باشد [۴]. نانوذرات نقره (AgNPs) یکی از مهم‌ترین اعضای نانو ذرات فلزات نجیب هستند [۵]. نقره برای باکتری‌ها بسیار سمی و برای سلول‌های حیوانی غیرسمی می‌باشد؛ در نتیجه یک فلز ضد باکتری سالم و مؤثر است [۶]. نانو ذره‌های نقره به علت خواص ضد میکروبی و به عنوان عامل ضد ویروسی علیه هپاتیت B ، ویروس (HSV-1: Herpes simplex virus 1)، ویروس (MPV: Monkeypox virus)، ویروس سین‌سیشیال تنفسی (Respiratory Syncytial Virus) شناخته شده‌است [۷]. این نانو ذره، در حال حاضر برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله نئواسکولاریزاسیون شبکیه (Retinal neurovascularization) [۸] و سندرم نقص ایمنی که در نتیجه ویروس نقص ایمنی بدن انسان به وجود آمده‌است، استفاده می‌شود [۹]. اخیراً استفاده از نانو ذره نقره به عنوان عوامل ضد سرطان ثابت شده‌است که امیدوار کننده می‌باشد [۱۰]. مطالعات نشان داده است که نانوذرات نقره می‌توانند از طریق آزادسازی رادیکالهای آزاد اکسیژن (ROS: Reactive Oxygen Species) باعث ایجاد آپوپتوز(مرگ برنامه ریزی شده سلول) در شرایط آزمایشگاهی شوند [۱۱].

آپوپتوز نامناسب (سرعت فعالیت به صورت افزایشی یا کاهشی) عامل بسیاری از بیماری‌های انسانی، از جمله بیماری‌های نوروژنیک (آلزایمر،

پارکینسون)، اختلالات خود ایمنی و بسیاری از انواع سرطان است [۱۲]. در صورت کاهش فعالیت آپوپتوز، سلول به سمت سرطانی شدن پیش می‌رود [۱۳]. امروزه بسیاری از راه‌های درمانی بر پایه راه اندازی مجدد فرآیند آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌باشد [۱۴]. تکنیک‌های متعددی نشان داده‌اند که نانو ذرات نقره با استفاده از روش‌های شیمیایی و فیزیکی می‌توانند سنتز شوند، اما به علت استفاده فراوان از مواد شیمیایی سمی و درجه حرارت بالا، پیدا کردن روش جایگزین ضروری شده است [۱۵]. تولید نانو ذره به روش سبز یک تکنولوژی قابل قبول است که باعث کاهش تولید مواد خطرناک برای سلامت انسان و محیط زیست می‌شود [۵]. هدف از مطالعه حاضر بررسی سمیت و خصوصیات آپوپتوتیکی نانو ذرات نقره سنتز شده به روش سبز با استفاده از گیاه تاج خروس (*Amaranthus cruentus*) بر سلول‌های سرطانی پستان رده MDA می‌باشد.

روش کار

برای تهیه عصاره آبی، ده گرم پودر تهیه شده از برگ گیاه تاج خروس (با کد هرباریوم ۱۰۳۱۶) در ۱۰۰ سی‌سی آب دیونیزه حل شد و به مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای جوش روی هیتر قرار گرفت و بعد از سرد شدن توسط کاغذ واتمن فیلتر شد و عصاره آبی حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای آزمایشات بعدی نگهداری شد. ۱۰ سی‌سی از عصاره تهیه شده به ۹۰ سی‌سی محلول نیترات نقره یک میلی مولار اضافه شد و محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاهی بر روی هیتر قرار داده شد. محلول حاوی نانو ذرات ساخته شده با دور rpm ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس رسوب بدست‌آمده جمع آوری شد. سپس با استفاده از تکنیک‌های XRD و FTIR سنتز نانو ذره نقره مورد نظر تأیید گردید. در ادامه اثرات سمیت و فعالیت آپوپتوزی نانو ذره مورد بررسی قرار می‌گیرد.

رده سلولی MDA-MB-231 از مرکز تحقیقات بوعلی تهیه شد و و در محیط کشت کامل DMEM ٪۱۰، حاوی FBS ۱۰ml (شرکت GIBCO, USA) و ۱ml آنتی بیوتیک پنی سیلین/ استرپتومایسین (شرکت GIBCO, USA) به ۸۹ml محیط کشت آماده DMEM (شرکت Sigma, France)؛ درون فلاسک های مخصوص کشت سلولی کشت داده شد و در انکوباتور CO_2 دار (دما ۳۷ درجه سلسیوس، رطوبت ۸۰٪، فشار کربن دی اکسید ۵٪) نگهداری گردید.

جهت ارزیابی سمیت نانوذرات نقره تهیه شده به روش سبز از تست تعیین توکسیسیته یا MTT (۳-[۴ و ۵- دیمتیل تیازول- ۲- ئیل [-۲-۵- دیفنیل تترازولیوم بromید) استفاده می‌شود. این آزمون بر مبنای واکنش اکسیداسیون و احیا و تغییرات جذب نوری انجام می پذیرد. در این تست کریستال‌های زرد رنگ نمک تترازولیوم توسط آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز احیا شده و موجب تولید بلورهای آبی رنگی می‌گردد که فورمازان نامیده می‌شود. در راستای احیا شدن نمک تترازولیوم نیاز است سلول سالم و نرمال باشد و شبکه آنزیمی سیستم میتوکندریایی بدرستی کار کند[۱۶]. برای انجام این آزمون از پلیت‌های ۹۶ خانه استفاده کرده، به طوری که به هر یک از چاهک‌های این پلیت محیط کشت کامل و سپس سوسپانسیون سلولی اضافه شد که به این عمل سید کردن گفته می‌شود. سپس سلول‌ها با غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از نانو ذرات در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند و طی زمان‌های ذکر شده به هر چاهک ۱۵ میکرو لیتر از محلول MTT (شرکت Sigma, France) اضافه گردید. سپس پلیت‌ها را فویل پوشانده، زیرا محلول MTT در محیط تاریک واکنش می‌دهد. سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (شرکت Merc) به عنوان حلال فورمازان به چاهک‌ها اضافه شد که باعث کنده شدن کریستال‌های فوماراز می‌شود. در آخر میزان رنگ تولیدی توسط دستگاه الایزا ریدر در طول ۴۹۷ تا ۶۰۳ نانومتر تعیین شد. سرانجام میزان سمیت اعمال شده و زیستایی سلول‌ها از فرمول‌های ذیل محاسبه گردید:

$$\text{درصد توان زیستی} = \frac{\text{میانگین جذب نوری خانه های هر غلظت}}{\text{میانگین جذب نوری خانه کنترل‌های}} \times 100$$

در نهایت با استفاده از ترسیم نمودار، IC_{50} (غلظتی از نانوذره نقره سنتز شده از گیاه *Amaranthus cruentus* که منجر به کشته شدن ۵۰ درصد سلول‌ها می‌شود) به دست آمد. برای انجام این آزمایش سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت نانو ذره (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) در فلاسک‌های ۲۵ میلی لیتری تیمار شد و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس برای استخراج RNA، سانتریفیوژ انجام شد. در این بررسی جهت استخراج RNA از دستورالعمل کیت Roche آلمان استفاده گردید. در نهایت در راستای افزایش دقت و کارایی روش مورد استفاده در استخراج RNA از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ استفاده گردید. در این روش میزان یک میکرولیتر از RNA استخراج شده را در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ مورد ارزیابی قرار داده شد. جهت تأیید یافته‌ها نیز می‌توان از روش الکتروفورز استفاده نمود. به علت حساسیت بیشتر و پایداری کم‌تر RNA نسبت به DNA، پس از استخراج RNA، باید به سرعت DNA از روی آن سنتز شود. برای سنتز cDNA، از کیت سنتز Fermentase و پروتکل موجود در آن استفاده گردید. ژن خانه دار (GAPDH: Glyceraldehyde-3 phospha dehydrogenase) به دلیل دارا بودن بیان ثابت در غلظت‌های مختلف نانوذرات، به عنوان ژل کنترل در نظر گرفته شد. پس از سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهایی که در جدول ۱ ذکر شده‌اند، Real-time PCR به کمک دستگاه BioRad انجام شد. در انتهای سیکل‌های تکثیر، منحنی دمای ذوب به منظور حصول اطمینان از اختصاصی بودن و عدم وجود محصول غیراختصاصی رسم شد.

جدول ۱: توالی پرایمر

Gene	Forward 5→3	Reverse 5→3
GAPDH	5'CAAGGTCATCCATGACAACTTTG3'	5'GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG3'
BAX	5' TTTGCTTCAGGGTTTCATCCA 3'	5'CTCCATGTTACTGTCCAGTTCGT3
Bcl2	5'CATGTGTGTGGAGAGCGTCAAC3'	5'CAGATAGGCACCCAGGGTGAT3'

جهت بررسی توان حیاتی سلول‌ها و بیان ژن‌های آپوپتوزی در سلول‌های MDA تیمار شده با نانوذره نقره و بررسی وجود اختلاف معنی دار در یافته‌ها، از نرم افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و LSD استفاده شد.

یافته‌ها

بر اساس الگوی XRD، اندیس‌های میلر در سطوح (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) که به ترتیب مربوط به زوایای ۳۸/۱۴۳، ۴۶/۲۵۵، ۶۴/۵۱، ۷۷/۰۱۱ درجه می‌باشد وجود نانو کریستالهای نقره را درتایید می‌کند. سایر پیک‌ها تشکیل متالو پروتئن‌ها (اتصال بین نقره و پروتئن‌های موجود در عصاره گیاه) را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از پراش اشعه ایکس، تأیید کننده این است که نانوذرات سنتز شده است و ساختار نانو ذره نقره طبق نمونه الگو با پراش‌ها و زاویه‌های صحیح تشکیل شده است (تصویر ۱، الف).

پیک‌های ظاهر شده در طیف FT IR مربوط به گروهای عاملی موجود در ترکیبات آلی گیاه تاج خروس در اطراف نانو ذرات نقره می‌باشد.

در طیف IR پیک در ۳۲۷۱ و ۲۹۱۹ cm^{-1} مربوط به گرو عاملی NH است.

پیک در ۲۸۷۲ cm^{-1} مربوط به گروه عاملی CH است.

پیک در ۱۶۴۴ cm^{-1} مربوط به گروه عاملی کربونیل است.

پیک در ۱۳۸۵ cm^{-1} مربوط به OH فنولی می‌باشد.

پیک در ۱۰۶۴ cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی CN می‌باشد.

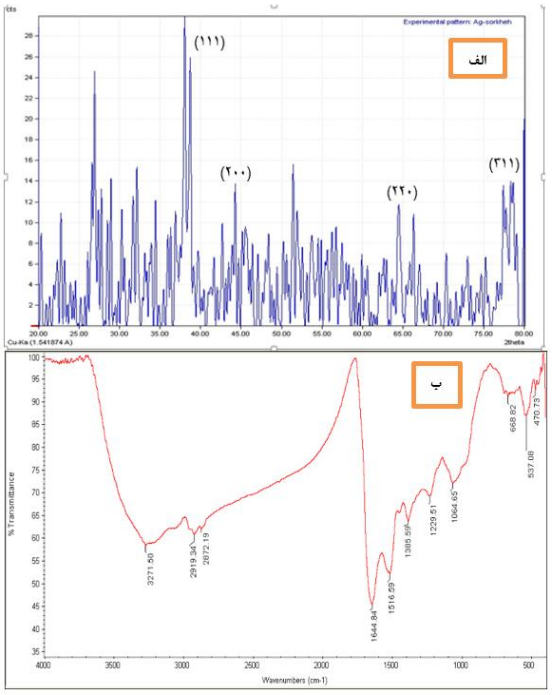
یافته‌های حاصل از آزمون MTT نشان داد که زیستایی سلول‌ها، به هر دو عامل غلظت نانو ذره و زمان بستگی دارد. در زمان‌ها و غلظت‌های ابتدایی سلول‌ها دارای توان حیاتی بیشتری هستند و در زمان‌ها و غلظت‌های بعدی، این سلول‌ها غالباً به میزان بیشتری دچار مرگ می‌شوند. در این بررسی نشان داده شد که نانو ذرات نقره تولید شده توانایی مهار تکثیر سلول‌های سرطانی MDA را دارند. IC_{50} در ۲۴ ساعت بعد از تیمار نانو ذره حدود ۴۷ µg/ml، در ۴۸ ساعت حدود ۴۵ µg/ml و در ۷۲ ساعت ۳۱ µg/ml گزارش شد (تصویر ۲).

طبق نتایج بدست آمده از دستگاه طیف سنجی FTIR، می‌توان ساختار ترکیب‌های آنالیز شده نانو ذرات نقره سنتز شده به روش سبز از عصاره گیاه تاج خروس را مشاهده نمود وهم‌چنین، گونه‌های مولکولی (مخصوصاً گونه‌های آلی (با استفاده از گروه‌های عامل بر روی ترکیبات مولکولی نانو ذرات نقره سنتز شده از گیاه تاج خروس را شناسایی کرد (تصویر ۱، ب).

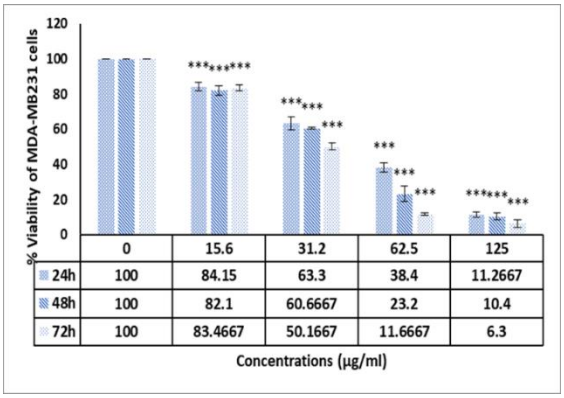
در این مطالعه جهت ارزیابی بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 از روش Real-Time PCR استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت نانوذره، بیان ژن Bcl-2 که محصولات آن نقش مهار کننده آپوپتوز را دارند کاهش یافته است، در حالی که با افزایش غلظت نانوذره، بیان ژن Bax که پیش‌برنده آپوپتوز است، در سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره به طور قابل توجهی افزایش یافته است (تصویر ۳، الف و ب).

بحث

یکی از عرصه‌های جذاب در زمینه فناوری نانو، القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی می‌باشد. اثرات نانوذرات نقره در افزایش و کاهش بیان ژن Bax و Bcl-2 در سلول‌های سرطانی و القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی در پژوهش‌های بسیاری نشان داده شده‌است. هم‌چنین اثر سیتوتوکسیک نانوذرات نقره در مطالعات مختلف بر روی رده‌های سلولی متعددی مورد ارزیابی قرار گرفته است. به عنوان مثال Sukirtha و همکارانش اثر سمیت نانو ذره نقره را بر روی رده سلولی Hela مورد ارزیابی قرار دادند.



تصویر ۱: الف) نتایج پراش اشعه ایکس نانو ذرات نقره سنتز شده از گیاه تاج خروس توسط دستگاه XRD ب) نتایج طیف سنج مادون قرمز نانو ذرات نقره سنتز شده از گیاه تاج خروس توسط دستگاه FTIR



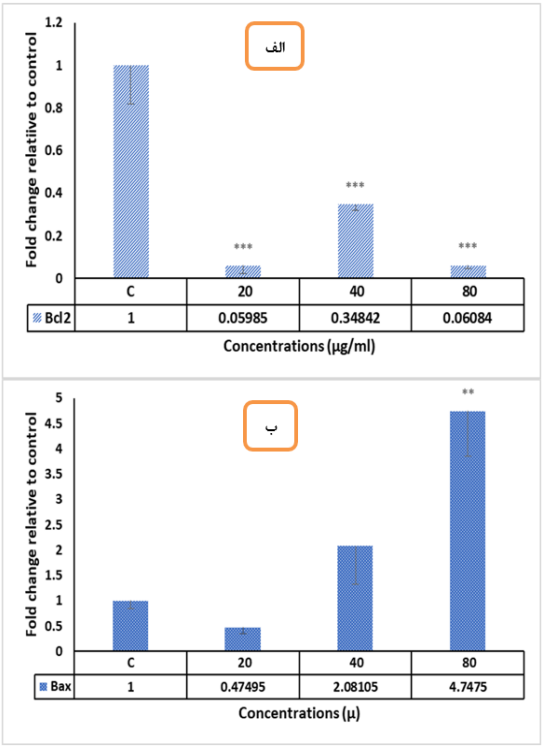
	0	15.6	31.2	62.5	125
24h	100	84.15	63.3	38.4	11.2667
48h	100	82.1	60.6667	23.2	10.4
72h	100	83.4667	50.1667	11.6667	6.3

تصویر ۲: اثر نانوذره نقره تولید شده از گیاه تاج خروس بر توان حیاتی سلول‌های سرطان پستان (MDA).

*** معرف اختلاف معنا دار در حد P< ۰/۰۰۱

در این مطالعه نانوذرات نقره به روش سبز توسط گیاه زیتون تلخ تولید شده بودند. دوز کشنده نانوذرات علیه سلول‌های HeLa، ۳۰۰

میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. با استفاده از رنگ آمیزی اکریدین- اورنج و اتیدیوم بروماید، مشخص شد که نانوذرات نقره منجر به القاء آپوپتوز در رده سلولی Hela شدند[۱۷] که نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز منجر به القاء آپوپتوز شده با این تفاوت که نانو ذره نقره در این پژوهش در غلظت‌های کمتری دارای اثر کشندگی می‌باشد. Govender و همکارانش اثرات نانوذرات نقره سنتز شده توسط *گیاه Albizia adianthifolia* را بر القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان ریه، رده سلولی A549 مورد بررسی قرار دادند. داده‌های حاصل نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده باعث کاهش زنده ماندن سلول‌ها (به صورت وابسته به غلظت) و افزایش میزان آپوپتوز از طریق مسیر درونی (میتوکندری) می‌شوند[۷] و هم چنین نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر بیان کننده همین امر است که اثر کشندگی وابسته به غلظت و زمان می‌باشد.



تصویر ۳: تغییرات بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 در گروه تیمار با نانو ذره نقره و گروه کنترل. نتایج نشان داد که بیان ژن Bcl-2 کاهش و بیان ژن Bax نسبت به کنترل به صورت معنی داری افزایش یافته است.
** معرف اختلاف معنا دار در حد P< ۰/۰۱. *** معرف اختلاف معنا دار در حد P< ۰/۰۰۱

صالحی و همکارانش اثر ضد سرطانی و ضد باکتری نانو ذرات نقره سنتز شده از *Artemisia marschalliana Sprengel* بر سلول‌های AGS مورد ارزیابی قرار دادند. ارزش IC_{50} مربوط به AgNP در سلول AGS سرطان معده ۲۱/۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که غلظت بالاتر از ۳/۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر باعث کاهش زیستایی می‌شود. هم‌چنین نتایج حاصل از رنگ آمیزی آنکسین v/pi نشان داد که سلول‌های آپوپتوز شده تحت تیمار نانو ذره، حدود ۷ تا ۳۰ درصد در مقایسه با کنترل افزایش پیدا کرده‌اند[۱۸] که در مقایسه با پژوهش حاضر بیشترین اثر کشندگی و القا آپوپتوز را دارد. بهارآرا و همکارانش اثر نانو ذرات نقره سنتز شده از عصاره *گل Achillea biebersteinii* را در القاء آپوپتوز در رده سلولی MCF-7 از طریق فعال سازی کاسپاز و و تنظیم بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 مورد بررسی قرار دادند.میزان IC_{50} در ۲۴ ساعت معادل ۲۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بدست آمد. در این مطالعه القاء آپوپتوز نانوذرات نقره بر روی رده سلولی MCF-7 از طریق تست MTT، رنگ آمیزی DAPI، رنگ آمیزی اکریدین – اورنج و فعالیت کاسپاز مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از RT-PCR بیان ژن‌های Bax، Bcl-2، کاسپاز-۳،-۸و-۹ بررسی شد. اثرات وابسته به غلظت نانوذرات نقره منجر به کاهش توان حیاتی سلول‌ها، تکه‌تکه شدن اسید نوکلئیک، جلوگیری از تکثیر سلولی، و القاء آپوپتوز بر روی رده سلولی MCF-7 با سرکوب ژن‌های خاص چرخه سلولی شد[۱۹] و در مقایسه با پژوهش حاضر دارای ارزش IC_{50} کمتری می‌باشد، به این معنا که دارای اثر گذاری بیشتری نسبت به نانو ذره سنتز شده در پژوهش حاضر است. احمدیان و همکارانش اثر نانوذرات نقره را در القاء آپوپتوز بر روی رده سلولی (HepG2) مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که کاهش زنده ماندن سلول به غلظت وابسته می‌باشد و IC_{50} معادل ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر برای نانو ذره نقره بدست آمد. علاوه بر سمیت، این نانو ذره در القاء ROS و آپوپتوز در سلول‌های HepG2 اثر بالقوه دارد[۲۰]. حیدری و رشید پور اثر سمیت نانو ذرات نقره سنتز شده با استفاده *Oak Fruit Hull (Jaft)* را مورد بررسی قرار دادند. اثرات سیتوتوکسیک بر روی رده سلولی MCF7 انجام گرفت. میزان IC_{50} بدست آمده از این مطالعه معادل ۰،۰۴ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. یافته‌ها نشان می‌دهد که اثرات سیتوتوکسیک سنتز شده از عصاره *Jaft* در سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد[۲۱] و میزان IC_{50} بسیار کمتر از پژوهش حاضر می‌باشد. Çiftçi و همکارانش اثرات سمیت و آپوپتوزی نانوذرات نقره را بر روی رده سلولی MCF7 مورد ارزیابی قرار دادند. میزان IC_{50} برای رده سلولی MCF7 معادل ۴۰ میکرو گرم بر میلی لیتر بدست آمد. یافته‌های به دست آمده نشان دهنده آن است که نانوذرات نقره بر روی زنده ماندن و بقای سلول‌ها به صورت وابسته به غلظت اثر چشمگیری دارند. علاوه بر این، نتایج حاصل نشان داد که نانوذرات نقره در ایجاد آپوپتوز و نکروز در سلول‌های MCF7 نقش دارند[۲۲] که نتایج حاصل از پژوهش حاضر تقریباً مشابه با این مطالعه می‌باشد. موسوی و همکارانش اثرات نانوذرات نقره سنتز شده توسط *گیاه Artemisia turcomanica* را بر القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان سرطانی معده (AGS) مورد بررسی قرار دادند. سمیت سلولی نانوذرات به روش MTT در سلول‌های سرطانی معده (AGS) و همچنین سلول‌های فیبروبلاست طبیعی (L-929) مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های حاصل نشان دهنده آن بود که با افزایش غلظت نانوذرات طول عمر سلول‌ها نیز کاهش یافته است، همچنین افزایش آپوپتوز در سلولهای درمان شده با نانوذرات نقره نسبت به سلولهای درمان نشده مشاهده شد($P > ۰/۰۰۱$) [۲۳].

مقایسه تمامی مطالعات بالا با پژوهش حاضر نشان می‌دهد که نانوذرات نقره تولید شده به روش‌های زیستی و شیمیایی دارای خاصیت سایتوتوکسیک برعلیه بسیاری از رده‌های سلول‌های سرطانی می‌باشند و توانایی القاء آپوپتوز را از طریق مسیرهای مختلفی دارند.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش نانو ذرات نقره به روش سبز توسط گیاه تاج خروس سنتز گردید. اثر این نانو ذرات بر میزان بقای سلول‌ها و هم‌چنین توانایی القاء آپوپتوز این نانو ذرات در سلول‌های سرطانی پستان رده MDA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که این نانو ذرات به صورت وابسته به غلظت و زمان، زیست پذیری سلول‌ها را کاهش می‌دهند. بر اساس محاسبه IC_{50} مشخص شد که غلظت ۴۷ میکروگرم بر میلی لیتر در ۲۴ ساعت، غلظت ۴۵ میکروگرم بر میلی لیتر در ۴۸ ساعت و غلظت ۳۱ میکروگرم بر میلی لیتر در ۷۲ ساعت منجر به مرگ ۵۰ درصد سلول‌ها شده است، هم‌چنین بررسی تغییرات بیان ژن Bax و Bcl-2 با استفاده از Real time PCR مشخص کرد که با افزایش غلظت نانوذرات نقره بیان ژن آنتی آپوپتیک (Bcl-2) کاهش و بیان ژن پرو آپوپتیک (Bax) افزایش یافته است و سبب راه اندازی فرآیند مرگ سلولی برنامه ریزی شده گردید.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد خانم حدیثه یوسفی‌راد می‌باشد. بدینوسیله نویسندگان مقاله از کارکنان گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد کمال تشکر و قدردانی را دارد.
کلیه امور پژوهشی انجام شده در این تحقیق بر اساس موازین اخلاق در پژوهش صورت پذیرفته و کد اخلاق به شماره IR.IAU.MSHD.REC. 1397. 090 جهت این تحقیق اخذ شده است.

References

1. 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
2. Mansoori GA, Mohazzabi P, McCormack P, Jabbari S. Nanotechnology in cancer prevention, detection and treatment: bright future lies ahead. World Rev Sci Technol Sustain Dev. 2007;4(2-3):226-57.
3. 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
4. Yezhelyev MV, Gao X, Xing Y, Al-Hajj A, Nie S, O'Regan RM. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. Lancet Oncol. 2006;7(8):657-67. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70793-8 pmid: 16887483
5. Banerjee P, Satapathy M, Mukhopahayay A, Das P. Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. Bioresour Bioproc. 2014;1(1):3.
6. Marambio-Jones C, Hoek EM. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. J Nanopart Res. 2010;12(5):1531-51.
7. Govender R, Phulukdaree A, Gengan RM, Anand K, Chuturgoon AA. Silver nanoparticles of Albizia adianthifolia: the induction of apoptosis in human lung carcinoma cell line. J Nanobiotechnology. 2013;11(1):5. doi: 10.1186/1477-3155-11-5 pmid: 23418790
8. Kalishwaralal K, Barathmanikanth S, Pandian SR, Deepak V, Gurunathan S. Silver nano - a trove for retinal therapies. J Control Release. 2010;145(2):76-90. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.03.022 pmid: 20359511
9. Lara HH, Ayala-Nunez NV, Ixtepan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. J Nanobiotechnology. 2010;8(1):1. doi: 10.1186/1477-3155-8-1 pmid: 20145735
10. Moaddab S, Ahari H, Shahbazzadeh D, Motallebi AA, Anvar AA, Rahman-Nya J, et al. Toxicity study of nanosilver (nanocid?) on osteoblast cancer cell line. Int Nano Letters. 2011;1(1):11.
11. 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
12. Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: programmed cell death. J Qazvin Univ Med Sci. 2013;17(3):48-57.
13. Mahmood Z, Shukla Y. Death receptors: targets for cancer therapy. Exp Cell Res. 2010;316(6):887-99. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.12.011 pmid: 20026107
14. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(6):2129-44. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.6.2129 pmid: 25824729
15. Quaresma P, Soares L, Contar L, Miranda A, Osório I, Carvalho PA, et al. Green photocatalytic synthesis of stable Au and Ag nanoparticles. Green Chem. 2009;11(11):1889-93.
16. Ho WY, Yeap SK, Ho CL, Rahim RA, Alitheen NB. Development of multicellular tumor spheroid (MCTS) culture from breast cancer cell and a high throughput screening method using the MTT assay. PLoS One. 2012;7(9):e44640. doi: 10.1371/journal.pone.0044640 pmid: 22970274
17. Sukirtha R, Priyanka KM, Antony JJ, Kamalakkannan S, Thangam R, Gunasekaran P, et al. Cytotoxic effect of Green synthesized silver nanoparticles using Melia azedarach against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model. Proc Biochem. 2012;47(2):273-9.
18. Salehi S, Shandiz SA, Ghanbar F, Darvish MR, Ardestani MS, Mirzaie A, et al. Phytosynthesis of silver nanoparticles using Artemisia marschalliana Sprengel aerial part extract and assessment of their antioxidant, anticancer, and antibacterial properties. Int J Nanomedicine. 2016;11:1835-46. doi: 10.2147/IJN.S99882 pmid: 27199558
19. Baharara J, Namvar F, Ramezani T, Mousavi M, Mohamad R. Silver nanoparticles biosynthesized using Achillea biebersteinii flower extract: apoptosis induction in MCF-7 cells via caspase activation and regulation of Bax and Bcl-2 gene expression. Molecules. 2015;20(2):2693-706. doi: 10.3390/molecules20022693 pmid: 25665064
20. Ahmadian E, Dizaj SM, Rahimpour E, Hasanzadeh A, Eftekhari A, Hosain Zadegan H, et al. Effect of silver nanoparticles in the induction of apoptosis on human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2018;93:465-71. doi: 10.1016/j.msec.2018.08.027 pmid: 30274079
21. Heydari R, Rashidipour M. Green synthesis of silver nanoparticles using extract of oak fruit hull (jaft): synthesis and in vitro cytotoxic effect on mcf-7 cells. Int J Breast Cancer. 2015;2015:846743. doi: 10.1155/2015/846743 pmid: 25685560
22. Ciftci H, TÜRK M, TAMER U, Karahan S, Menemen Y. Silver nanoparticles: cytotoxic, apoptotic, and necrotic effects on MCF-7 cells. Turk J Biol. 2013;37(5):573-81.
23. 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;46(sup1):499-510. doi: 10.1080/21691401.2018.1430697 pmid: 29361855