

ارزیابی سمیت نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز با عصاره آبی قارچ دنبلان بر روی رده سلولی سرطان پستان (MCF-7)

شهلا ندایی (MSc)^۱، حسین اکبری (PhD)^{۲*}، هاشم یعقوبی (PhD)^۱

۱- گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

۲- گروه فیزیک، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

دریافت: ۹۷/۶/۵، اصلاح: ۹۷/۹/۱۳، پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۹

خلاصه

سابقه و هدف: نانوذرات نقره دارای فعالیت ضدباکتری و ضد سرطان می‌باشد. اما حلال‌های آلی مورد استفاده برای تولید این نانوذرات سمی هستند و می‌تواند اثرات زیست محیطی مخربی داشته باشند. از این رو تمایل زیادی برای استفاده از روش‌های سالم برای سنتز نانوذرات نقره وجود دارد. لذا این مطالعه به منظور سنتز نانو ذرات نقره به روش زیستی از عصاره آبی قارچ دنبلان و بررسی اثرات بیولوژیکی آن بر روی سلول‌های سرطانی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی جهت سنتز نانوذرات نقره از عصاره آبی قارچ دنبلان ۱۰ میلی لیتر از عصاره قارچ به ۹۰ میلی لیتر محلول نیترات نقره ۱ میلی لیتر اضافه و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق سنتز شد. خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات سنتز شده با دستگاه‌های XRD، FESEM و TEM مورد آنالیز و بررسی قرار گرفتند. اثرات عصاره و نانو ذرات سنتز شده با روش MTT با غلظت‌های ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر بر سلول‌های سرطانی رده MCF-7 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد.

یافته‌ها: اندازه نانو ذرات بین ۱۹ تا ۳۵ نانومتر و شکل آنها به طور عمده کروی شکل بود. در سنجش سمیت سلولی با روش MTT میزان IC50 محاسبه شده برای نانو ذرات نقره و عصاره در سلول‌های MCF-7 نشان داد که نانو ذرات نقره نسبت به عصاره اثرات سمیت سلولی بیشتر دارد. IC50 محاسبه شده برای عصاره و نانوذرات در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۰/۷۳، ۰/۸ و ۰/۶۴ میلی گرم بر میلی لیتر و برای نانوذرات به ترتیب ۰/۶، ۰/۵۶ و ۰/۴۸ بدست آمد ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که نانو ذرات نقره تولید شده به روش سبز دارای سمیت سلولی بیشتری نسبت به عصاره آبی قارچ دنبلان است.

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات نقره، قارچ دنبلان، سنتز زیستی، MTT، سرطان سینه.

مقدمه

تولید نانوذرات رو به افزایش می‌باشد. موادی مانند گیاهان، جلبک‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، باکتری‌ها و ویروس‌ها در تولید زیستی نانوذرات کاربرد دارند (۵). بیشتر قارچ‌هایی که تولید اندام با رده زیرزمینی می‌کنند از دسته آسکومیست‌ها بوده و تحت عنوان دنبلان *Truffle* شناسایی و معرفی می‌شوند. در این قارچ بیش از ۱۵ نوع پروتئین، گالیک اسید، کاتچین، فلاونوئید، تانین و برخی ترکیبات دیگر از جمله بتاکاروتن و لینولئیک اسید شناسایی شده است. از خواص دارویی این قارچ بسیار ارزشمند می‌توان به درمان سرطان معده، هپاتیت A، B، C، نفريت، آرتروز، دردهای عصبی، بی‌خوابی، برونشیت، آسم، زخم معده، فشار خون و کلسترول بالا اشاره نمود (۶ و ۷). Al-Laith جهت بررسی اجزای آنتی اکسیدانی/آنتی رادیکالی قارچ خوراکی دنبلان بیابان تهیه شده از بحرین، ایران، مراکش و عربستان مشخص شد که قارچ ایران بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارد (۸). Zabihی و همکاران اثر عصاره هیدروالکلی قارچ دنبلان بر سطح هورمون استروژن و پروژسترون در

سرطان یک بیماری مهلک با مرگ و میر بالاست که درگیری‌های روانی و اقتصادی زیادی به دنبال دارد. نحوه زندگی و عوامل محیطی، از فاکتورهای مهم و مؤثر در بروز سرطان است (۱). با وجود درمان‌های مختلف مانند شیمی درمانی، ایمنی درمانی و رادیوتراپی، سرطان هنوز به عنوان یک چالش مهم مطرح است. بنابراین توسعه روش‌های مؤثر، زیست سازگار و کم هزینه برای درمان سرطان ضروری می‌باشد (۲). در حال حاضر اعتقاد بر این است که نانوذرات نقره می‌توانند به عنوان یک عامل درمانی، علاوه بر استفاده در مبارزه با باکتری‌ها و اثر روی بهبود زخم، برای مبارزه با ایدز، ویروس‌ها و به خصوص سرطان نیز به کار برده شوند (۳). اما حلال‌های آلی مورد استفاده برای تولید این نانوذرات سمی هستند و می‌تواند اثرات زیست محیطی مخربی داشته باشند. از این رو تمایل زیادی برای استفاده از روش‌های سالم برای سنتز نانوذرات نقره وجود دارد (۴). یکی از روش‌های تولید نانوذرات، تولید به روش زیستی است و توجه به این روش برای

این مقاله حاصل از پایان نامه شهلا ندایی دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر حسین اکبری

کشور انگلستان و میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی (Mira-Xmu ساخت کشور چک) استفاده گردید.

بررسی اثر عصاره آبی و نانوذرات حاصل از قارچ دنبلان بر کشندگی سلول‌های MCF-7: رده سلولی سرطان سینه (MCF_7) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ آنتی بیوتیک (Pen/Strep) کشت داده شده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۵٪ و CO₂ ۵٪ نگهداری شدند. پس از رشد سلول‌های MCF-7، سلول‌ها توسط EDTA-Trypsin از کف فلاسک جداسازی شده و با تراکم ۷×۱۰^۲ بر میلی‌لیتر، سوسپانسیون شدند سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل بر هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با شرایط فوق‌الذکر نگهداری شدند تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. سپس هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه به طور جداگانه با مقدار متفاوتی از عصاره آبی و نانوذرات نقره حاصل از قارچ دنبلان (۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند و در مدت زمان‌های متفاوت (۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵٪ و CO₂ ۵٪ نگهداری شدند بعد از سپری شدن زمان تیمار، محیط کشت رویی سلول‌ها خارج شده و به هر چاهک ۱۸۰ میلی‌لیتر محیط کشت بدون FBS به همراه ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد. سپس پلیت‌ها در انکوباتور با شرایط فوق‌الذکر نگهداری شدند.

پس از چهار ساعت انکوباسیون، محیط کشت هر کدام از چاهک‌ها تخلیه شد و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید. به منظور محاسبه درصد زنده‌مانی سلول‌ها، ۱۰ دقیقه پس از تیمار سلول‌ها توسط DMSO، جذب هر کدام از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه توسط دستگاه ایزاریدر و در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این آزمون از محلول DMSO به عنوان بلانک و سلول‌های بدون تیمار با عصاره آبی و نانوذرات حاصل از گیاه دنبلان، به عنوان گروه کنترل استفاده شد. درصد سلول‌های زنده با استفاده از معادله زیر برای هر ردیف محاسبه شد:

$$\text{میانگین جذب نوری سلول‌های تیمار شده} \times 100 = \text{درصد زنده مانده سلول‌ها} \\ \text{میانگین جذب نوری سلول‌های شاهد}$$

به منظور تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از این تحقیق از نرم افزار SPSS۲۲ و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و از آزمون Tukey استفاده گردید. تمامی تست‌ها حداقل در سه تکرار انجام شد و $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سنتر و طیف سنجی ماورابنفش مرئی نانو ذرات: پس از انجام سنتر زیستی، محلول حاصل از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای روشن تغییر رنگ داد. با توجه به اینکه یکی از نشانه‌های احیای یون‌های نقره در فرآیند تولید نانوذرات نقره، تغییر رنگ آن به قهوه‌ای روشن می‌باشد، علاوه بر این محنی‌های حاصل از طیف‌سنجی

مدل تجربی مالتیپل اسکروزیس موش صحرایی ماده را مورد مطالعه قرار داده و نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی دنبلان میزان استروژن و پروژسترون را در موش‌های مدل تجربی مالتیپل اسکروزیس افزایش می‌دهد (۹).

نانوذرات با افزایش اثر بخشی درمانی و کاهش سمیت ناخواسته ی دارو‌های ضدسرطانی مورد توجه قرار گرفته اند و با توجه به اینکه در سنتر نانوذرات روش‌های شیمیایی و فیزیکی به طور کلی گران، زمان بر و برای محیط زیست خطرناک است استفاده از قارچ‌ها، باکتری‌ها، گیاهان و جلبک‌ها (به عنوان واسطی در سنتر نانوذرات از ترکیبات معدنی) می‌تواند روش دیگر در کنار روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای تولید نانوذرات باشد. تولید زیستی نانوذرات، ریسک خطر پذیری برای انسان، هوا و در مجموع اکوسیستم را پایین می‌آورد (۱۰ و ۱۱). این مطالعه به منظور سنتر آبی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره قارچ دنبلان در مدت زمان ۷۲ ساعت و بررسی فعالیت ضد سرطانی آن بر روی سلول‌های سرطانی پستان MCF-7 با روش MTT انجام شد.

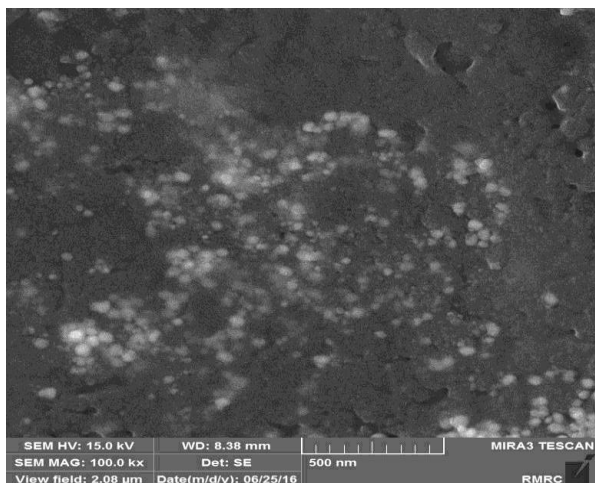
مواد و روش‌ها

تهیه عصاره آبی از قارچ (*Tuber spp.*): این مطالعه تجربی کاربردی از فروردین تا شهریور ماه سال ۱۳۹۶ انجام گرفت. بدین منظور قارچ دنبلان (*Tuber spp.*) از شهر مشگین استان اردبیل (از جهاد کشاورزی استان) تهیه شد. سپس با آب مقطر به خوبی شستشو و به قطعات ریز خرد و در محیط تاریک قرار داده شد تا به طور کامل خشک شوند. جهت تهیه عصاره آبی از قارچ دنبلان، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر شده به ۱۰۰ گرم قارچ اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. عصاره آبی حاصل پس از سرد شدن توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ تخلیص و در یخچال نگهداری شد.

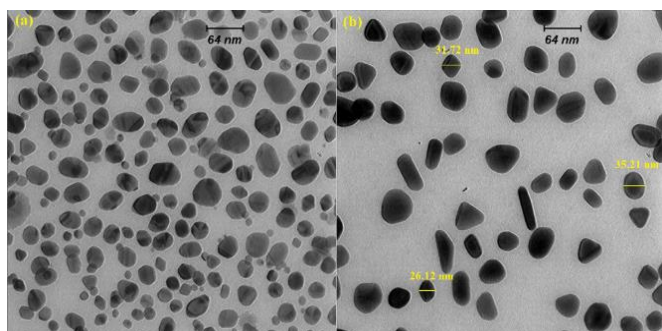
سنتر نانوذرات نقره از عصاره قارچ (*Tuber spp.*): جهت سنتر نانوذرات نقره از عصاره آبی قارچ دنبلان، میزان ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره آبی قارچ دنبلان به ۹۰ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره ۱ میلی‌مولار اضافه شد سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق و بر روی شیکر (دور ۲۰۰ rpm) نگهداری شد. میزان جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر UV2550 ساخت کشور ژاپن در محدوده ۷۰۰-۳۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات حاصل توسط سانتریفیوژ (دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه) جداسازی شده و پس از خشک شدن در دمای اتاق، درون ظرف شیشه‌ای در بسته قرار گرفتند و تا زمان استفاده در تاریکی نگهداری شدند.

تعیین ویژگی فیزیکوشیمیایی نانوذرات نقره: به منظور تعیین اندازه، خواص ساختاری، خواص اپتیکی، مورفولوژی و ریخت شناسی نانوذرات نقره سنتر شده از عصاره قارچ دنبلان (*Tuber spp.*)، بترتیب از دستگاه‌های پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی (FESEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) استفاده گردید. همچنین ثابت‌های کریستالی نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه پراش سنج پودری اشعه ایکس (XRD) مدل Philips X'pert Pro ساخت کشور هلند و جهت بررسی مورفولوژی، اندازه و همچنین توزیع پراکندگی نانوذرات نقره سنتر شده از عصاره قارچ دنبلان، به ترتیب از میکروسکوپ الکترونی عبوری (LEO-912AB) ساخت

نانوذرات نقره توسط میکروسکوپ الکترونی TEM نشان داد، اکثر نانوذرات حاصل دارای اندازه‌های در محدوده ۲۶ تا ۳۵ نانومتر بودند (شکل ۴).



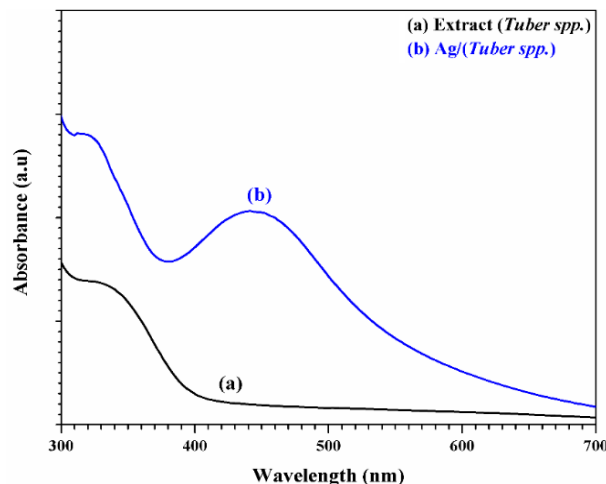
شکل ۳. تصاویر FESEM نانوذرات سنتز شده از عصاره آبی (*Tuber spp.*)



شکل ۴. تصاویر TEM نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی (a, b) (*Tuber spp.*)

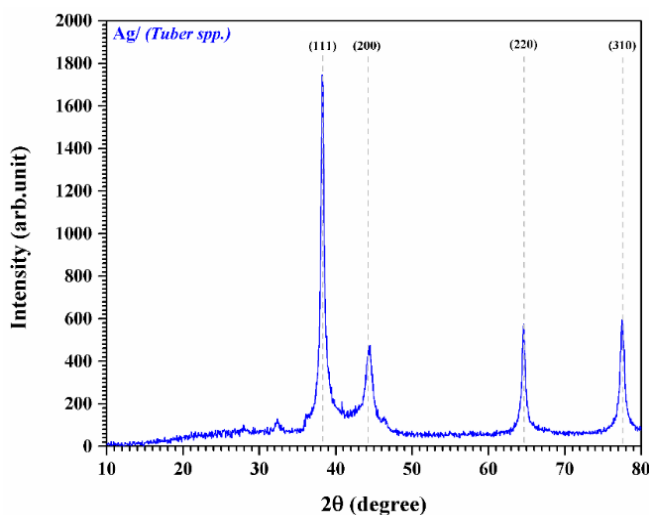
بررسی تاثیر نانوذرات نقره و عصاره آبی حاصل از قارچ دنبلان بر کشندگی سلول‌های MCF-7: نتایج حاصل نشان داد بین افزایش غلظت هر کدام از تیمارهای با غلظت‌های متفاوت نانوذرات نقره و عصاره آبی حاصل از قارچ دنبلان و درصد کشندگی سلول‌های MCF-7 رابطه خطی و معنی‌داری وجود دارد، به نحوی که با افزایش غلظت هر کدام از تیمارهای فوق‌الذکر، درصد کشندگی سلول‌های MCF-7 افزایش یافت (نمودار ۱). بطوریکه با افزایش غلظت نانوذرات و عصاره آبی حاصل از قارچ دنبلان از ۰/۰۶۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس از ۴۸ ساعت تیمار با سلول‌های MCF-7، میزان زنده‌مانی سلول به ترتیب ۶۵ و ۴۸ درصد کاهش یافت. همچنین این نتایج نشان داد نانوذرات نقره حاصل از عصاره آبی قارچ دنبلان، تاثیر کشندگی بالاتری بر سلول‌های سرطانی MCF-7 در مقایسه با عصاره آبی قارچ گیاه دنبلان دارد به گونه‌ای که در نسبت وزنی برابر با ۰/۱۲۵ و در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت، درصد زنده‌مانی در سلول‌های MCF-7 پس از تیمار با عصاره آبی و نانوذرات نقره حاصل از قارچ دنبلان به

اسپکتروفتومتری توسط دستگاه UV-Vis از عصاره آبی و نانوذرات حاصل از قارچ دنبلان پیک نسبتاً قوی در محدوده ۴۰۰ الی ۴۵۰ نانومتر تشکیل شد (شکل ۱).



شکل ۱. جذب اسپکتروفتومتری (UV-Vis) عصاره، (a) نانوذرات نقره

بررسی نانوذرات نقره توسط طیف XRD: طیف پراش پرتو اشعه ایکس نانوذرات سنتز شده در زمان ۷۲ ساعت نشان داد که پیک‌های مشاهده شده در زوایای ۳۸/۲۲ درجه، ۴۴/۱۹، ۶۴/۶۰ و ۷۷/۵۱ درجه به ترتیب مطابق با صفحات کریستالی (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۰) می‌باشند که این نتایج منطبق بر طیف استاندارد بالک نقره بودند (شکل ۲).

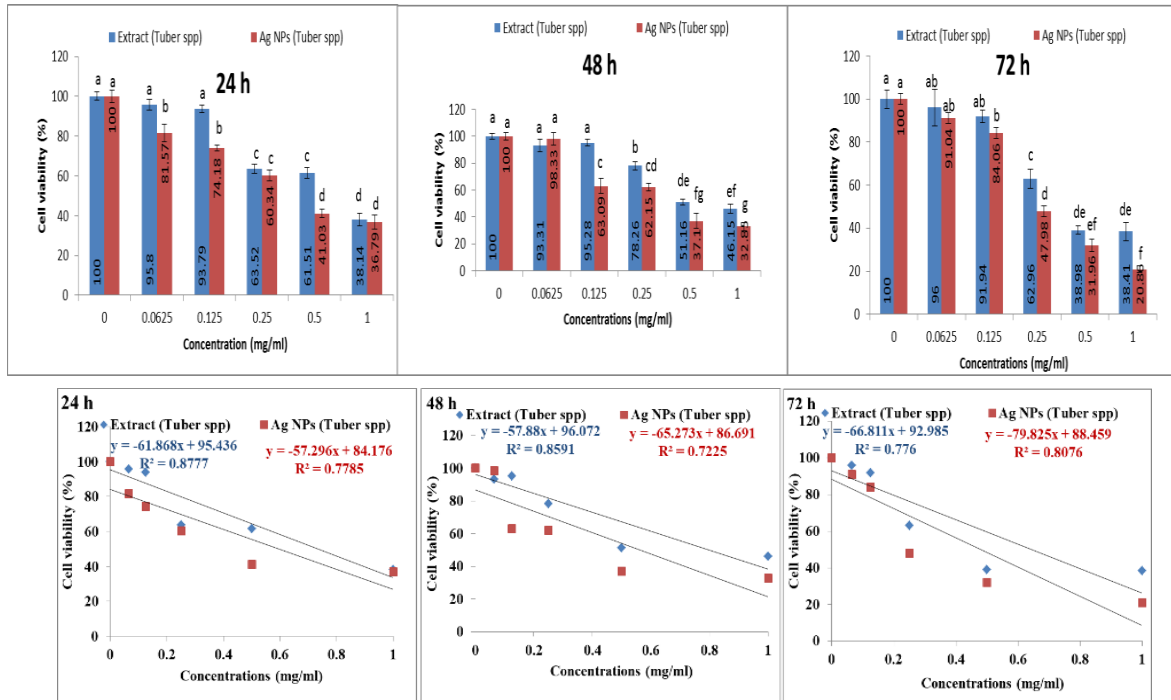


شکل ۲. الگوی پراش اشعه ایکس XRD از نانوذرات نقره سنتز شده در مدت زمان ۷۲ ساعت از عصاره قارچ دنبلان (*Tuber spp.*)

بررسی خصوصیات مرفولوژیکی نانوذرات نقره توسط میکروسکوپ‌های الکترونی FESEM و TEM: تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) نانوذرات نقره حاصل از عصاره آبی قارچ دنبلان از ساختار کروی و یکنواختی نسبتاً بالایی برخوردار بودند (شکل ۳). در تصویربرداری نانوذرات نقره توسط میکروسکوپ TEM علاوه بر ساختار کروی مقدار کمی از نانوذرات در اشکال مثلثی، بیضوی و میله‌ای نیز مشاهده شدند. نتایج حاصل از بررسی اندازه

عصاره آبی قارچ دنبلان در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با ۰/۸، ۰/۷۳ و ۰/۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود در صورتی که این میزان برای نانوذرات نقره حاصل از عصاره آبی قارچ دنبلان به ترتیب برابر با ۰/۵۶، ۰/۴۸ و ۰/۴۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (جدول ۱).

ترتیب برابر با ۶۳ و ۹۵ درصد بود. ره حاصل از قارچ دنبلان جهت کشندگی ۵۰ درصد از سلول‌های MCF-7 (IC50)، روند مشابهی را نشان داد. میزان IC50 بدست آمده از نانوذرات نقره حاصل از عصاره آبی قارچ دنبلان به طور معنی‌داری پایین تر از عصاره آبی قارچ گیاه دنبلان بود. به عنوان مثال میزان IC50 برای



نمودار ۱. مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های متفاوت عصاره آبی و نانوذرات حاصل از قارچ دنبلان بر زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و میانگین زنده مانگی سلول‌های MCF-7 (تمامی تیمارها در ۳ تکرار انجام شده حرف کوچک غیر مشترک نشان دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد)

جدول ۱. مقدار IC50 محاسبه شده در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی سلول‌های MCF-7

Variable	Time	24 h (mg/ml)	48 h (mg/ml)	72 h (mg/ml)
Extract (Tuber spp)		۰/۷۳	۰/۸	۰/۶۴
Ag NPs (Tuber spp)		۰/۵۶	۰/۵۶	۰/۴۸

زرد به قهوه ای پررنگ نشان دهنده احیای یون‌های نقره و تشکیل نانوذرات بود که اولین نشانه از تولید نانوذرات نقره محسوب می شود که این تغییر رنگ ناشی از ارتعاشات پلاسمون سطحی در نانوذرات است. نتایج نشان داد که λ_{max} در حدود ۴۵۰ نانومتر است که با نتایج سایر محققین هم خوانی دارد (۱۵ و ۱۴). سائز کریستالی نانوذرات نقره از رابطه شرر $D = \frac{k\lambda}{2.303 \cos \theta}$ به دست می‌آید که اندازه کریستالی نانوذرات برابر با ۲۵ نانومتر است. که این یافته با نتایج حاصل از پژوهش سایر محققین هم خوانی دارد (۱۵). تصاویر میکروسکوپ الکترون روبشی گسیل میدانی نانوذرات نقره سنتز شده نشان داد که شکل نانوذرات کاملاً کروی بوده و توزیع نانوذرات نیز یکنواخت می باشد. اندازه تقریبی نانوذرات ۷۲ ساعت حدود ۲۶/۸ نانومتر می باشد. تصویر TEM نشان داد که نانوذرات به طور عمده کروی شکل است اما اشکال دیگر مانند مثلثی هم در تصویر مشاهده می شود و اندازه آن ها بین ۲۶ تا ۲۵ نانومتر است. البته تغییرات دما و pH و مدت زمان و غلظت های مختلف

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص شد که عصاره قارچ دنبلان قادر به احیای یون Ag^+ به نانو ذرات نقره می باشد. همچنین نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی دارای سمیت سلولی بیشتری بر روی سلول‌های سرطانی رده MCF-7 هستند. Shankar و همکاران تولید نانوذرات نقره توسط گیاه *Azadirachta indica* را انجام داده اند. این گروه اندازه نانوذرات را بین ۵ تا ۳۵ نانومتر و شکل آن ها را کروی گزارش کردند (۱۲). Sankar و همکارانش نانوذرات نقره را به روش زیستی از عصاره نوعی مرزنجوش به نام *Origanum vulgare* سنتز کردند. پس از عصاره گیری از گیاه، محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار را با نسبت ۱ به ۹ با عصاره ترکیب نموده و پس از ۱۵ دقیقه تغییر رنگ مشاهده شد و آنالیز UV-vis، یک پیک جذب در ۴۴۰ نانومتر را نشان داد. اندازه و شکل نانوذرات با استفاده از دستگاه SEM حدود ۸۵-۶۳ نانومتر و کروی تعیین شد (۱۳). تغییر رنگ مشاهده شده از

کاسپاز ۳ در سلول های سرطانی و القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی در مطالعات مختلف نشان داده شده است (۱۸ و ۱۹). بنابراین با توجه به میزان فعالیت بالای میتوکندری در فرآیند تنفس سلول های سرطانی نسبت به سلول های طبیعی، بستر مناسبی برای عنصر نقره جهت تخریب سلول های سرطانی فراهم می شود. نتایج نشان داد عصاره قارچ دنبلان قادر به احیای یون Ag^+ به نانو ذرات نقره می باشد. همچنین نانو ذرات نقره تولید شده به روش سبز سمیت سلولی بیشتری نسبت به عصاره قارچ دارد، این اثر از مکانیسمی پیش می رود که مانع پیشرفت چرخه سلولی از G_1 به مرحله S و افزایش مرگ سلولی و آپوپتوز در سلول های $MCF7$ می شود، در ضمن نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی می تواند به عنوان راهکاری مناسب در درمان سرطان استفاده شود ولی نیاز به انجام کارهای تکمیلی و تحقیقاتی زیادی است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت های دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل و همچنین از زحمات همکاران مرکز تحقیقات سلول های بنیادی دانشگاه جهت همکاری در این تحقیق، تقدیر و تشکر می گردد.

بر هم کنش محلول نمکی و عصاره مورد نظر می تواند بر روی دامنه تغییرات اندازه نانو ذرات تاثیر داشته باشد (۱۳). نتایج بررسی های حاصل از آزمون MTT نشان داد که با افزایش مدت زمان تیمار به ۷۲ ساعت اثرات سمیت سلولی بیشتر شده است. به طور کلی می توان گفت که نانوذرات می توانند به صورت وابسته به غلظت و زمان منجر به کاهش زیست پذیری سلول ها شوند. شکل نانوذرات بر میزان سطح تماس و رهایش یون نقره اثر گذار خواهد بود. از آن جا که تمایل پروتئین ها برای پیوستن به لبه های نوک تیز بیشتر است، از این رو تمایل به چسبندگی به ذرات مکعبی یا مثلثی بیشتر خواهد بود (۱۶). در مطالعه ای $Devi$ و همکاران سنتز نانوذرات نقره از طریق احیای گیاهی *Ulva lactuca* با سایز بین ۲۰ تا ۵۶ نانومتر را ارائه نمودند و اثرات ضدسرطانی آن روی رده های $MCF-7$ ، $HT29$ ، $HepG2$ و سلول نرمال را نشان دادند. در تحقیق آنها اثرات سمیت بیشتر با مقدار IC_{50} ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر در ۲۴ ساعت تیمار در مورد رده سلولی سرطان کبد نسبت به رده های دیگر و رده سلول نرمال مشاهده شد (۱۷). در نانوذرات نقره سنتز شده در این پژوهش، شکل مثلثی هم مشاهده می شود که می تواند یکی از دلایل کشندگی این نانوذرات باشد. مسیر مرگ سلولی می تواند شامل فعال سازی رویدادهای پروآپتوتیک اندامک میتوکندری در سلول باشد که با آزادسازی سیتوکروم C از آن آغاز می شود. علاوه بر این اثرات نانوذرات نقره در افزایش بیان ژن پروتئاز

Cytotoxicity Effects of Green Synthesized Silver Nanoparticles by Using the Extract of Tuber Spp. on Breast Cancer (MCF-7) Cells

Sh. Nedaei (MSc)¹, H. Akbari (PhD)^{*2}, H. Yaghoubi (PhD)¹

1. Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, I.R.Iran

2. Department of Physics, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 242-48

Received: Aug 27th 2018, Revised: Dec 4th 2018, Accepted: Jan 9th 2019.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Silver nanoparticles have antibacterial and anticancer activity. But the organic solvents used to produce these nanoparticles are toxic and can have devastating environmental effects. Therefore, there is a strong desire to use healthy methods for the synthesis of silver nanoparticles. Therefore, this study was performed to synthesize silver nanoparticles biologically from aqueous extract of Truffle and to study their biological effects on cancer cells.

METHODS: In this experimental study, to synthesize silver nanoparticles from aqueous extract of Truffle, 10 ml of fungus extract was added to 90 ml of 1 ml silver nitrate solution and incubated for 72 hours at room temperature. The physicochemical properties of the nanoparticles synthesized by XRD, FESEM and TEM were analyzed. Effects of Extract and Synthesized Nanoparticles were studied by MTT at concentrations of 0.025, 0.25, 0.25, 0.5 and 1 mg / ml on MCF-7 Cancer Cells at 72, 48, and 24 hours.

FINDINGS: The size of the nanoparticles was between 19 and 35 nm and their shape was mainly spherical. In cytotoxicity assay using MTT assay IC₅₀ calculated for silver nanoparticles and extract in MCF-7 cells showed that silver nanoparticles had more cytotoxic effects than extract. The calculated IC₅₀ for extracts and nanoparticles at 24, 48 and 72 hours were 0.73, 0.8, and 0.64 mg / ml, respectively, and for the nanoparticles were 0.6, 0.5, and 0.48, respectively (p < 0.05).

CONCLUSION: The silver nanoparticles produced by bio-synthesis method have a higher cytotoxicity than the truffle fungus (*Tuber spp.*) extract.

KEY WORDS: Silver Nanoparticles, Truffle Fungus(*Tuber spp.*), Bio-synthesis, MTT, MCF-7 Cell Line.

Please cite this article as follows:

Nedaei Sh, Akbari H, Yaghoubi H. Cytotoxicity Effects of Green Synthesized Silver Nanoparticles by Using the Extract of Tuber Spp. on Breast Cancer (MCF-7) Cells. J Babol Univ Med Sci. 2019;21:242-48.

* Corresponding Author: H. Akbari (PhD)

Address: Department of Physics, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Basij Sq., Ardabil, I.R.Iran

Tel: +98 45 33722021

E-mail: yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

References

1. Wu S, Powers S, Zhu W, Hannun YA. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature*. 2016; 529(7584): 43-7.
2. El kassas HY, Attia AA. Bactericidal application and cytotoxic activity of biosynthesized silver nanoparticles with an extract of the red seaweed *Pterocladia capillacea* on the Hep G2 cell line. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(3): 1299-306.
3. Hekmat A, Saboury AA, Divsalar A. The effects of silver nanoparticles and doxorubicin combination on DNA structure and its antiproliferative effect against T47D and MCF-7 cell line. *J Biomed Nanotechnol*. 2012; 8(6):968-82.
4. Jeyaraj M, Sathishkumar G, Sivanadhan G, Mubarak Ali D, Rajesh M, Arun R, et al. Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment on experimental report. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013; 106: 86-92.
5. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine*. 2010; 6(2): 257-62.
6. Slama A, Neffati M, Boudabous A. Biochemical composition of truffle *Terfezia boudieri* chatin. *Acta Hort*. 2010; 853: 285-90.
7. Dundar A, Yesil OF, Acay H, Okumus V, Ozdemir S, Yildiz A. Antioxidant properties, chemical composition and nutritional value of *Terfezia boudieri* (chatin) from Turkey. *Food Sci Technol Int*. 2012; 18(4): 317-28.
8. Al-Laith AAA. Antioxidant components and antioxidant/ antiradical activities of desert truffle (*Tirmania nivea*) from various Middle Eastern origins. *J Food Compos Analys*. 2010; 23(1): 15-22.
9. Zabihi E, Motavallibashi SE, Bamdad Kh, Pilevaribadi F, Sheikhkanlou Milan H. The effect of hydroalcoholic extract of truffle on estrogen and progesterone levels in experimental model of multiple sclerosis (ms) in female rats. *Arak Med Univ J*. 2017; 20(3): 48-56. [In Persian]
10. Salehi S, Shandiz SA, Ghanbar F, Darvish MR, Ardestani MS, Mirzaie A, et al. 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.
11. Singh H, Du J, Yi TH. Green and rapid synthesis of silver nanoparticles using *Borago officinalis* leaf extract: anticancer and antibacterial activities. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2016; 45(7): 1310-6
12. Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry M. Rapid synthesis of Au, Ag and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *J Colloid Interface Sci*. 2004; 275(2): 496-502.
13. Sankar R, Karthik A, Prabu A, Karthik S, Shivashangari KS, Ravikumar V. *Origanum vulgare* mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013; 1(108): 80-4.
14. Patil MP, Kim GD. Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. *Appl Microbiol Bio-technol*. 2017; 101(1): 79-92.
15. Aboelfetoh EF, El-Shenody RA, Ghobara MM. Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using green algae (*Caulerpa serrulata*): reaction optimization, catalytic and antibacterial activities. *Environ Monit Assess*. 2017; 189(7): 349.
16. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*. 2009; 27(1): 76-83.
17. Devi SJ, Bhimba BV. Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized by the seaweed *Ulva lactuca* invitro. *Sci Rep*. 2012; 1(4):1-5.
18. Khatami M, Kharazi S, Kishani Farahani Z, Azizi H, Augusto Lima Nobre M. The anti-cancer effect of octagon and spherical silver nanoparticles on MCF-7 breast cancer cell line. *Tehran Univ Med J*. 2017; 75 (1):72-6. [In Persian]
19. Riaz Ahmed KB, Nagy AM, Brown RP, Zhang Q, Malghan SG. Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. *Toxicol In Vitro*. 2017; 38: 179-92.