

اثرات سمیت نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره ماکرو جلبک Laurencia caspica روی رده سلولی سرطان پستان T47D

علی صالح زاده^{۱*}، سیدعطاءاله سادات شاندریز^۲، اکرم سادات نعیمی^۳

(۱) باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

(۲) گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

(۳) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۷

چکیده

مقدمه: در طی سالیان گذشته به کارگیری نانوذرات نقره (AgNPs) به خاطر فعالیت های ضد رگ زایی، ضد باکتریایی و ضد سرطانی بسیار جذاب بوده اند. هدف از انجام این تحقیق، سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره جلبک قرمز Laurencia caspica و ارزیابی سمیت آن بر روی رده های سلولی سرطان پستان T47D می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، بیوسنتز نانوذرات نقره توسط عصاره جلبک قرمز L.caspica انجام گرفت. تایید نانوذرات نقره با استفاده از روش های طیف سنجی مرئی فرابنفش (UV-vis)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) بررسی شد. رده های سلولی سرطان پستان T47D و نرمال MRC-5 با غلظت های مختلف نانوذرات نقره در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. میزان زیست پذیری سلول ها و میزان دوز ۵۰ درصد کشندگی (IC50) با روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: پیک طیف سنجی مرئی فرابنفش نانوذرات نقره سنتز شده در طول موج ۴۲۰ نانومتر تایید شد. مطالعه ریخت شناسی و اندازه نانوذرات از طریق میکروگراف میکروسکوپ الکترونی گذاره و روبشی نشان داد که نانوذرات اغلب شکل کروی داشته و اندازه ای بین ۱۰ تا ۵۰ نانومتر دارند. نتایج MTT نشان داد که نانوذرات نقره اثر وابسته به دوز و زمان داشته و میزان بقاء سلول ها را به طور معنی داری کاهش می دهد. مقدار IC50 در طی ۴۸ ساعت پس از تیمار با نانوذرات به ترتیب غلظت ۲۹/۳۷ میکروگرم در میلی لیتر و غلظت ۴۲/۱۳ میکروگرم در میلی لیتر برای سلول های T47D و MRC-5 محاسبه شد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که اثر کشندگی نانوذرات بیوسنتز شده بر روی سلول های سرطانی پستان نسبت به سلول های نرمال بیشتر است. بنا بر این، استفاده از این نانوذرات می تواند به عنوان یک راهکار امید بخش در درمان سرطان پستان مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: نانوذرات نقره، L.caspica، سمیت سلولی، سرطان پستان

*نویسنده مسئول: باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

Email:salehzadehmb@yahoo.com

Copyright © 2018 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.

مقدمه

با وجود تلاش های فراوان در زمینه پیشگیری و درمان سرطان، این بیماری به عنوان دومین عامل مرگ و میر پس از بیماری های قلبی-عروقی محسوب می شود (۱). در این میان، سرطان پستان از شایع ترین و مهلک ترین نوع سرطان در میان زنان به شمار می رود. به طوری که دومین علت مرگ ناشی از سرطان پس از سرطان ریه شناخته می شود (۲). درمان سرطان پستان شامل مجموعه ای از راهکارها برای تخریب، کنترل و یا برداشت بافت سرطانی اولیه یا پیشرفته است. تنوع و گستردگی شیوع سرطان در طول سال های گذشته موجب تکامل روش های درمانی متنوعی شده است که بسته به نوع، موقعیت، میزان پیشرفت، وسعت بیماری و وضعیت بیمار ترکیبی از روش های مختلف جهت مبارزه با سرطان مورد استفاده قرار می گیرد (۳). زنان مبتلا به سرطان پستان گزینه های متفاوتی برای درمان دارند از جمله آن ها جراحی، رادیو درمانی، شیمی درمانی، هورمون درمانی و درمان های زیستی است (۴). افزایش شیوع مرگ و میر ناشی از سرطان ها و نقص روش های شیمی درمانی و رادیو درمانی در فرم های پیشرفته سرطان نیاز به یافتن شیوه های نوین برای کنترل سرطان با کاهش عوارض جانبی احساس می شود (۵،۶). یکی از راهکارهایی که اخیراً در پروژه های پزشکی سرطان کمک شایانی به پیشرفت و توسعه روش های نوین علیه سرطان نموده، استفاده از نانوذرات در جهت تحویل اختصاصی داروهای ضد سرطانی به صورت هدف دار و کم نمودن عوارض جانبی می باشند (۷،۸). به کار گیری نانوذرات فلزی به دلیل کاربرد های فراوان و خواص منحصر به فرد خود به عنوان محصولی مهم در زیست شناسی و نانوتکنولوژی توجه بسیاری از محققین را به خود معطوف نموده است. در طی چند سال گذشته نانوذرات نقره (silver nanoparticles) به عنوان یک عامل درمانی در اثر بر روی بهبود زخم ها، مبارزه با میکروب ها و سرطان امیدوار کننده بوده است (۹). امروزه روش های مختلفی از جمله شیمیایی، فیزیکی و زیستی به منظور سنتز نانوذرات نقره گزارش شده است.

از میان آن ها روش های زیستی سنتز نانوذرات، برخلاف روش های فیزیکی و شیمیایی، به عنوان روش بسیار ساده، کم هزینه و دوستدار محیط زیست مطرح شده است (۱۰). در سال های اخیر، مطالعات مختلفی در جهت سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از منابع زیستی مختلفی از جمله عصاره های گیاهی، قارچ ها، میکروارگانیسم ها گزارش شده است (۱۱،۱۲). در این میان، عصاره جلبک ها منبعی از ترکیبات مفید و فعال زیستی هستند که تاکنون ترکیبات زیستی متعددی با گستره کاربردی متنوعی هم چون اثرات آنتی بیوتیکی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد سرطانی از آن ها شناسایی و مشتق شده است. جلبک ها علاوه بر نقش های بوم شناختی بسیار مهمی که در طبیعت دارند، به دلیل غنی بودن از مواد معدنی و ویتامین ها، قرن ها به عنوان غذایی سالم در رژیم غذایی انسان و یا برای مصارف دارویی مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۳).

جلبک های قرمز بدون تردید زیباترین گیاهان دریایی را تشکیل می دهند. بیش از چهار هزار گونه از آن ها یافت می شود که دریازی بوده و تعداد کمی در آب های شیرین زندگی می کنند. جلبک های قرمز غالباً به صورت غوطه ور و در بسیاری از نمونه ها در عمق آب ها زندگی می کنند (۱۴). در این میان، جلبک قرمز *Laurencia caspica* یکی از ماکرو جلبک های اکوسیستم دریای خزر است. که از جنس *Laurencia* است و از خانواده *Rhodomelaceae* قرار گرفته است (۱۵).

با توجه به این که تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از نانوذرات نقره تولید شده توسط عصاره جلبک قرمز سواحل دریای خزر *Laurencia caspica* در ارتباط با مهار تکثیر سلول های سرطان پستان ارائه نشده است، در پژوهش حاضر پس از تایید ساختار و ریخت شناسی نانوذرات نقره سنتز شده، اثرات سمیت این نوع از نانوذرات بر روی رده سلولی سرطانی پستان (T47D) مورد ارزیابی قرار می گیرد.

مواد و روش ها

تهیه عصاره جلبک و بیوسنتز نانوذرات: این مطالعه تجربی از اردیبهشت تا آبان ماه سال ۱۳۹۵ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت انجام شد. جمع آوری جلبک قرمز *Laurencia caspica* از سواحل رامسر انجام شد و عصاره هیدروالکلی آن به روش پرکولاسیون با استفاده از حلال متانول ۵۰ درجه تهیه گردید. عصاره ها پس از صاف نمودن، توسط دستگاه تقطیر در خلاء تا حد خشکی تغلیظ شدند و غلظت آن ها تعیین شدند. عصاره جلبک حاصل تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گردید. جهت بیوسنتز نانوذرات نقره، مقدار حجم ۶ میلی لیتر از عصاره جلبک با ۰/۰۱ میلی مولار از غلظت نمک نترات نقره (AgNO_3) (مرک، آلمان) در حجم ۱۰۰ میلی لیتر تحت همزدن و شرایط دمای اتاق مخلوط شدند. احیای کامل یون های Ag^+ به نانوذرات نقره با تغییر رنگ محیط مورد ارزیابی قرار گرفته شد. سپس، سه مرتبه شستشوی رسوب حاصل با آب دو بار تقطیر با استفاده از سانتریفیوژ (Eppendorf، آلمان) با دور ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت (۱۶).

تایید نانوذرات نقره: محلول حاوی نانوذرات نقره بیوسنتز شده از طریق UV-visible اسپکتروفتومتری (Biotech EPOCH, US) بین طول موج ۳۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر پس از گذشت یک ساعت از زمان واکنش بررسی شد. برای دستیابی به اندازه و ریخت شناسی نانوذرات بیوسنتز شده با جلبک از میکروسکوپی الکترونی نگاره (SEM) (Zeiss، آلمان) پس از پوشش دهی با طلا مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، نانوذرات در مقداری آب حل شده و سوسپانسیون حاصل روی گرید در ولتاژ ۲۵ کیلوولت مورد تصویربرداری میکروسکوپی قرار گرفت. هم چنین به منظور بررسی اندازه نانوذرات نقره، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) با بزرگ نمایی ۴۰ هزار بار عکس برداری شد. نمونه سوسپانسیونی نانوذرات نقره به مدت ۱۵ دقیقه اولتراسونیک شدند و یک قطره از آن بر روی گرید حاوی فیلم کربنی قرار داده شد و در دمای آزمایشگاه خشک شد. سپس با

استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی گذاره تصویربرداری شد (۵،۱۶).

تهیه و کشت سلول ها: سلول های رده سرطانی پستان (T47D) و سلول فیبروبلاست مشتق از ریه (MRC-5) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. رده های سلولی در محیط کشت سلول های جانوری RPMI₁₆₄₀ شامل ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS)، یک درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین (Gibco, USA)، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و پنج درصد دی اکسید کربن انکوبه شدند.

ارزیابی میزان بقاء و تکثیر سلولی با استفاده از روش MTT: ارزیابی اثر نانوذرات نقره بیوسنتز شده به روش زیستی بر روی رشد و بقاء سلول ها با استفاده از روش رنگ سنجی 2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (سیگما، آلمان) انجام گرفت. این روش بر اساس شکستن نمک زرد رنگ محلول در آب تترازولیوم به کریستال های بنفش فورمازان غیر محلول توسط آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی سلول های زنده انجام می گیرد و میزان رنگ کریستال های فورمازان متناسب با تعداد سلول های زنده و فعالیت سلولی می باشد (۵). برای انجام این آزمایش، در هر خانه پلیت ۹۶ خانه ای، در حدود ۱۰۰۰۰ عدد سلول کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان انکوباسیون سلول ها، غلظت های مختلف ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از نانوذرات نقره در طی زمان ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از طی زمان مذکور، به هر خانه پلیت، ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه شد و پلیت حاوی سلول ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس به منظور حل نمودن کریستال های فورمازان، محتوای محیط کشت چاهک ها به دقت تخلیه و با حجم ۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) جایگزین شدند. سپس میزان جذب نوری هر چاهک با استفاده از

دستگاه اسپکتروفتومتر (Epoch, BioTek, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر پس از گذشت ۱۵ دقیقه انکوباسیون، قرائت شد. غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می شود به عنوان غلظت مهاری (IC_{50}) لحاظ شد (۱۵). به منظور اطمینان از صحت نتایج این تحقیق، هر کدام از آزمایش ها به صورت سه بار تکرار انجام گرفت. درصد بقای سلولی طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

درصد بقای سلولی = (میانگین جذب نوری نمونه تیمار / میانگین جذب نوری نمونه کنترل) $\times 100$

داده های کمی این تحقیق با استفاده از نرم افزار SPSS vol.22 و به کمک آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و آزمون Tukey برآورد شد و حداقل سطح معنی دار بودن، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

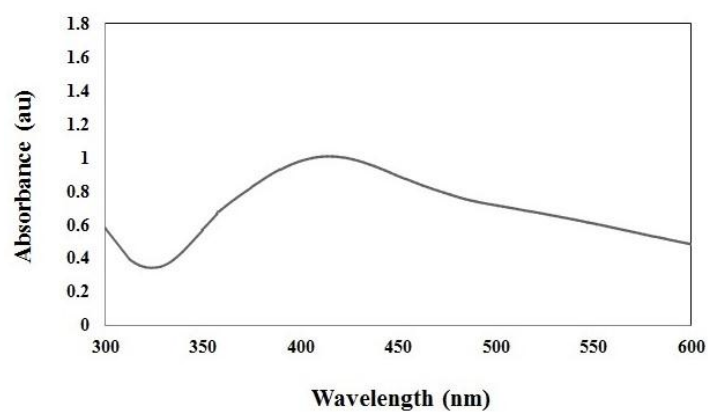
یافته های پژوهش

تایید بیوسنتز نانوذرات نقره: این تحقیق سنتز نانوذرات نقره از گونه ماکرو جلبک دریای خزر مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بیوسنتز نانوذرات نقره عصاره هیدروالکلی جلبک به محلول نیترات نقره اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق تحت کنترل قرار گرفت. یکی از نشانه های تولید نانوذرات تغییر رنگ محلول واکنش به قهوه ای پر رنگ بعد از طی یک ساعت انجام گرفت. این تغییر رنگ واکنش، نشانه احیای یون های نقره در محلول و سنتز نانوذرات نقره است. پس از تغییر رنگ محیط، احیای یون های Ag^+ و پایداری نانوذرات نقره از طریق اسپکتروفتومتر انجام شد. طیف ثبت شده در طول موج ۴۲۰ نانومتر برای نانوذرات نقره با دستگاه طیف سنجی UV-vis طی زمان یک ساعت از انجام واکنش تایید شد (شکل شماره ۱). مطالعه ریخت شناسی و قطر نانوذرات نقره سنتز شده از طریق عکس میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل شماره ۲). البته در برخی نقاط تجمع و آگلومره شدن این نانوذرات دیده می شود که می توان با سونیکاسیون پخش نمود و سپس با دستگاه میکروسکوپ بررسی نمود. برای پی

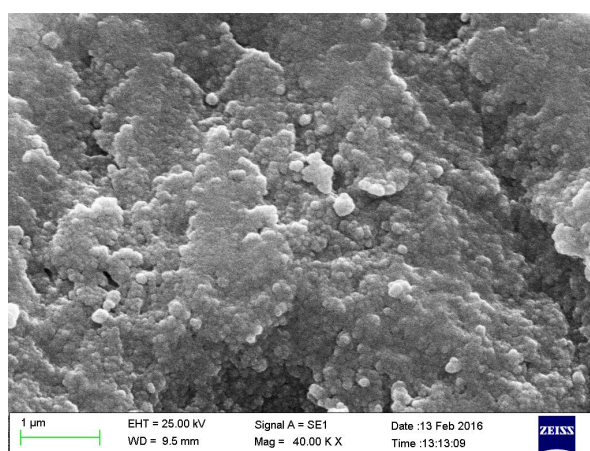
بردن به ریخت شناسی و اندازه نانوذرات بیوسنتز شده با جلبک از نتایج عکس برداری حاصل از میکروسکوپ الکترونی گذاره TEM استفاده شد. چرا که TEM راهی مطمئن برای تعیین شکل و اندازه نانوذرات است. ارزیابی تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره ثبت شده از روی نانوذرات نقره بر روی یک صفحه گرید پوشیده با کربن نشان داد که نانوذرات بیشتر کروی بوده و دارای اندازه ای بین ۱۰ تا ۵۰ نانومتر هستند (شکل شماره ۳).

ارزیابی میزان سمیت سلولی نانوذرات نقره با آزمون MTT: به منظور بررسی اثرات نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره جلبک قرمز *L. caspica* بر روی رشد و تکثیر رده های سلولی سرطانی پستان T47D و نرمال MRC-5 از روش رنگ سنجی MTT با اندازه گیری حداقل و حداکثر غلظت استفاده شد. اثر سمیت بر روی سلول های نرمال و سرطانی با مقادیر غلظت ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از نانوذرات نقره انجام گرفت و درصد بقاء سلول ها از صفر تا ۱۰۰ درصد زنده بودن پس از تیمار گزارش گردید.

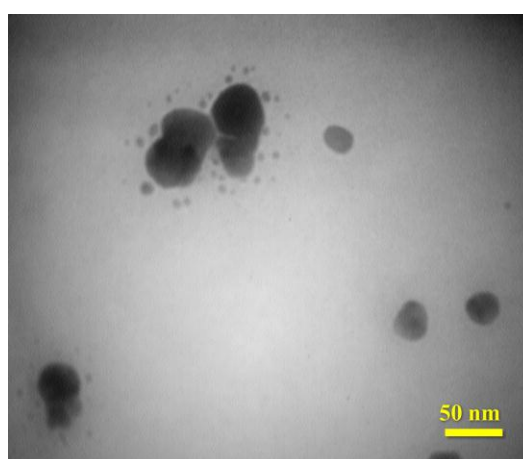
مقایسه میانگین توانایی زیستی رده های سلولی بر اساس روش رنگ سنجی مشخص شد (شکل شماره ۴ و ۵). با محاسبه غلظت مهاری IC_{50} مشخص شد که غلظت ۴۵/۲۴ میکروگرم در میلی لیتر در طی ۲۴ ساعت و غلظت ۲۹/۳۷ میکروگرم در میلی لیتر در طی ۴۸ ساعت از زمان واکنش باعث مرگ ۵۰ درصد از رده سلولی سرطانی T47D شده است. هم چنین، میانگین توانایی زیستی سلول های رده نرمال MRC-5 پس از زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت از تیمار انجام گرفت و مقدار IC_{50} برای نانوذرات زیستی بر روی این رده سلولی مقدار ۶۲/۱۱ میکروگرم در میلی لیتر و ۴۲/۱۳ میکروگرم در میلی لیتر در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار محاسبه شد. نتایج حاصل از تست MTT نشان داد نانوذرات نقره دارای اثر مهارکنندگی قوی وابسته به غلظت و زمان در تکثیر سلول ها دارند.



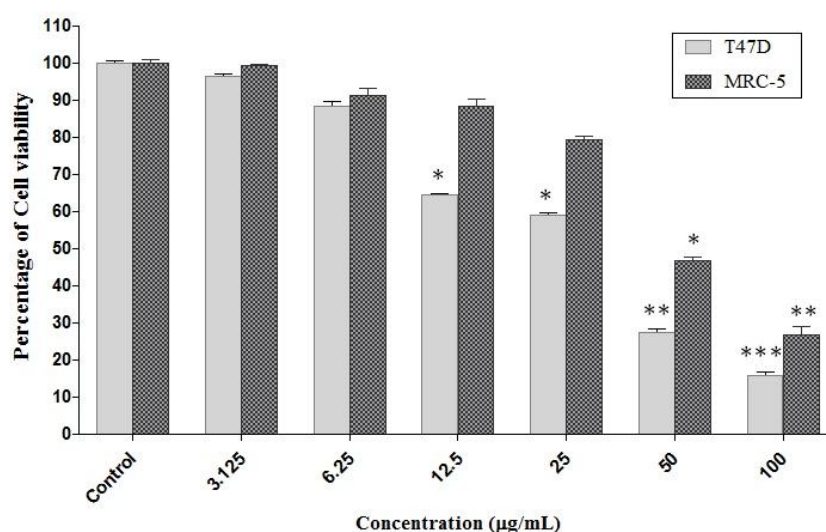
شکل شماره ۱. طیف سنجی نور مرئی-فرابنفش نانوذرات نقره طی یک ساعت از واکنش



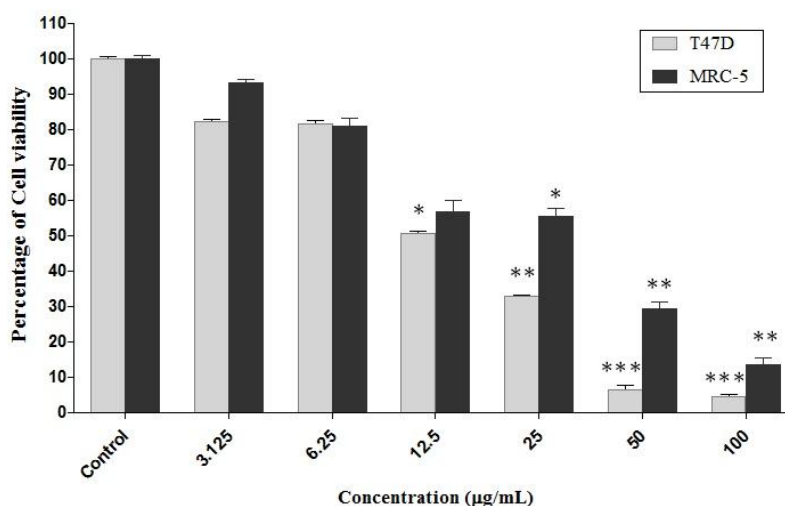
شکل شماره ۲. عکس میکروسکوپی الکترونی روبشی از نانوذرات نقره بیوستتز شده به روش زیستی



شکل شماره ۳. عکس میکروسکوپی الکترونی گذاره از نانوذرات نقره بیوستتز شده با جلبک قرمز *L. caspica*



شکل شماره ۴. اثر غلظت های متفاوت نانوذرات نقره بیوسنتز شده با جلبک *L. caspica* بر روی سلول های رده سرطانی T47D و نرمال MRC-5 در مدت زمان ۲۴ ساعت: نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه های کنترل و به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش و $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شده است. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)



شکل شماره ۵. اثر غلظت های متفاوت نانوذرات نقره بیوسنتز شده با جلبک *L. caspica* بر روی سلول های رده سرطانی T47D و نرمال MRC-5 در مدت زمان ۴۸ ساعت: نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه های کنترل و به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش و $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شده است. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر از روش زیستی جهت سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره جلبک استفاده شد. پژوهش های مختلف نشان داده اند که مولکول های زیستی موجود در عصاره میکروارگانیسم ها و گیاهان نقش مهمی در کاهش یون های نانو به عنوان سرپوش یا عامل احیای یون های Ag^+ به نانوذرات نقره بازی می کنند. از احیا کننده های شیمیایی مختلفی در حلال های متفاوت برای سنتز نانوذرات فلزی استفاده شده است. آقای Jia و همکاران از عامل احیا کننده تری اتانول آمین برای سنتز نانوذرات نقره با قطر حدود ۴۰nm استفاده نموده اند (۱۷). تاکنون در مطالعات مختلفی از روش های زیستی برای سنتز نانوذرات نقره با کمک عصاره جلبک ها و اثرات ضد سرطانی و ضد باکتریایی آن ها مورد ارزیابی قرار گرفته شده است. مطالعه Sajdha Parveen و Lakshmi اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره احیا شده با عصاره جلبک قرمز *Amphiroa fragilissima* را نشان دادند. آن ها نقش گروه های آمین، پتید، فلاونوئید، ترپنوئید و متابولیت های ثانویه را در پایدار سازی و سنتز نانوذرات نقره را مرتبط دانستند (۱۸). طی تحقیقی بیوسنتز نانوذرات نقره با اندازه ۱۲۲ نانومتر با استفاده از احیای عصاره جلبک *Gracilaria crassa* انجام گرفت و خواص ضد باکتریایی آن بر علیه باکتری های پاتوژن مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۹). در مقاله منتشر شده توسط Devi و همکاران سنتز نانوذرات نقره از طریق احیای جلبک دریایی *Ulva Lactuca* با اندازه بین ۲۰ تا ۵۶ نانومتر را گزارش نمودند و هم چنین مقایسه اثرات ضد سرطانی آن را بر روی رده های سلولی سرطانی کولون HT29، کبد HepG-2، پستان MCF-7 در مقایسه با سلول نرمال اپی تلیال کلیه (Vero) نشان دادند. در پژوهش آن ها اثرات سمیت بیشتر با مقدار غلظت مهار IC_{50} برابر ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر در رده سلولی سرطان کبد نسبت به رده های سرطانی دیگر و رده سلولی نرمال پس از ۲۴ ساعت از تیمار مشاهده نمودند (۲۰). تاکنون مطالعه ای در خصوص بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده

از عصاره جلبک *L. caspica* انجام نشده است و تنها مطالعات در زمینه سایر گونه های این جلبک در سراسر دنیا محدود شده است. ویرا و همکاران با استفاده از عصاره جلبک های *Laurencia aldingensis* و *Laurencia sp* بیوسنتز نانوذرات نقره را گزارش نمودند. نتایج مطالعه آن ها نشان داد که این نانوذرات نقره تولید شده با اندازه ۵ تا ۱۰ نانومتر بوده و دارای خواص ضد سرطانی بر علیه سارکومای رحم (MES-SA) و سلول نرمال فیروبلاست P4 است (۲۱). بیوسنتز نانوذرات نقره با قطر کمتر از ۴۵ نانومتر با استفاده از عصاره های آبی سه گونه ماکرو جلبک دریایی سبز (*Ulva flexuosa*)، قهوه ای (*Colpomenia sinuosa*) و جلبک قرمز (*Gracilariopsis persica*) توسط رحیمی و همکاران گزارش شد. در مطالعه آن ها احیای کامل یون های نقره را بعد از ۲۴ ساعت از زمان در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گزارش نمودند (۲۲).

در تحقیق حاضر، بیوسنتز نانوذرات نقره با پوشش عصاره جلبک قرمز *L. caspica* تولید شدند. هم چنین در این تحقیق، عصاره این جلبک به عنوان عامل پوشش دهنده و پایدار کننده نانوذرات نقره به خوبی نشان داده شد. در نهایت اثرات سمیت این نانوذرات بر روی سلول های رده سرطانی پستان (T47D) و سلول نرمال (MRC-5) با انجام آنالیز سمیت سلولی MTT در طی ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمون MTT نشان داد که این نانوذرات می توانند اثرات کشندگی وابسته به زمان و غلظت داشته باشند. مقدار غلظت مهار IC_{50} برای نانوذرات نقره سنتز شده در رده سلولی سرطانی T47D کمتر از مقدار محاسبه شده IC_{50} در رده سلولی نرمال MRC-5 در طی ۲۴ و ۴۸ ساعت محاسبه شد. بنا بر این اثر مهار نانوذرات نقره بیوسنتز شده علیه سلول های سرطانی پستان نسبت به سلول نرمال بیشتر است. این پدیده به علت اثرگذاری بر روی سیستم اکسیداسیون سلول می باشد (۲۳). با توجه به فعالیت بالای تنفس میتوکندریایی در سلول های سرطانی نسبت به سلول های طبیعی، به کارگیری این

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که نانوذرات نقره با پوشش عصاره جلبک دریایی *L. caspica* می تواند در رده سرطانی T47D موثر باشد. بنا بر این یافته های قطعی توقف رشد این سلول ها نیاز به پژوهش های بیشتر و دقیق تر دارد. لذا کاربرد این نوع از نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی می توان به عنوان یکی از راهکارهای امیدوارکننده جهت درمان سرطان پستان مفید واقع شود.

سپاسگزاری

نویسندگان از باشگاه پژوهشگران و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به خاطر تامین مالی این تحقیق تشکر می نمایند.

نوع از نانوذرات می تواند به عنوان یک راهکار امیدوارکننده در جهت درمان سرطان مطرح شود. اثرات ضد تکثیری، ضد رگزایی و القاء مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوز) سلول با استفاده از نانونقره در مطالعات گذشته بررسی شده است. این گزارشات نشان داد که نانوذرات نقره باعث القاء آپوپتوز از طریق افزایش بیان ژن پروتئاز کاسپاز و آزاد سازی رادیکال های آزاد اکسیژن در شرایط آزمایشگاهی می شود (۲۴). یکی دیگر از دلایل، تفاوت مرفولوژی بین غشاء سلول های سرطانی و طبیعی از لحاظ اندازه منافذ آن ها، بستر مناسبی را برای عنصر نقره جهت از بین بردن سلول های سرطانی فراهم می کنند (۲۵).

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. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortettieulent J, Jemal A. Global cancer statistics 2012; 65: 87-108.
3. Byler SH, Goldgar S, Heerboth S, Leary M, Housman G, Moulton K, Sibaji S. Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer Res* 2014; 34: 1071-8.
4. Wu S, Powers S, Zhu W, Hannun Y. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature* 2016; 529: 43-7.
5. Faraha MA, Alib MA, Chen SM, Li Y, Hemaïd FM, Aboutarboush FM, et al. Silver nanoparticles synthesized from *Adenium obesum* leaf extract induced DNA damage apoptosis and autophagy via generation of reactive oxygen species. *Coll Surf B Bioint* 2016; 141:158-69.
6. Mafune FF, 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.
7. Abbai R, Mathiyalagan R, Markus J, Kim YJ, Wang C, Singh P, Ahn S, Agmy F M, Yang DC. Green synthesis of multifunctional silver and gold nanoparticles from the oriental herbal adaptogen Siberian ginseng. *Int J Nanomed* 2016; 11:3131-43.
8. Ashrafi J, Rastegar MF, jafarpour BS, Kumar A. Use of plant pathogenic fungi *Fusarium moniliforme* for biosynthesis of silver nano particles with emphasis to time. *Eur Cell Mate* 2010; 20: 8.
9. Jeeva K, Thiyagarajan M, Elangovan V, Geetha N, Venkatachalam P. *Caesalpinia coriaria* leaf extracts mediated biosynthesis of metallic silver nanoparticles and their antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Ind Crops Prod* 2014; 52: 714-20.
10. Khatami M, Pourseyedi S. *Phoenix dactylifera* pit aqueous extract mediated novel route for synthesis high stable AgNPs with high antifungal and antibacterial activity. *IET Nanobiotechnol* 2015; 9: 1-7.
11. Yang J. Interaction between antitumor drug and silver nanoparticles: combined fluorescence and surface enhanced Raman scattering study. *Chin Opt Lett* 2009; 7: 894-7.
12. Ahmad R, Mohsin M, Ahmad T, Sardar M. Alpha amylase assisted synthesis of TiO₂ nanoparticles structural characterization and application as

- antibacterial agents. *J Hazard Mater* 2015; 283: 171-7.
13. Ching L J, Feng HM, Wern HH, Rong CF, Chen Y C, Yang TJ, Chang WH. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-cancer properties. *Cancer Cell Int* 2013; 55: 2-7.
14. Zaletapinet DA, Holland IP, Munozchoa M, Murilloalvarez JI, Sakoff JA, Altena IA, McCluskey A. Cytotoxic compounds from *Laurencia pacifica*. *Organ Med Chem Lett* 2014; 4:8.
15. Demirel ZF, Yilmazkoz FF, Karabayyavasoglu N, Ozdemir G, Sukata A. Antimicrobial and antioxidant activities of solvent extracts and the essential oil composition of *Laurencia obtusa* and *Laurencia obtusa* var. *pyramidata*. *Rom Biotechnol Lett* 2011; 16: 5925-36.
16. Salehi S, Shandiz SAS, Ghanbar F, Darvish MR, Shafiee Ardestani M, Mirzaie A, Jafari M. Phyto-synthesis of silver nanoparticles using *Artemisia marschalliana* Sprengel aerial parts extract and assessment of their antioxidant anticancer, and antibacterial properties. *Int J Nanomedicine* 2016; 11:1835-46.
17. Jia Z, Sun H, Gu Q. Preparation of Ag nanoparticles with triethanolamine as reducing agent and their antibacterial property. *Colloids Surf A* 2013; 419:174-9.
18. Parveen SK, Lakshmi D. Biosynthesis of silver nanoparticles using red algae *Amphiroa fragilissima* and its antibacterial potential against gram positive and gram negative bacteria. *J Curr Res Sci* 2016; 19: 93-100.
19. Lavakumar V, Masilamani K, Ravichandiran V, Venkateshan N, Saigopal DVR, Ashok Kumar CK, Sowmya C. Promising upshot of silver nanoparticles primed from *Gracilaria crassa* against bacterial pathogens. *Chem Cent J* 2015; 9: 42.
20. Devi SJ, Valentin B B. Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized by the seaweed *Ulva lactuca* invitro. *Sci Rep* 2012; 1: 242.
21. Vieira AP, Stein EM, Andregueti DX, Colepicolo P, Ferreira AMC. Preparation of silver nanoparticles using aqueous extracts of the red algae *Laurencia oldingensis* and *Laurencia* sp. and their cytotoxic activities. *J Appl Phycol* 2016; 28: 2615-22.
22. Rahimi Z, Yousefzadi M, Noori A, Akbarzadeh A. Synthesis of silver nanoparticles using three marine macro algae from the Persian gulf. *J Phys Oceanogr* 2014; 5:71-8.
23. Vanaja V, Annadurai G. *Coleus aromaticus* leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. *Appl Nanosci* 2012; 3: 217-23.
24. Vaidyanathan R, Kalishwaralal K, Gopalram S, Gurunathan S. Nanosilver the burgeoning therapeutic molecule and its green synthesis. *Biotechnol Adv* 2009; 27: 924-37.
25. Basavaraja S, Balaji SD, Lagashetty A, Rajasab AH, Venkataraman A. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Mate Res Bull* 2008; 43:1164-70.

Cytotoxicity Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticles Using Macro Algae *Laurencia caspica* Extract against Breast Cancer T47D Cell Line

Salehzadeh A^{1*}, Sadatshandiz A², Sadatnaeemi A³

(Received: May 20, 2017

Accepted: August 29, 2017)

Abstract

Introduction: Over the last few years, Silver nanoparticles (AgNPs) have attracted attentive research interest owing to their anti-angiogenesis, anti-bacterial, and anti-cancer activity. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity effects of biosynthesized AgNPs by using red macroalgae *Laurencia caspica* on human breast cancer (T47D) cells.

Materials & methods: In the experimental study, the biosynthesis of AgNPs by using *Laurencia caspica* was evaluated. The characterization of developed AgNPs was performed by Ultraviolet-visible (UV-vis) spectroscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM), and Transmission Electron Microscopy (TEM). The T47D and MRC-5 cell lines were treated with various concentrations of fabricated AgNPs for 24 and 48 hours. The viability effect of cells and Half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) were evaluated by MTT assay.

Finding: The fabricated AgNPs were monitoring characteristic surface Plasmon resonance peak at around 420nm. The SEM and TEM results for size and morphological study of AgNPs showed that the nanoparticles were spherical shape ranging from 10 to 50 nm. The MTT results demonstrated that AgNPs significantly decreased the viability of cells in dose-and time-dependent manner. The IC₅₀ value of nanoparticles for T47D and MRC-5 cell lines were calculated 29.37 µg/mL and 42.13 µg/mL during the 48 hours, respectively.

Discussion & conclusions: Based on the current study, the biosynthesized AgNPs can more cytotoxic effect against breast cancer cells compared to the normal cells. Thus, they can be considered as a promising strategy for the treatment of breast cancer.

Keywords: AgNPs, *Laurencia caspica*, Cytotoxicity, Breast cancer

1. Young Researchers and Elite Club, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

2. Dept of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Dept of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

*Corresponding author Email: salehzadehmb@yahoo.com