سنتز سبز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه دِرمنه (Artemisia tschernieviana) و بررسی سمیت سلولی آن روی رده های سلولی سرطانی کولون (HT29) و نرمال (HEK293)

حوریه خلیلی[1]، فهیمه باغبانی آرانی[1*]

۱) گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین– پیشوا، ایران

تاریخ دریافت:۹۵/٤/۱۹ تاریخ پذیرش:۹۵/۸/۱

چکیده:

مقدمه : امروزه، علی رغم کاربرد های بسیار گسترده نانو مواد، اطلاعات محدودی در رابطه با اثرات آن ها بر سلامت بشر در دسترس می باشد. هدف از انجام این تحقیق، سنتز سبز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاهی و ارزیابی سمیت آن بر روی رده های سلولی سرطان کولون HT29 و نرمال HEK293 می باشد.

مواد و روش ها: سنتز نانو ذرات نقره از روش رسوب گذاری با احیای یون های نقره توسط عصاره گیاهی درمنه انجام گرفت. نانو ذرات نقره با استفاده ازآنالیز طیف سنجی مرئی فرا بنفش، میکروسکوپ الکترونی گذاره و روبشی تایید شدند. اثرات سمیت سلولی نانو ذرات بر روی سلول ها با روش رنگ سنجی MTT طی ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌های پژوهش: وجود پیک در طول موج ۴۳۰ نانومتر برای نانو ذرات نقره سنتز شده با آنالیز طیف سنجی مرئی فرا بنفش تایید شد. مطالعه ریخت شناسی روی اندازه و شکل نانو ذرات نقره نشان داد که نانو ذرات شکل کروی داشته و اندازه ای بین ۱۰ تا ۳۰ نانومتر قطر دارند. نتایج MTT نشان داد که اثر ضد تکثیری نانو ذرات بستگی به غلظت نانو ذره نقره سنتز شده دارد. تیمار رده سلولی سرطانی HT29 و نرمال HEK293 با نانو ذرات سنتز شده در غلظت ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر در مدت ۲۴ ساعت به ترتیب سبب کاهش بقای سلول ها به میزان ۱/۰۲ ± ۱۸/۵۵ (P<۰/۰۰۱) و ۰/۸۱ ± ۴۴/۴ (P<۰/۰۱) درصد شد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که نانو ذرات سنتز شده به روش سبز اثرات مهاری بیشتری برروی سلول های سرطانی کولون نسبت به سلول های نرمال از خود نشان می دهند.

واژه های کلیدی: نانو ذرات نقره، سنتز سبز، سمیت سلولی، سرطان کولون

* **نویسنده مسئول:** گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا، ایران

Email: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.2.91]

مقدمه

سرطان، دومین علت مرگ در کشور های در حال توسعه و اولین علت مرگ درکشور های توسعه یافته به شمار می رود. گستردگی و تنوع شیوع سرطان در طول ادوار پیشین منجر به پیشرفت روش‌های متنوع درمانی شده است که بسته به میزان پیشرفت، نوع، وسعت بیماری و وضعیت بیمار، ترکیبی از روش های مختلف جهت مبارزه و درمان سرطان مورد استفاده قرار می گیرد (۱). با وجود تلاش های فراوان در زمینه پیشگیری و درمان سرطان، این بیماری رشد فزاینده ای داشته و هم چنان یک عامل کشنده ی جهانی محسوب می شود. در این میان، سرطان کولون یکی از رایج ترین بدخیمی ها به شمار می رود که سالانه باعث مرگ بسیاری از افراد در کل جهان می شود و این نوع سرطان در مردان پس از سرطان پروستات به عنوان شایع ترین نوع سرطان به شمار می رود (۲). امروزه از روش های مختلفی جهت درمان سرطان استفاده می شود، که شامل جراحی، شیمی درمانی و اشعه درمانی می باشد که در اغلب موارد سلول های سالم نیز از بین می روند و این می تواند باعث اثرات سمی و عوارض جانبی در بیمار شود. بنابراین یافتن روش های نوین درمان سرطان با کاهش عوارض جانبی ضروری به نظر می رسد(۴،۳). یکی از روش هایی که اخیرا در پروژه های پزشکی سرطان بسیار گسترده شده است، استفاده از نانو ذرات به عنوان حامل و هم چنین هدف دار نمودن داروهای ضد سرطانی جهت تحویل اختصاصی دارو به بافت سرطانی و کم نمودن عوارض جانبی می باشند(۵). امروزه نانو ذرات فلزی به عنوان کاندیدای جذاب برای رساندن بسیاری از مولکول های دارویی کوچک یا بیو مولکول های بزرگ به خدمت گرفته شده است. نانوذرات فلزی به دلیل خواص فیزیکی منحصر به فرد خود به عنوان محصولی مهم در نانو تکنولوژی به طور گسترده ای مطالعه شده است. در میان نانو ذرات فلزی، نانو ذرات نقره (Silver nanoparticles) به عنوان یک محصول قوی از حوزه فناوری نانو پدید آمده است. این نانو ذرات طی چند سال گذشته به دلیل هدایت خوب (۶) ، ثبات شیمیایی (۷)، فعالیت کاتالیزوری (۸) و ضد میکروبی مورد استفاده بوده است(۱۰،۹). امروزه، کشف این ویژگی های اساسی نانو ذرات نقره منجر به اهمیت آن در زیست شناسی و نانو بیوتکنولوژی شده است. علاوه بر این، خاصیت ضد سرطانی نانو ذرات نقره در بسیاری از مطالعات نیز مشخص شده است. هم چنین، نانو ذرات نقره در آسیب به DNA و در افزایش بیان مولکول پروتئینی کاسپاز ۳ و به راه انداختن مرگ برنامه ریزی شده ی سلولی (آپوپتوز) نقش دارند و بنابراین منجر به میانجی گری و تکثیر سیگنال های مرگ می شوند. این امر در درمان سرطان بسیار حائز اهمیت است (۱۱). روش های مختلفی از جمله شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی به منظور سنتز نانو ذرات نقره گزارش شده است. روش های بیولوژیکی سنتز نانوذرات با استفاده از میکروارگانیسم ها (۱۲) ، آنزیم / پروتئین ها، گیاهان و یا عصاره های گیاهی (۱۳، ۱۴) به عنوان روش بسیار ساده ودوستدار محیط زیست به عنوان یک جایگزین آسان و مناسب برای روش های شیمیایی و فیزیکی مطرح شده است. از مزایای سنتز به روش های زیستی می توان به هزینه کمتر، سازگاری با محیط زیست و امکان تولید آسان در مقیاس بالا اشاره نمود. در این روش ها نیازی به استفاده از دما و فشار بالا نیست و همچنین نیازی به کشت سلول و مراحلی از این قبیل نیست (۱۵). به همین دلیل استفاده از عصاره گیاهان به عنوان منابع پایدار در دسترس در تهیه نانوذرات فلزی زیست سازگار توجه زیادی از پژوهشگران را به خود معطوف نموده است (۱۶). در سال های اخیر، عصاره چندین گیاه از جمله اکالیپتوس، چای، عصاره برگ سیکاس برای بیوسنتز نانو ذرات نقره (۱۴و۱۶) استفاده شده است. در این میان، استفاده از عصاره ی گیاه بومی درمنه جهت سنتز نانو ذرات از اهمیت بالایی برخوردار است. ترکیبات مختلفی از جمله Sequiterpeoinds, فلاونوئیدها، Coumarins، چربی، فنول، پورین، استروئیدها، Triterpenoids، Aliphatics و آرتمیسینین تاکنون از گیاه درمنه (۱۷) استخراج شده است. درمنه، گیاهی معطر و کوچک باگل های زرد رنگ می باشد و قسمت های هوایی آن به عنوان داروی ضد مالاریا استفاده می شود. طی قرن ها در طب سنتی آسیا برای درمان و پیشگیری از تب و لرز

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.2.91]

استفاده شده است. علاوه بر این، در مقالات مختلف مشخص شده است که آرتمیسینین موجود در این گیاه خواص ضد باکتریایی ، ضد قارچ، ضد لیشمانیا، آنتی اکسیدان، ضد تومور، و ضد التهابی دارد (۱۸). گیاه آرتمیزیا تزچرنیویانا از تیره کاسنی شامل ۱۰۰۰ جنس و حدود ۲۰۰۰ گونه می باشد. این جنس بیشتر حاوی ترکیبات ترپنوئیدی، ایزوترپنوئیدها و فلاونوئیدی است که از عوامل کاهش دهنده و احیا کننده نمک نقره به شمار می رود(۱۸). در این تحقیق، نانو ذرات نقره با روش سنتز سبز با استفاده از عصاره گیاهی آرتمیزیا تزچرنیویانا به عنوان عامل احیا کننده استفاده شد. سپس ارزیابی اثر سمیت نانو ذرات ساخته شده بر روی رده سلولی کولون با توجه به شیوع بالای این سرطان در جوامع امروزی هدف مطالعه قرار گرفت. به طوری که پس از تایید ساختار و مورفولوژی نانو ذرات نقره سنتز شده با روش سنتز سبز، میزان سمیت آن بر روی رده های سلولی سرطانی کولون (HT29) و نرمال (HEK293) بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره گیاهی و سنتز نانو ذرات: در این مطالعه، عصاره هیدرو الکلی اندام های هوایی گیاه آرتمیزیا به روش پرکولاسیون به مدت ۴۸ ساعت با استفاده از حلال اتانول ۸۰ درجه تهیه گردید. عصاره پس از صاف نمودن، توسط دستگاه تقطیر در خلاء تا حد خشکی تغلیظ شدند. عصاره خشک شده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. در نهایت برای انجام تست های بعدی محلول عصاره حاصل با فیلتر سرسرنگی ۲۰۰ نانو متر فیلتر شد (۱۷). جهت سنتز سبز نانو ذرات نقره از روش رسوب گذاری با احیای یون های نقره ($AgNO_3$) (مرک، آلمان) توسط عصاره اندام های هوایی عصاره گیاه انجام گرفت. نانو ذرات نقره با افزودن ۴ میلی لیتر از حجم عصاره گیاهی با غلظت ۰/۰۱ میلی مولار نیترات نقره تحت شرایط دمای اتاق و همزدن سنتز شدند. احیای کامل یون های Ag^+ به نانو ذرات نقره با طیف سنجی و تغییر رنگ محیط مورد ارزیابی قرار گرفته شد. پس از گذشت پنج دقیقه از زمان واکنش و تغییر رنگ محلول، سه مرتبه شستشوی رسوب با آب مقطر طی سانتریفیوژ (Germany،Eppendorf 5804R) با دور ۱۳۰۰۰rpmبه مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت (۱۹).

تأیید نانو ذرات نقره: تایید نانو ذرات نقره با تغییر رنگ واکنش وآنالیز طیف سنجی مرئی فرابنفش نانو ذرات نقره با استفاده از دستگاه طیف سنجی UV-vis (JASCO V-670 Spectrophtometer) بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر بعد از گذشت پنج دقیقه از زمان واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بررسی ریخت شناسی و تایید اندازه نانو ذرات نقره، یک قطره از نمونه سوسپانسیونی ذرات بر روی گرید فیلم کربنی قرار داده شد و پس از خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی گذاره (Leo 906) (TEM مدل Zeiss۱۰۰ KV)، ساخت کشور آلمان با ولتاژ شتاب دهنده ۱۲۰ کیلوولت تصویر برداری شد. همچنین ارزیابی اندازه و مورفولوژی نانو ذرات پس از پوشش دهی با طلا با استفاده از میکروسکوپی الکترونی روبشی (SEM) (سیگما، آلمان) نیز مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور، نانوذرات در مقداری آب حل شده و سوسپانسیون حاصل روی گرید طلا در ولتاژ ۲۵ کیلوولت و تحت فشار خلاء مورد تصویر برداری میکروسکوپ قرار گرفت. به منظور آماده سازی نانو ذرات بعد از سونیکاسیون و رقیق سازی برای ارزیابی های سمیت سلولی مورد استفاده قرار گرفت.

کشت سلول: رده های سلولی سرطانی کولون (HT29) و سلول جنینی کلیه (HEK293) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و به آزمایشگاه تحقیقاتی شرکت دانش بنیان جاوید بیوتک منتقل شد. سلول ها در محیط کشت $RPMI_{1640}$ حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS)، دو گرم در لیتر بی کربنات، دو میلی مولار گلوتامین، ، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر آنتی بیوتیک پنی سیلین- استرپتومایسین در در یک اتمسفر مرطوب با پنج درصد دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند.

بررسی میزان سمیت سلولی با استفاده از روش MTT: بررسی اثر نانو ذرات نقره زیستی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.2.91]

برروی رشد و تکثیر سلول های سرطانی و نرمال از روش رنگ سنجی، با استفاده از (۵،۴،۳ – دیمتیل تیازولیل –۲) –۲ ، ۵– دیفنیل تترازولیوم بروماید) MTT انجام شد. این روش براساس شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول های زنده انجام می گیرد (۱۳). برای انجام آزمایش، حجم ۱۰۰ میکرو لیتراز سوسپانسیون سلولی در هر خانه پلیت ۹۶ خانه ای، به گونه ای که هر میلی لیتر از محیط کشت حاوی ۱۰۰۰۰ سلول باشد، ریخته شد. مطابق با گزارشات قبلی، پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان انکوباسیون غلظت های مختلف ۳/۱۲۵ ، ۶/۲۵ ، ۱۲/۵ ،۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از نانو ذرات نقره انکوبه شدند (۱۹،۱۷). پس از طی زمان ۲۴ ساعت از تیمار سلول ها با نانو ذرات ، به هر خانه پلیت ۲۰ میکرو لیتر رنگ MTT (سیگما ، آلمان) با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور CO_2 دار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و شرایط تاریکی انکوبه شد. پس از طی زمان مذکور محیط کشت حاوی MTT به دقت خارج شد و به هر خانه پلیت حجم ۵۰ میکرو لیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) به منظور حل نمودن کریستال های فرمازان ارغوانی رنگ اضافه شد. سپس جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه قرائت گر الایزا (Organon Teknika, Boxtel, Belgium) در طول موج ۵۷۰ نانو متر پس از گذشت ۳۰ دقیقه انکوباسیون، اندازه گیری شد. نتایج حاصله به صورت میزان بقای سلولی و غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می شود به عنوان IC_{50} لحاظ شد (۱۴). آزمایش های این تحقیق به صورت سه بار تکرار انجام گرفت و درصد بقای سلولی طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

میزان بقای سلولی= (جذب نوری تست/جذب نوری کنترل)×۱۰۰

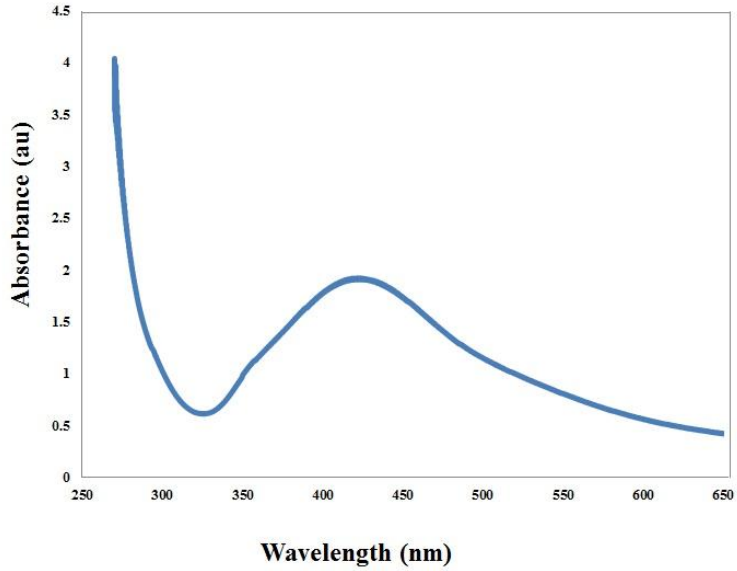
تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 22 و آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) با میزان خطای $P <$ ۰/۰۵ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش

تأیید سنتز سبز نانو ذرات نقره: بیوسنتز نانو ذرات با تغییر رنگ محلول طی پنج دقیقه پس از شروع زمان واکنش صورت گرفت. در طی فرایند سنتز، پیشنهاد می شد که یون های Ag^+ در معرض ترکیبات احیا کننده عصاره هم چون آلدهید، کتون، و ترپن قرار گرفته و از این طریق کاهش نمک نیترات نقره شروع می شود. احیای کامل یون های Ag^+ به نانو ذرات نقره با تغییر رنگ محیط و طیف سنجی انجام شد. رنگ محلول با افزودن عصاره ی گیاهی به محلول نیترات نقره به رنگ مایل به قرمز تغییر نمود که نشان دهنده ی احیای نیترات نقره و تشکیل نانو ذرات نقره در محلول است. وجود پیک در طول موج ۴۳۰ نانو متر برای نانو ذرات نقره با دستگاه طیف سنجی UV-vis طی زمان پنج دقیقه پس از انجام واکنش تایید شد (شکل ۱).

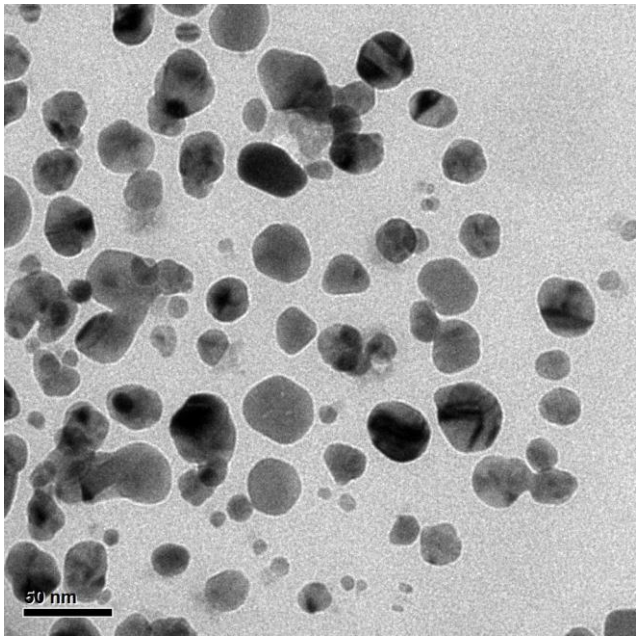
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.2.91]



شکل۱ . طیف سنجی UV-vis تشکیل نانو ذرات نقره طی زمان واکنش

تصاویر میکرو گراف میکروسکوپ الکترونی گذاره TEM (شکل۲) نشان می دهد که نانو ذرات سنتز شده دارای اندازه بین ۱۰ تا ۳۰ نانومتر بود.

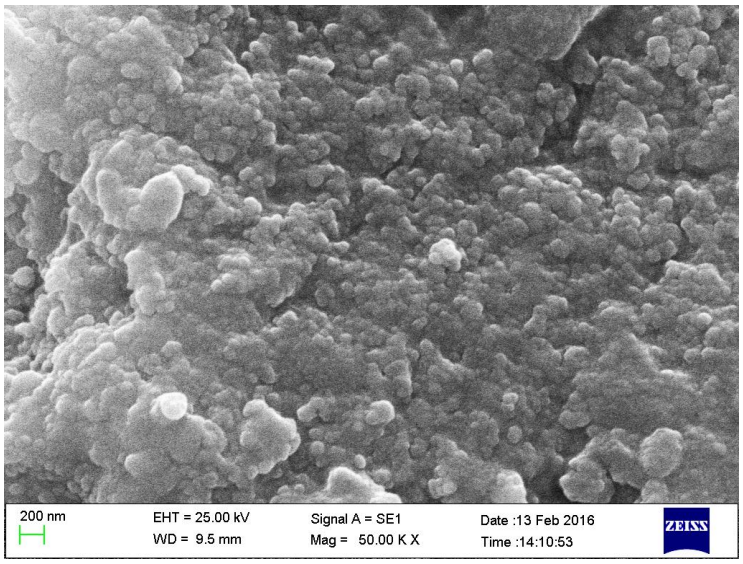


شکل ۲. میکرو گراف الکترونی گذاره از نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی

پروفایل توزیع اندازه نانوذرات سنتز شده به روش زیستی نشان دادکه با میانگین حدود ۲۲ نانومتر وجود دارند. هم چنین ریخت شناسی و اندازه نانو ذرات نقره زیستی از طریق میکرو گراف میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) ، با ولتاژ زیر ۲۵ کیلو ولت و تحت فشار خلاء (10^{-5} Torr) مورد ارزیابی قرار گرفت که نانو ذرات با اندازه میکروسکوپ الکترونی گذاره هم خوانی نشان داد. البته در برخی نقاط آگلومره شدن و تجمع رخ داده است که می توان با سونیکاسیون پخش نمود و سپس با دستگاه میکروسکوپ بررسی نمود (شکل۳).

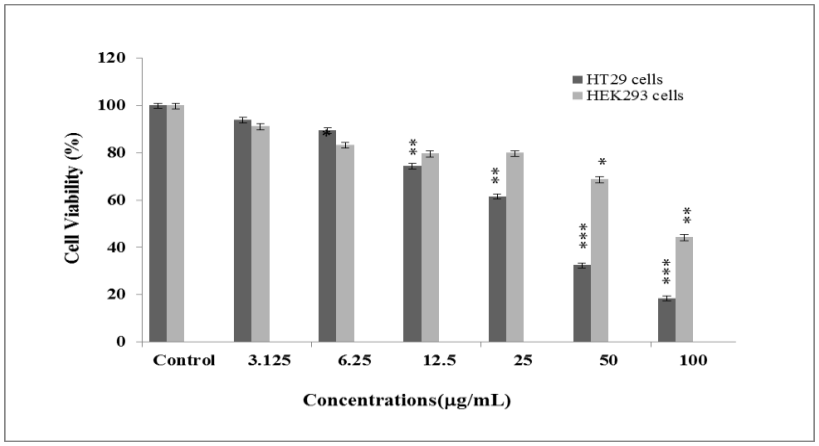
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.2.91]



شکل ۳. میکروگراف الکترونی روبشی از نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی.

تیمار سلول ها با نانو ذرات نقره: اثرات نانو ذرات نقره سنتز شده به روش سبز بر روی سلول های سرطانی کولون و نرمال با اندازه گیری حداقل و حداکثر غلظت محاسبه شد. اثر سمیت برروی سلول های سرطانی و نرمال با مقادیر غلظت µg/ml ۱۰۰- ۳/۱۲۵ از نانو ذرات نقره انجام گرفت و درصد زنده بودن سلول ها از صفر تا ۱۰۰ درصد زنده بودن پس از ۲۴ ساعت از زمان تیمار محاسبه شد. بطوریکه نتایج سنجش توان زیستی سلول ها بر اساس روش رنگ سنجی در نمودار ۱ آمده است.



نمودار ۱. اثر غلظت های متفاوت نانو ذرات نقره زیستی برروی سلول های رده ی سرطانی HT29 و نرمال HEK293 در مدت زمان ۲۴ ساعت : نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه های کنترل و به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش شده است P < ۰/۰۵ معنی دار درنظر گرفته شده است (*:P<۰/۰۵ ، **:P<۰/۰۱ ، ***: P<۰/۰۰۱).

مقایسه میانگین توانایی زیستی سلول سرطانی پس از گذشت زمان های فوق اختلاف معنا داری را نشان داد. نتایج نشان داد که اثر کشندگی برروی رده سلولی سرطانی HT29 وابسته به غلظت نانو ذرات است و بدین ترتیب مقدار IC_{50} طی ۲۴ ساعت برای نانو ذرات زیستی مقدار ۴۸/۹۷ میکرو گرم در میلی لیتر بدست آمد. هم چنین، میانگین توانایی زیستی سلول های رده نرمال HEK293 پس از زمان فوق انجام گرفت و مقدار IC_{50} برای نانو ذرات زیستی برروی این رده ی سلولی مقدار ۸۷/۳۳ میکرو گرم در میلی لیتر محاسبه شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.2.91]

بحث و نتیجه گیری

در سال های اخیر، طیف وسیعی از نانو ذرات در انتقال هدفمند دارویی به سلول های توموری بدخیم با کاهش سمیت سیستمیک دارو های ضد سرطانی به خدمت گرفته شده اند.(۶،۷) در این میان، خاصیت ضد سرطانی و ضد باکتریایی و برخی دیگر از خواص نانو ذرات نقره از چند دهه پیش مشخص شده و به همین دلیل سنتز این نانو ذرات از گستردگی بالایی برخوردار شده است. دست یابی به دانش سنتز نانوساختارها با استفاده از روش های زیست سازگار و یا اصطلاحاً روش های سبز اهمیت استفاده آن را در درمان انسانی بالا می برد. اخیرا در روش های زیستی از میکرو ارگانیسم هایی مثل باکتری ها و قارچ ها و یا از عصاره های گیاهان مختلف استفاده می‌کنند (۲۳، ۲۲). مطالعات نشان داده اند که مولکول های زیستی مانند پروتئین، فنل و فلاونوئید موجود در عصاره گیاهان نقش مهمی در کاهش یون های نانو به عنوان سرپوش یا کاهنده از نانو ذرات بازی کند. طی گزارش ها و مقالات مختلف از انواع بسیار زیادی از احیاء کننده های شیمیایی مختلفی در حلال های متفاوت برای سنتز نانو ذرات فلزی استفاده شده است. تا کنون در مطالعات از روش های بیولوژیکی عصاره های گیاهان مختلف برای سنتز نانو ذرات نقره و اثرات ضد سرطانی آن ها مورد ارزیابی قرار گرفته شده است. طی تحقیقی در سال ۲۰۱۲ کومار و همکاران با استفاده از عصاره گیاه *Cissus quadrangularis* نانو ذرات نقره را سنتز نموده و خاصیت ضد میکروبی آن ها را بررسی نمودند(۲۰). در سال ۲۰۱۳ سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از احیای عصاره برگ گیاهی *Eucalyptus chapmaniana* انجام گرفت و خواص ضد میکروبی و سمیت علیه رده سلولی لوسمی میلوئیتیک (HL-60) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه سمیت نانو ذرات نقره در زمان های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بررسی شد که این نانو ذرات منجر به کشندگی ۸۵ درصدی این رده سلولی سرطانی شده بودند (۱۹). هم چنین در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۱۲، Devi و همکاران سنتز نانو ذرات نقره از طریق احیای گیاهی *Ulva Lactuca* با سایز بین ۲۰ تا ۵۶ نانومتر را ارائه نمودند و اثرات ضد سرطانی آن روی رده های سلولی سرطانی پستان MCF-7 ، کبد HepG-2 ، کولون HT29 و سلول نرمال Vero را نشان دادند. در مطالعه آن ها اثرات سمیت بیشتر با مقدار IC_{50} برابر ۱۲/۵ میکرو گرم در میلی لیتر طی ۲۴ ساعت تیمار در مورد رده سلولی سرطان کبد نسبت به رده های سرطانی دیگر و رده سلولی نرمال مشاهده شد (۲۲). تا کنون مطالعه ای در خصوص سنتز سبز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه بومی آرتمیزیا تزچرنیویانا انجام نشده است و تنها مطالعات محدودی در زمینه سایر گونه های این گیاه در نقاط مختلف دنیا انجام گرفته شده است. ویجیاکومار و همکارانش در سال ۲۰۱۳ با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia nilagirica* سنتز نانو ذره نقره را گزارش دادند نتایج مطالعه آن ها نشان داد که این نانونقره تولید شده دارای خواص ضد باکتریایی است (۲۳). سنتز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاهی *Artemisia annua* توسط باساوگودا و همکاران در سال ۲۰۱۴، گزارش شد. در مطالعه آن ها اثرات ضد باکتریایی و ضد آنزیم تیروزیناز نانو ذرات نقره مورد مطالعه قرار گرفت. این محققان بیان کردند که نانو ذره نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاهی به عنوان احیا کننده قوی، مقرون به صرفه می باشد (۲۴). گزارش دیگر سنتز نانو ذرات توسط آرده و همکاران در سال ۲۰۱۴ با استفاده از عصاره گیاه آرتمیزیا پالنز ارائه شد. سنتز نانو نقره در این مطالعه با استفاده از عصاره گیاه منجر به تشکیل ذرات کروی با اندازه متوسط ۲۸ نانومتر شد. هم چنین، اثرات ضد باکتریایی نانو نقره تولید شده آن ها مورد بررسی قرار گرفت (۲۵). در تحقیق حاضر، اثرات نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی با استفاده از گیاه بومی آرتمیزیا تزچرنیویانا برروی تکثیر سلول سرطانی کولون (HT29) و سلول کلیه جنینی انسان (HEK293) با انجام آنالیز سمیت سلولی MTT در طی ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر کشندگی سلول ها، بستگی به زمان و غلظت نانو ذرات دارد. مقدار IC_{50} محاسبه شده برای نانو ذرات نقره در رده سلولی سرطانی HT29 کمتر از مقدار محاسبه شده IC_{50} در رده ی سلولی نرمال HEK293 در طی ۲۴ ساعت محاسبه شد. این نشان دهنده اثرات

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.2.91]

مهاری بیشتر نانو ذرات برروی سلول های سرطانی نسبت به سلول نرمال است که با توجه به یافته های مطالعات قبلی یکی از دلایل این پدیده می تواند اثر مستقیم نانو ذره بر روی سامانه تنفسی سلول در میتوکندری باشد(۲۰). به طور کلی القاء مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوز) توسط نانو مواد یکی از رویکردهای جذاب در حوزه ی نانو بیوتکنولوژی به شمار می رود. اثرات نانو ذرات 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 (۲۰،۷) مسیر آپوپتوز سلولی می تواند شامل به راه اندازی رویداد های پرو آپوپتوتیک اندامک سلولی میتوکندری باشد که با آزاد سازی سیتوکروم c از فضای بین دو غشا این اندامک به سیتوزول شروع می شود. بنابراین با توجه به میزان فعالیت بالای میتوکندری در فرایند تنفس سلول های سرطانی نسبت به سلول های طبیعی، بستر مناسبی برای عنصر نقره جهت تخریب سلول های سرطانی فراهم می شود(۲۷). یکی دیگر از دلایل، تفاوت های ریخت شناسی بین غشاء سلول های سرطانی و طبیعی از لحاظ تفاوت اندازه منافذ آن ها می باشد(۲۷). هم چنین اختلاف در شکل و اندازه حدود ۱۰ تا ۳۰ نانومتر این ذرات سنتز شده می تواند عامل دیگری در تفاوت قابل ملاحضه در میزان سمیت نانو ذرات بین سلول های سرطانی و نرمال در این مطالعه باشد. بنابراین پیشنهاد می شود مطالعات بیشتر در مورد خواص ضد سرطانی نانو ذرات فلزی انجام گیرد تا اهمیت پزشکی این نانوذرات بیشتر مشخص شود. به طور خلاصه در تحقیق حاضر، نانو ذرات نقره برای اولین بار با استفاده از گیاه بومی آرتمیزیا تزچرنیویانا سنتز گردید و اثرات سمی آن بر روی تکثیر سلول سرطانی کولون (HT29) و سلول نرمال کلیه جنینی انسان (HEK293) با انجام آنالیز سمیت سلولی MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق نتایج به دست آمده اثر کشندگی نانو ذره بر روی سلول ها، بستگی به زمان و غلظت آن ها دارد. هم چنین اثر مهاری نانوذره برروی سلول های سرطانی نسبت به سلول نرمال بیشتر می باشد که این ویژگی می تواند فاکتور مناسبی برای نانو ذره سنتز شده جهت مطرح شدن به عنوان یک ترکیب دارویی در درمان سرطان (به علت اثرات جانبی کم) در نظر گرفته شود.

References

1.Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, Macrobert AJ. Nanomaterials in combating cancer therapeutic applications and developments. Nanomedicine 2014; 10:19-34.

2.Vinod P, Siddik U. Nanoparticles in drug delivery and cancer therapy the giant rats Tail. J Cancer Therapy 2011; 2: 325-34.

3.Fock MM. The epidemiology and prevention of gastric cancer. Ali Pharmacol Ther 2014; 40:250-60.

4.Mateusz S, Robert A. Preparation and quality control of silver nanoparticle antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays. J Immun Met2013; 387: 262-9.

5.Aswathy R. Bio functionalized silver nanoparticles. Adv Pros Coll Sur Bio 2013; 105: 342-52.

6.Jiang H, Moon Ks, Li Y, Wong CP. Surface functionalized silver nanoparticles for ultrahigh conductive polymer composites. Chem Mater 2006; 18: 2969-73.

7.Mafune F, Kohno JY, Takeda Y, Kondow T, Sawabe H. Structure and stability of silver nanoparticles in aqueous solution produced by laser ablation. J Phys Chem B 2000; 104: 8333-7.

8.Jain PK, Huang X, Elsayed AH, Elsayed MA. Noble metals on the nanoscale optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology and medicine. Acc Chem Res2008; 41: 1578-86.

9.Jeeva K, Thiyagarajan M, Elangovan M, Geetha N, Venkatachalam P. Caesalpinia coriaria leaf extracts mediated biosynthesis of metallic silver nanoparticles and their antibacterial activity against clinically isolated pathogens. Indus Crops Prod2014; 52: 714-20.

10.Jia Z, Sun H, Gu Q. Preparation of Ag nanoparticles with triethanolamine as reducing agent and their antibacterial property*Colloids and Surfaces A.* Phys Eng Asp2013; 419: 174-9.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.2.91]

11.Philip D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa*. Physica 2010; 42: 1417-24.
12.Dubey SP, Lahtinen M, Silanpaa M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. Proce Biochem2010; 45: 1065-71.
13. Ahmad R, Khatoon N, Sardar M. Biosynthesis characterization and application of TiO2 nanoparticles in biocatalysis and protein folding. JPP 2013; 4: 115-21.
14.Mishra M, Sardar M. Alpha amylase mediated synthesis of silver nanoparticles. Sci Adv Mater 2012; 4: 143-6.
15.Yang J, Wang H, Wang Z, Tan X, Song C. Interaction between antitumor drug and silver nanoparticles: combined fluorescence and surface enhanced Raman scattering study. Chin Opt Lett 2009; 7: 894-7.
16.Ahmad R, Mohsin M, Sardar M. Alpha amylase assisted Synthesis of TiO2 nanoparticles structural characterization and application as antibacterial agents. J Hazard Mater 2015; 283: 171-7.
17.Vijay K, Pammi S, Kollu P, Satyanarayana K, Shameem U. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Boerhaavia diffusa plant extract and their anti bacterial activity. Ind Crop Prod 2014; 52: 562-6.
18.Abad MJ, Bedoya L, Apaza L, Bermejo P. The *Artemisia L.* Genus a review of bioactive essential oils. Molecules 2012; 17: 2542-66.
19.Sulaiman GM, Mohammed WH, Marzoog TR, Alamiery AA, Kadhum AA, Mohamad AB. Green synthesis antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. Asian Pac J Trop Biomed 2013; 3: 58-63.
20.Santhoshkumar T, Rahuman AA, Bagavan A, Marimuthu S, Jayaseelan C. Evaluation of stem aqueous extract and synthesized silver nanoparticles using Cissus quadrangularis against *Hippobosca maculata* and Rhipicephalus microplus. Exp Parasitol 2012;132: 156-65.
21.Salehi S, Shandiz SAS, Ghanbar F, Darvish MR, Ardestani MS, Mirzaie A, et al. Phytosynthesis of silver nanoparticles using Artemisia marschalliana sprengel arial part extract and assessment of their antioxidant anticancer and antibacterial properties. Int J Nanomed 2016;11:1835-46.
22.Saraniyadevi J, Valentinbhimba B. Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized by the Seaweed Ulva lactuca in vitro. Sci Rep 2012, 1: 242-8.
23.Vijayakumar M. Biosynthesis characterisation and anti bacterial effect of plant mediated silver nanoparticles using Artemisia nilagirica. Ind Crop Prod 2013; 41: 235-42.
24.Basavegowda N, Idhayadhulla A, Lee YR. Preparation of au and ag nanoparticles using *Artemisia annua* and their in vitro antibacterial and tyrosinase inhibitory activities. Mate Sci Eng Biol Appl 2014; 43:58-64.
25.Arde SM, Salokhe PR, Mane AH, Salunkhe RS. Facile green synthesis of silver nanoparticles by *Artemisia pallens* leaves extract and evaluation of antimicrobial activity. Chem Sci Rev Lett 2014;11: 557-65.
26.Basavaraja S, Balaji SD, Lagashetty A, Rajasabd AH, Venkataraman A. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. Mater Res Bull 2008; 43:1164-70.
27.Vaidyanathan R, Kalishwaralal K, Gopalram S, Gurunathan S. Nanosilver-the burgeoning therapeutic molecule and its green synthesis. Biotechnol Adv 2009; 27: 924-37.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.2.91]

Green Synthesized of Silver Nanoparticles Using Artemisia tschernieviana Extract and Evaluation of Cytotoxicity Effects on Human Colon Cancer (HT29) and Normal (HEK293) Cell Lines

*Khalili H[1], Baghbaniarani F[1]**

(Received: July 9, 2016 Accepted: October 22, 2016)

Abstract

Introduction: Nowadays, despite a different application of nanomaterials, there is a little information about their impact on human health. The current study deals with the green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) and evaluation of their cytotoxicity activity on human colon cancer (HT29) and human embryonic kidney (HEK293) cell lines.

Materials & methods: The AgNPs was obtained from plant extract as a reducing and capping agent under green synthesis method. The AgNPs was confirmed by Ultraviolet-visible (UV-vis), transmission electron microscopy (TEM), and scanning electron microscopy (SEM). The cytotoxicity effect of AgNPs on cell lines was evaluated by using MTT assay after 24 hours.

Findings: The fabricated AgNPs were monitored characteristic surface Plasmon resonance peak at around 430nm. The morphological study on size and shape of AgNPs demonstrated that the particles were of spherical shape with varying sizes ranging from 10 to 30 nm. MTT assay revealed a dose-dependent anti-proliferative effect of AgNPs. At 100µg/mL of synthesized AgNPs treated for 24 hours, the viability of HT29 and HEK293 cells was reduced to 18.55±1.02 ($P<0.001$), and 44.40±0.81 ($P<0.01$), respectively.

*Discussion & conclusion*s: Based on the current results, the green synthesized AgNPs show more inhibitory effect on colon cancer cells than the normal cells.

Keywords: AgNPs, Green synthesis, Cytotoxicity, Colon cancer

1 .Dept of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biological Science, Islamic Azad University, Varamin-Pishva Branch, Varamin, Iran
**Corrosponding author Email: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.2.91]