بررسی سمیت سلولی نانوسیلور بر رده سلولی اپی‌تلیال در شرایط آزمایشگاهی

دکتر فریال طالقانی*، دکتر رویا یارایی**، دکتر رخساره صادقی*، دکتر رزا حقگو***، دکتر محمدباقر رضوانی****

چکیده

سابقه و هدف: در سال‌های اخیر نانوسیلور بعلت خاصیت ضد باکتریایی قوی آن کاربردهای فراوانی در تکنولوژی مدرن بویژه در پزشکی یافته است، اما اطلاعات کمی از ایمن بودن این ماده و عدم سمیت آن در غلظت‌های موثر در دست است. هدف از این مطالعه بررسی سمیت نانو ذرات نقره بر سلول‌های اپی تلیال لثه‌ای انسان در محیط آزمایشگاه بود.

مواد و روشها: در این مطالعه آزمایشگاهی اثرات سمی محلول نانوسیلور فیلتر شده و فیلتر نشده بر روی رده سلول‌های اپی‌تلیال لثه انسان که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود با استفاده از دو روش MTT (Methyl Tiasol Tetrazolium bromide) mitochondrial) function) و LDH (membrane Leakage of lactate Dehydrogenase) پس از زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های مورد استفاده از محلول نانو نقره عبارت بودند از : ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر.

یافته‌ها: نتایج آزمایش MTT نشان داد که محلول نانوسیلور در غلظت‌های بالا (۲۰ و۵۰ میکروگرم) در تمام زمان‌ها باعث کاهش شدید فعالیت حیاتی سلول‌ها می‌شود وغلظت‌های کمتر نیز که در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت موجب مرگ و میر نمی‌شوند پس از ۷۲ ساعت قادرند موجب مرگ و میر یا کاهش رشد شوند. آزمایش LDH نشان داد که مرگ و میر سلول‌های اپیتلیال فقط در غلظت‌های بالای نانوسیلور (۲۰ و۵۰ میکروگرم) دیده می‌شود ولی در غلظت‌های کمتر سمیت قابل توجهی روی نمی‌دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که نانو ذرات نقره دارای اثر سمی بر روی سلول‌های اپی تلیال لثه انسان می‌باشند که این اثر وابسته به غلظت و زمان است.

کلید واژگان: سمیت سلولی، سلول‌های اپی‌تلیالی، نانوسیلور.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۷/۳۰ ***تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۹۲/۴/۱۹*** ***تاریخ تأیید مقاله:۱۳۹۲/۴/۲۹***

Please cite this article as:
Taleghani F, Yaraii R, Sadeghi R, Haghgoo R, Rezvani MB. Evaluation of the toxicity of silver nanoparticles on human gingival epithelial cells in vitro. Beheshti Univ Dent J 2014; 31(4): 220-226.

مقدمه

امروزه فناوری نانو یکی از رایج‌ترین مباحث در جامعه علمی دنیا بوده، تحولات عمیقی در زمینه پژوهش و تولید محصولات مختلف ایجاد کرده است(۱). طبق تعریف، منظور از نانومواد، موادی هستند با ابعاد ۱-۱۰۰ نانومتر (یک میلیاردیم متر) و نانو تکنولوژی فناوری‌ای است که بر روی نانو مواد کار کرده یا به تولید محصول از آنها می‌پردازد(۲و۳). ماده در ابعاد نانو در مقایسه با همان ماده به صورت توده ،دارای ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی جدیدی است(۶-۴). یکی از محصولات فناوری نانو، نانوذرات نقره می‌باشد. ذرات نانو نقره به اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر شامل ۱۵ تا ۲۰ هزار اتم نقره هستند. اثرات ضد میکروبی نقره از دیرباز شناخته شده است، توانایی ارائه نقره از طریق ساختار نانوکریستال به طرز شگرفی ارزش بیولوژیکی و ضد میکروبی آن را بالا برده است(۷). نانو ذرات نقره در مقایسه با ذرات نقره بصورت توده سطح تماس بیشتری دارند، این امر می‌تواند موجب اثر ضد میکروبی بالاتر آن نسبت به نقره شود(۱۲-۸). ذرات نانوسیلور با اتصال به پروتئین حاوی گوگرد در سطح غشاء باکتری‌ها، وارد آنها شده، با تغییر در مورفولوژی و نفوذپذیری غشاء و اثر بر زنجیره تنفسی و تقسیم سلولی به مرگ سلولی منجر می‌گردند(۱۲و۱۳). نتایج بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که برخلاف آنتی‌بیوتیک‌های رایج که

* استادیارگروه پریودانتیکس، دانشکدهٔ دندانپزشکی، دانشگاه شاهد.
** دانشیارگروه ایمنی‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه شاهد.
*** نویسنده مسئول: دانشیار گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکدهٔ دندانپزشکی، دانشگاه شاهد. E-mail: haghgoodent@yahoo.com
**** استادیارگروه دندانپزشکی ترمیمی، دانشکدهٔ دندانپزشکی، دانشگاه شاهد.

Archive of SID
www.SID.ir

معمولاً فقط روی باکتری‌ها اثر کشنده و مهاری دارند، نانوسیلور علاوه بر باکتری‌ها دارای اثرات کشندگی روی طیف وسیعی از قارچ‌ها، پورتوزوا و حتی ویروس‌ها می‌باشد(۱۷-۱۳). علیرغم گسترش استفاده از محصولات نانو، مطالعات اندکی در رابطه با اثرات بیولوژیک و سمی این مواد بر روی سلول‌های انسان انجام شده‌اند(۲۳-۱۸)، بنابراین بررسی در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه بررسی سمیت نانو ذرات نقره بر سلول‌های اپی‌تلیال لثه‌ای انسان در محیط آزمایشگاه بود.

مواد و روشها:

نانوسیلور با سایز متوسط، با ابعاد ۱۰ نانومتر و غلظت اولیه ۰/۱ mg/ml از شرکت (Plasmachem, Berlin, Germany) خریداری شد. پس از بررسی اولیه و اطمینان از قابل استفاده بودن در محیط کشت سلول (از نظر ایجاد آلودگی)، غلظت‌های مختلف آن در محیط کشت سلول تهیه و به سلول‌ها اضافه شد. حجم هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر و غلظت نهائی نانوسیلور در چاه‌کها به ترتیب ۵۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲، ۱، ۰.۵، ۰.۲، ۰.۱، ۰.۰۵ و ۰.۰۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

به عنوان منبع اولیه تأمین سلول‌ها، ابتدا یک فلاسک سلول از رده سلولی اپی‌تلیال KB از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تحویل گرفته شد. مشخصات این رده در بروشور موجود در سایت بانک سلولی چنین بیان شده است:

این سلول‌ها اولین بار از دهان یک مرد قفقازی گرفته شده‌اند. محیط کشت آن EMEM (EBSS) + 1% NEAA + 10% FBS می‌باشد که در بانک سلولی انستیتو پاستور ایران با محیط RPMI 1640 + 10% FBS سازگار شده است.

NCBI Code	Designation	Species	Tissue	Morphology
C152	KB	Human	Mouth	Epithelial-like

در این تحقیق از سلول‌هایی که به صورت تک لایه در فلاسک کشت داده شده بودند استفاده شد.

ابتدا جهت سازگار کردن سلول‌های تحویل گرفته شده، پس از تعویض محیط اولیه بانک با محیط تازه، فلاسک سلول به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و محیط دارای CO_2 با غلظت ۵٪ و بخار آب ۹۵٪ نگهداری شد. سپس مجدداً این محیط نیز تخلیه شده، دوباره محیط RPMI گرم شده در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه به مدت حدود ۲۰-۱۵ دقیقه اضافه شد. جهت شستشو به طور معمول از ۵ سی‌سی محیط و جهت تعویض از ۵/۴ سی‌سی محیط همراه با ۵/۰ سی‌سی سرم FBS (یعنی ترکیبی از ۹۰٪ RPMI و ۱۰٪ FBS) استفاده شد. سپس نسبت به تکثیر (پاساژ) فلاسک سلول اقدام شد. جهت اطمینان از سازگاری و سلامت سلول‌های مورد آزمایش قبلی از انتقال سلول‌ها به پلیت ۹۶ خانه تلاش شد تا حداقل۲ پاساژ موفق برای هر رده سلولی انجام شود. سپس سلول‌ها جهت انجام آزمایش به پلیت ۹۶ خانه منتقل شده، شمارش شدند.

پس از اتمام مرحله کشت سلول‌ها در پلیت، پس از گذشت ۱۸ ساعت از زمان کشت سلول‌ها در پلیت و پس از اطمینان از رشد سلول‌ها، رقت‌های مختلف دارو اضافه شدند. با توجه به احتمال ایجاد آلودگی در محیط کشت، در قدم اول، دارو با استفاده از فیلتر استریل شد و با توجه احتمال کم شدن ذرات در داروی فیلتر، کار یکبار با داروی فیلتر نشده و یک بار با داروی فیلترشده انجام گرفت.

پس از آماده کردن، دارو به پلیت‌های دارای سلول اضافه شد. در این مرحله با استفاده از سمپلر و به آرامی و دقت نسبت به خارج کردن محیط موجود در هر خانه اقدام نموده، سپس با احتساب رقت داروی مورد استفاده به هر ردیف، محیط دارای سرم اضافه شد و سپس مقدار معینی دارو به هر ردیف اضافه شد تا رقت های مورد نظر از دارو بدست آید (غلظت‌های ۵۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲، ۱، ۰.۵، ۰.۲، ۰.۱، ۰.۰۵ و ۰.۰۲ میکروگرم در میلی‌لیتر µg/ml). پس از اضافه کردن دارو، پلیت روی دستگاه شیکر با دور متوسط و در مدت کمتر از ۱ دقیقه قرار داده شده، سپس در انکوباتور قرار گرفت.

در این تحقیق جهت بررسی اثر سایتوتوکسیسیته نانوذرات بر روی سلول‌ها از دو روش MTT و LDH استفاده شد. در روش MTT فعالیت حیاتی سلول‌ها و در واقع سلول‌های

www.SID.ir

زنده ارزیابی شده، کاهش آن نشان‌دهنده مرگ و میر سلولی است(۲۴و۲۵). در روش LDH میزان LDH که از سلول‌های مرده آزاد می‌شود و مقدار آن متناسب با میزان مرگ ومیر است اندازه‌گیری می‌شود(۲۶).

پس از تبدیل جذب به دست آمده در دستگاه خواننده الایزا در هر یک از دو روش MTT و LDH به درصد توکسیسته، غلظتی از دارو که می‌تواند موجب ۵۰٪ مرگ و میر سلول‌ها شود، محاسبه شد.

نتایج گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آماری t- student و تست‌های تکمیلی متعاقب آن تجزیه و تحلیل شدند و P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

الف- سایتوتوکسیسیته به روش MTT

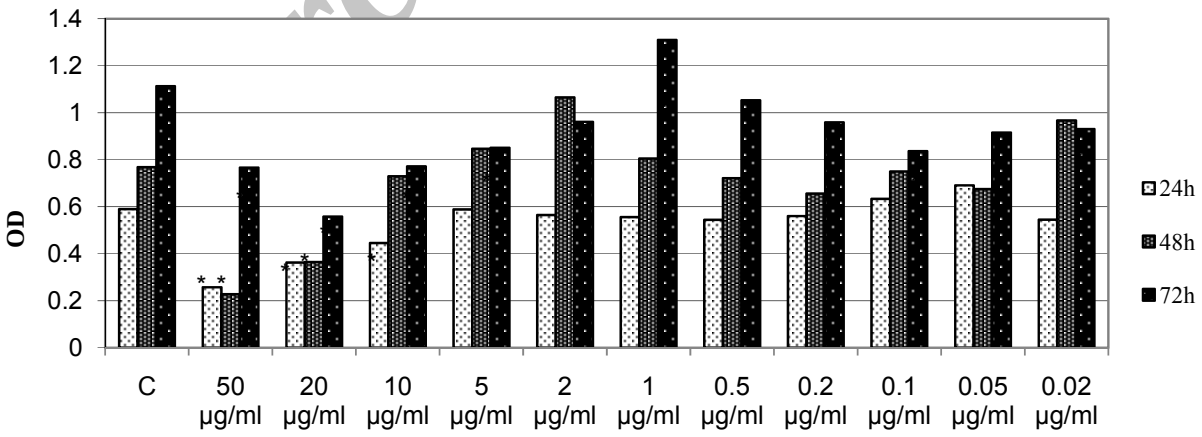
همانگونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، در غلظت‌های بالای نانوسیلور در هر سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، کاهش شدید فعالیت حیاتی سلول‌ها دیده می‌شود. با استفاده از آزمون t- student مشخص شد که این یافته از نظر آماری معنی‌دار بوده، بطور معمول در ۷۲ ساعت بیشتر است. نکته قابل توجه اینکه دوزهای کمتر که موجب مرگ ومیر نمی‌شوند در زمان‌های طولانی‌تر (بخصوص ۷۲ ساعت) قادرند موجب مرگ و میر یا حداقل کاهش رشد (در مقایسه با کنترل) شوند.

ب- سایتوتوکسیسیته به روش LDH

با توجه به اینکه در تست MTT مشخص گردید نانوسیلور بصورت فیلتر نشده هیچ گونه آلودگی در کشت ایجاد نمی‌کند و از طرفی فیلتر کردن دارو می‌تواند موجب کاهش تعداد ذرات نانوسیلور گردد، بنابراین در سنجش سایتوتوکسیسیته به روش LDH، از نانو سیلور بدون آنکه از فیلتر عبور داده شود استفاده گردید. با توجه به دستورالعمل کیت سنجش LDH، نتایج حاصل از جذب نوری (OD) می‌تواند با استفاده از فرمول داده شده به درصد سایتوتوکسیته در سلول‌های مورد نظر تبدیل شود. بنابراین طبق دستورالعمل کیت، علاوه بر کنترل بدون نانوسیلور (فقط محیط کشت – کنترل منفی و بدون مرگ و میر) در این سنجش یک کنترل حاوی ۲٪ ماده Triton X100 گذاشته شد تا بالاترین میزان توکسیسیته و LDH تولید شده از سلول‌های مربوطه بدست آید. کنترل با محیط را Low Control (LC) و کنترل با سایتوتوکسیته بالا را Higth Control (HL) نامیده می‌شوند.

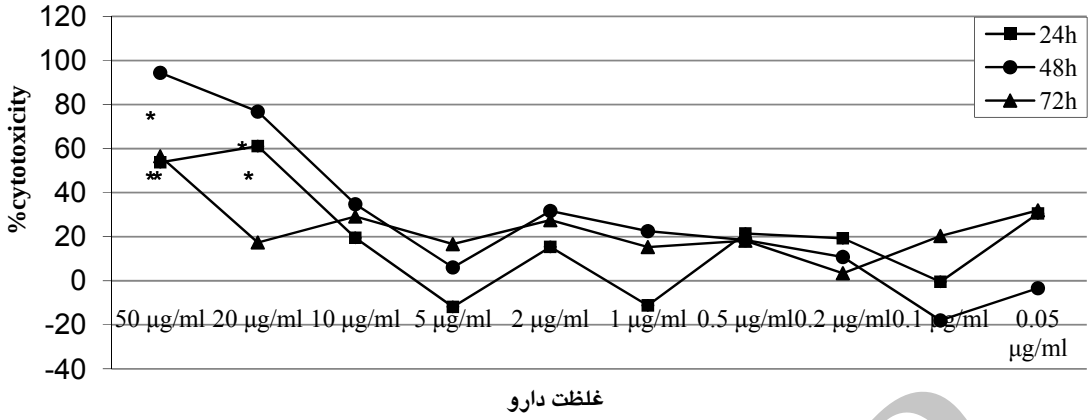
میزان LDH در اثر نانو سیلور بر سلول‌های اپی‌تلیال KB پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری و مقدار P در آزمون t-student نسبت به کنترل LC مشخص گردید (نمودار ۲).

همانگونه که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود بر اساس آزمون LDH، مرگ و میر سلولی فقط در غلظت‌های بالای ذرات نانو دیده می‌شود ولی در غلظت‌های کمتر، توکسیسیته قابل توجهی روی نمی‌دهد.



نمودار ۱- جذب نوری در تاثیر نانوسیلور بر سلول های اپی تلیال در زمان های ۲۴،۴۸،۷۲ ساعت

www.SID.ir



نمودار ۲- درصد سایتوتوکسیسیته در اثر نانوسیلور بر سلول‌های اپی‌تلیال در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

در جدول شماره ۱ نتایج مربوط به IC50 یعنی غلظتی که می‌تواند موجب ۵۰٪ مرگ ومیر شود، مشاهده می‌شود. همانگونه که مشاهده می‌شود بر اساس تست MTT، سلول‌ها در زمان کوتاه، آسیب‌های ناشی از نانوسیلور را بهتر نشان می‌دهند اما در زمان طولانی‌تر به دوز بیشتری از نانوسیلور نیاز است تا آسیب‌های جدی دیده شوند. تست LDH نیز این نکته را تأیید می‌کند.

جدول ۱- IC50 ذرات نانوسیلور روی سلول‌های اپی‌تلیالی لثه بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر

	IC50 in MTT Test	IC50 in LDH Test
۲۴ ساعت	۳۹/۵۱	۳۸/۰۱
۴۸ ساعت	۳۳/۷۵	۲۰/۶۷
۷۲ ساعت	۶۲/۸۵	۴۷/۴۷

با استفاده از آنالیز اندازه‌های تکراری (repeated measure)، اثر زمان و دوزهای مختلف دارو و اثر نانو سیلور فیلتر شده و فیلتر نشده مورد بررسی قرار گرفت.

بحث:

در سال‌های اخیر نانوتکنولوژی در دندانپزشکی پیشگیری مطرح شده است. در دندانپزشکی پیشگیری از این تکنولوژی جهت ساخت مسواک و خمیردندان نانوسیلور استفاده می‌شود. نانو سیلور خصوصیات عالی آنتی‌باکتریال و آنتی‌ویرال دارد(۲۷). از آنجا که کاربرد نانوذرات نقره در این مواد به منظور بالا بردن خواص آنها، به معنی تماس این مواد با محیط دهان (در اولین تماس سلول‌های اپیتلیالی) می‌باشد، بررسی سمیت آنها ضروری است. هدف از این مطالعه برر سی سمیت محلول نانو نقره بر روی سلول‌های اپی‌تلیالی لثه انسان (تهیه شده از بانک سلولی) بود. در این مطالعه برای اولین بار اثرات توکسیک نانوسیلور بر سلول‌های اپی‌تلیالی لثه انسان مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج تست MTT نشان داد که ماده مورد نظر طی ۲۴ و ۴۸ ساعت از غلظت‌های µg/ml ۱۰ به بالا اثر سمی روی سلول‌های اپیتلیالی داشت اما غلظت‌های کمتر نتوانستند آسیب جدی در فعالیت حیاتی سلول‌ها ایجاد نمایند. ولی پس از ۷۲ ساعت، تقریبا در تمامی غلظت‌ها کاهش مختصر رشد (یا کاهش مختصر فعالیت حیاتی) نسبت به گروه شاهد مشاهده شد که هر چند مقدار آن زیاد نبود (۱۰-۱۵٪) ولی از نظر آماری معنی‌دار بود و ممکن است نشان‌دهنده تأثیر تنظیمی بر رشد این سلول‌ها باشد که به زمان بیشتری برای مشاهده آن نیاز است.

نتایج تست LDH که نشان‌دهنده سمیت سلولی است حاکی از آن بود که نانو سیلور درهمه زمان‌های موردآزمایش فقط در غلظت‌های µg/ml ۲۰ و ۵۰ اثر سمی بر روی سلول‌های اپی‌تلیالی داشته است .

نتایج تست IC50 یعنی غلظتی که می‌تواند موجب ۵۰ درصد مرگ و میر شود نشان داد که آسیب ناشی از نانوذرات نقره در زمان‌های کوتاه خود را بهتر نشان می‌دهد و در زمان‌های طولانی‌تر به دوز بیشتری از نانوسیلور نیاز است تا آسیب‌های جدی دیده شود.

Park و همکاران (۲۰۰۷) اثرات فلزات مختلف روی، آلومینیم، نیکل و جیوه در ابعاد نانو، با متوسط قطر nm

Archive of SID
www.SID.ir

۱۵۰، را بر رده سلولی اپی‌تلیالی ریه انسان (A549) بررسی کردند. در مطالعه ایشان سلول‌های اپی‌تلیالی ریه انسان به مدت ۲۴ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف این نانوذرات قرار گرفته، آسیب‌های مرفولوزیک آنها با روش two-color flow cytometry سنجیده شد. نتایج مطالعه Park و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که این نانو ذرات درجات مختلفی از سمیت سلولی را باعث می‌شوند که وابسته به دوز می‌باشد(۱۸). در مطالعه Park و همکاران (۲۰۰۷)، همچنین اثر غلظت‌های مختلف نانو ذرات پس از ۲۴ ساعت بر روی سلول‌های اپی‌تلیالی ریه بررسی شدند حال آنکه در مطالعه حاضر اثر غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره بر سلول‌های اپی‌تلیالی لثه که در معرض مواد بهداشتی مختلف حاوی نانوسیلور هستند بررسی گردیده است که احتمالاً نتایج آن قابل استنادتر می‌باشد.

Alt و همکاران (۲۰۰۳) اثر ضد میکروبی و سمیت سلولی یک سمان استخوان را که حاوی نانو نقره ۱٪ بود بررسی کردند و نشان دادند که نانو سیلور در عین حال که دارای اثر ضد میکروبی خوبی است، فاقد اثر سمی بر روی فیبروبلاست موش و استئوبلاست انسان بود (۱۹). این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی دارند اما مطالعه حاضر اثر غلظت‌های مختلف نانو سیلور را بر سلول‌های اپی‌تلیالی لثه انسان بررسی نموده است که به این لحاظ با مطالعه Alt و همکاران (۲۰۰۳) تفاوت دارد.

Hsin و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از تست MTT نشان دادند که غلظت ۵۰ µg/ml و بیشتر طی ۲۴ ساعت بر سلول‌های فیبروبلاست موش و عضله صاف جدار رگ موش صحرایی اثر سمی دارد(۲۰). نتایج این مطالعه با یافته‌های مطالعه حاضر سازگاری ندارد. مطالعه Hsin و همکاران (۲۰۰۸) بر روی سلول‌های فیبروبلاست و عضله صاف موش صحرایی انجام گرفته است که این اختلاف در یافته‌ها می‌تواند به دلیل تفاوت در روش بررسی این دو مطالعه باشد.

Ahamed (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای اثرات سمی نانوذرات نیکل در غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۵، ۱۰و ۲۵ را پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بر سلول‌های اپی‌تلیالی ریه با فاکتورهای MTT، LDH، GSH، ROS و LPO به عنوان عوامل تعیین سمیت بررسی نموده، دریافت که نانوذرات نیکل اثرات سمی بر سلول‌های اپی‌تلیالی ریه دارند(۲۸). البته مطالعه وی اثر نانو ذرات نیکل را بر سلول‌های اپی‌تلیالی انسان بررسی کرده که از این نظر در روش بررسی با مطالعه حاضر تفاوت دارد.

Hussain و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه‌ای اثرات توکسیک نانو ذرات نقره، آلومینیم، مولیبدم، اکسید آهن و دی اکسید تیتانیوم بر سلول‌های کبد موش را با فاکتورهای MTT، LDH، GSH، ROS و MMP مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره در تمام غلظت‌ها سمیت بالایی بر سلول‌های کبد موش دارند که به طور معنی‌داری بالاتر از سایر عناصر مورد مطالعه است(۲۳). این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر همخوانی ندارند. در مطالعه حاضر اثرات سمی پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی سلول‌های اپی‌تلیالی لثه انسان انجام گرفته، تفاوت در واکنش این سلول‌ها با سلول‌های کبد موش، همچنین زمان بررسی می‌تواند در این تفاوت اثر بگذارد.

Kawata و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه‌ای اثر سمیت نانو ذرات نقره را بر سلول‌های کبد انسان بررسی کرده، دریافتند که نانوسیلور در غلظت‌های پایین اثر سمی ندارد اما در غلظت‌های بالا اثرات سمی بر سلول‌های کبد انسان دارد(۲۹). این نتایج با یافته‌های مطاعه حاضر همخوانی دارند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اثر سمی ذرات نقره بر سلول اپیتلیال لثه انسان به غلظت و زمان وابسته است که در پاره‌ای مطالعات دیگر نیز این نتیجه در مورد فیبروبلاست حاصل شده است(۲۰و۲۲). تفاوت در غلظت‌های سمی بدست آمده در مطالعات مختلف می‌تواند اولا از تفاوت در نوع فیبروبلاست به کار رفته باشد ناشی ، در عین حال تفاوت در روش آماده‌سازی نانو ذرات نقره (۲۴)و اندازه ذرات (۲۶) نیز می‌توانند موثر باشند.

نتیجه‌گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد که نانو ذرات نقره دارای اثر سمی بر روی سلول‌های اپی‌تلیالی لثه‌ای انسان می‌باشند که این اثر به غلظت و زمان وابسته است.

References

1. Colvin VL. The potential environmental impacts of engineered nanomaterials. Nat Biotechnol 2003; 21: 1166-1170.

Archive of SID
www.SID.ir

2. Gleiter H. Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. Acta Mater 2000; 48: 1-29.
3. Stratmeyer ME, Goering PL, Hitchins VM, Umbreit TH. What we know and don't know about the bioeffects of nanoparticles: developing experimental approaches for safety assessment. Biomed Microdevices. 2010; 12: 569-573.
4. Lewis LN. Chemical catalysis by colloids and clusters. Chem Rev 1993; 93: 2693–2730.
5. Králik M, Biffis A. Catalysis by metal nanoparticles supported on functional organic polymers. J Molecular Catalysis A: Chem 2001; 177: 113-138.
6. Alivisatos AP. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. Science 1996; 271: 933-937.
7. Savage N, Diallo MS. Nanomaterials and water purification:opportunities and challenges. J Nanoparticle Res 2005; 7 :331-342.
8. Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. Nanotechnology 2007; 18: 225103.
9. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interface Sci 2004; 275: 177–182.
10. Panáček A, Kvítek L, Prucek R, Kolář M, Večeřová R, Pizúrová N, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. J Phys Chem B 2006; 110:16248-16253.
11. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 2005; 16:2346-2353.
12. Baker C, Pradhan A, Pakstis L, Pochan DJ, Shah SI . Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. J Nanosci Nanotechnol 2005; 5: 244-249.
13. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine 2007; 3: 95-101.
14. Kim HS, Kang HS, Chu GJ, Byun HS. Antifungal effectiveness of nanosilver colloid against rose powdery mildew in greenhouses. Solid State Phenomena 2008; 135: 15-18.
15. Lara HH, Ayala-Nuñez NV, Ixtepan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. J Nanobiotechnol 2010; 8: 1186-1477.
16. Lu L, Sun RW, Chen R, Hui CK, Ho CM, Luk JM, etal. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. Antivir Ther J 2008; 13:253-262.
17. Sun L, Singh AK, Vig K, Phillai SH, Singh SH. Silver nanoparticles inhibit replication of respiratory syncytial virus . J Biomed Biotechnol 2008; 4: 149-158.
18. Park S, Lee YK, Jung M, Kim KH, Chung N, Ahn NC, et al. Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human aleolar epithelial cells. Inhal Toxicol 2007; 19(Suppl 1): 59-65.
19. Alt V, Bechert T, Steinrücke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. Biomaterials 2004; 25: 4383-4391.
20. Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. Toxicol Lett 2008; 179: 130-139.
21. Miura N, ShinoharaY.Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticlesin HeLa cells. Biochem

Archive of SID
www.SID.ir

Biophys Res Commun 2009; 390: 733-737.

22. Shavandi Z, Ghazanfari T, Moghaddam KN. In vitro toxicity of silver nanoparticles on murine peritoneal macrophages. Immunopharmacol Immunotoxicol 2011; 33: 135-140.
23. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL rat liver cells. Toxicol In Vitro 2005; 19; 975-983.
24. Chiba K, Kawakami K, Tohyama K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. Toxicol In Vitro 1998; 12: 251-258.
25. Yaacob NS, Hamzah N, Nik Mohamed Kamal NN, Zainal Abidin SA, Lai CS, Navaratnam V, et al. Anticancer activity of a sub-fraction of dichloromethane extract of strobilanthes crispus on human breast and prostate cancer cells in vitro. BMC Complement Altern Med 2010; 10: 42.
26. Motskin M, Wright DM, Muller K, Kyle N, Gard TG, Porter AE, Skepper JN. Hydroxyapatite nano and microparticles: correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. Biomaterials 2009; 30: 3307-3317.
27. Li L, Sun J, Li X, Zhang Y, Wang Z, Wang C, Dai J, Wang Q. Controllable synthesis of monodispersed silver nanoparticles as standards for quantitative assessment of their cytotoxicity. Biomaterials 2012; 33: 1714-1721.
28. Ahamed M. Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. Toxicol In Vitro. 2011; 25: 930-936.
29. Kawata K, Osawa M, Okabe S. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. Environ Sci Technol 2009; 43: 6046-6051.

Archive of SID

www.SID.ir