

سنن زیستی نانوذرات نقره با کمک عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا و ارزیابی فعالیت های ضد سرطانی و ضد باکتریایی آن

ترانه قاسمی پور^۱، علی صالح زاده^{۱*}، سید عطا اله سادات شانینز^۲

^۱ گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران، آگروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۶/۳/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۶

چکیده

زمینه و هدف: ظهور نانوتکنولوژی یکی از حوزه های امیدوارکننده تحقیق های پزشکی به شمار می رود. امروزه، روش های زیستی سنن زانو ذرات در جهت مبارزه با بسیاری از بیماری ها مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیت ضد سرطانی و ضد باکتریایی نانوذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی بیوسنتز نانو ذرات نقره با استفاده از احیای یون های نقره با کمک عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا انجام گرفت. تکنیک هایی مانند تفرق اشعه ایکس، میکروسکوپ الکترونی روبشی و گذاره جهت تایید نانوذرات نقره مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بررسی فعالیت ضد باکتریایی نانونقره سنن زانو از روش رقت سازی سریالی آزمون میکروداپلوشن برات برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) استفاده شد. اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره بر روی رده سلولی سرطانی پستان T47D با روش رنگ سنجی MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. هم چنین کیت انکسین ۰/۵ پروپیدیوم یوداید و دستگاه فلوسیتومتری به منظور بررسی میزان درصد آپوپتوز و نکروز در سلول های سرطانی تیمار شده با نانوذرات نقره نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: مشخصه یابی نانو ذرات نقره بیوسنتز شده نشان داد که این نانوذرات دارای متوسط اندازه ۳۰ نانومتر با ریخت شناسی غالب کروی بودند. ارزیابی ویژگی ضد باکتریایی نانوذرات بیوسنتز شده نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی آنها برای اشیشیاکلی، اسیتوباکتر بومانی و استافیلوکوک اورئوس به ترتیب برابر ۲۵، ۵۰ و ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود. نتایج کشندگی سلولی نانوذرات نشان داد که اثر آن بستگی به غلظت و زمان تیمار نانوذرات نقره بر روی سلول های سرطانی دارد. به علاوه، نتایج فلوسایتمتری میزان مرگ سلولی از نوع آپوپتوز را ۳۵ درصد در رده سلولی T47D نشان شد.

نتیجه گیری: نانوذرات بیوسنتز شده به روش زیستی دارای فعالیت های ضد سرطانی و ضد باکتریایی می باشد و می تواند در جهت درمان سرطان پستان و عفونت های ناشی از باکتری های پاتوژن مورد مطالعه بیشتری قرار گیرند.

واژه های کلیدی: ضد سرطانی، آپوپتوزیس، اسیلاتوریا، ضد باکتریایی

* نویسنده مسئول: علی صالح زاده، رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، گروه زیست شناسی

Email: salehzadeh@iaurasht.ac.ir

مقدمه

استفاده از نانوذرات فلزی یکی از رویکردهای اخیر در جامعه علمی بوده که بیشتر مورد توجه قرار گرفته شده است (۱-۴). تاکنون از طلا، نقره و مس در ساخت نانو ذرات با فعالیت ضد میکروبی استفاده شده است (۵). در میان محصولات مهم نانو تکنولوژی، به کارگیری نانوذرات نقره (AgNPs) با اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر به عنوان کاندیدای مؤثری در جهت رساندن بسیاری از بیومولکول‌های بزرگ یا مولکول‌های دارویی به کار گرفته شده‌اند (۶ و ۷). نانوذرات نقره دارای ویژگی‌های مشخص زیستی با کاربردهای متنوع در درمان‌های ضدقارچی، ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدسرطانی (۸-۱۱) هستند. در حالی که هنوز مکانیسم عملکرد ضد باکتریایی آن به طور قطعی مشخص نشده است. یافتن این خاصیت نانو ذرات نقره منجر به اهمیت مؤثر آن در زیست‌شناسی و نانوزیست فناوری شده است (۱۳ و ۱۲). همچنین نقره در پزشکی دارای کاربردهای مختلفی همچون درمان عفونت‌های خارجی، پانسمان زخم‌ها، کاربرد آنتی‌سپتیک و گندزدایی وسایل پزشکی دارد. اخیراً روش‌های بیوسنتزی که از میکروارگانیسم‌هایی مثل قارچ‌ها، باکتریها و یا از عصاره‌های گیاهان استفاده می‌کنند، به عنوان روش‌های بسیار ساده و قابل قبول جایگزین سنتز فیزیکی و شیمیایی پیچیده برخی از نانو ساختارها شده‌اند. بنابراین، دست یابی به دانش سنتز نانو ساختارها با استفاده از روش‌های دوستدار محیط زیست و

اصطلاحاً روش‌های زیستی بسیار مهم می‌باشد (۱۴). بیوسنتزها مزایای بسیاری از قبیل؛ هزینه کمتر، سازگاری با محیط زیست و امکان تولید آسان در مقیاس بالا را دارا می‌باشند (۱۵). همچنین در روش‌های بیوسنتزی نیازی به استفاده از دما و فشار بالا و همچنین ترکیب‌های شیمیایی سمی نیست، بنابراین این رویکرد به عنوان یک روش اقتصادی و ارزشمند می‌تواند در جهت تولید نانوذرات فلزی در مقیاس صنعتی مورد استفاده قرار گیرد. در روش‌های زیستی، عصاره موجودات زنده ممکن است هم به عنوان عوامل احیاء کننده و هم به عنوان عوامل پوشش دهنده جهت جلوگیری از تجمع نانوذرات سنتز نانوذرات نقره عمل کنند. کاهش یون Ag^+ می‌تواند به وسیله ترکیب مولکول‌های زیستی موجود در این عصاره مانند آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، پلی ساکاریدها، و ویتامین‌ها که برای محیط زیست بی خطر است، انجام شود (۲۲-۱۶). در این میان مشخص شده است که عصاره سیانوباکتری‌ها منبعی از ترکیب‌های با ارزش مانند کارتنوئیدها، اسیدهای چرب، پلی ساکاریدها، لیپوپپتیدها و سایر ترکیب‌های زیست فعال می‌باشند که باعث سنتز ترکیب‌هایی در محیط کشت می‌شوند. لذا به همین دلیل مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند (۲۳). متابولیت‌های ثانویه عمدتاً در اعضای اسیلاتوریال (۴۹ درصد) و پس از آن به وسیله نوستوکال (۲۶ درصد)، کروکوکال (۱۶ درصد)، پلوروکاپسال (۶ درصد) و استیگونماتال (۴ درصد) وجود دارند. از جمله کاربردهای

میلی لیتر در دقیقه) در دمای اتاق ۲۶ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از این مدت، محیط کشت حاوی سیانوباکتری از کاغذ صافی واتمن با قطر منفذ ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد و مخلوط صاف شده لیوفیلیزه گردید. به منظور تهیه عصاره سیانوباکتری، ۶ گرم پودر خشک شده آن با ۲۰۰ میلی لیتر اتانول ۵۰ درصد تحت شرایط همزدن در طی یک شبانه روز مخلوط شد. سپس محلول مورد نظر از کاغذ صافی عبور داده شد و به وسیله دستگاه تقطیر در خلاء تا حد خشکی تغلیط و غلظت آن تعیین شد.

بیوسنتز نانو ذرات نقره از روش رسوب گذاری با احیای یون های نقره به وسیله عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا انجام شد. به منظور بیوسنتز نانو ذرات نقره، با افزودن ۲ سی سی از حجم عصاره سیانوباکتر به نیترات نقره (مرک، آلمان) با غلظت ۰/۰۱ میلی مولار تحت شرایط همزدن و دمای آزمایشگاه در مدت زمان یک ساعت از زمان واکنش انجام گرفت. پس از گذشت این مدت، احیای یون های Ag^+ به Ag^0 به همراه تغییر رنگ واکنش مشاهده شد. به منظور خالص سازی و شستشوی نانوذرات، مخلوط حاصل سه بار با آب مقطر در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بیوسنتز نانوذرات نقره با تغییر رنگ واکنش طی مدت ۱ ساعت از زمان واکنش مشاهده شد. عصاره سیانوباکتری با کمک ماده مؤثره آن منجر به احیای کامل نمک نیترات نقره به نانو ذرات نقره شد. در این فرآیند، تغییر رنگ محلول مشخص کننده

سیانوباکتری ها در داروسازی و پزشکی می توان در به کارگیری آن ها به عنوان داروهای مختلف ضد ویروس، ضد سرطان، ضد قارچ، سایتوتوکسین، مهار آنزیمی و غیره اشاره نمود (۲۴ و ۲۵). از آنجایی که جنس اسیلاتوریا دارای ترکیب های فعال زیستی بیشتری می باشد، به نظر می رسد که توانایی احیای نمک نقره را دارا می باشد. بنابراین به کارگیری عصاره آنها جهت بیوسنتز نانوذرات فلزی از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۸ و ۲۷). بنابراین در مطالعه حاضر بیوسنتز نانو ذرات نقره با کمک روش رسوب گذاری با احیای یون های نقره به وسیله عصاره سیانوباکتری اسیلاتوریا انجام شده است. در قدم بعد، فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات نقره سنتز شده علیه برخی باکتری های گرم مثبت و منفی انجام گرفت. همچنین، به منظور ارزیابی میزان درصد آپوپتوز و نکروز القا شده در سلول های سرطانی پستان T47D تیمار شده با نانوذرات نقره، این سلول ها با دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش بررسی

پس از تهیه استوک سیانوباکتری اسیلاتوریا از آزمایشگاه بخش فیزیولوژی گیاهی دانشگاه گیلان، در محیط کشت زایلندر منفی (سیگما، آلمان) کشت داده شد. سپس سیانوباکتری ها به یک لیتر از محیط کشت تلقیح شدند و در شرایط شدت نور ۶۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه با دوره نوری (۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی به همراه هوادهی ۲۰۰

احیای نمک نیترات نقره و تشکیل نانوذرات نقره در واکنش می‌باشد. احیای کامل یون‌های Ag^+ به نانوذرات نقره با تغییر رنگ محیط مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور شناخت نوع ساختار کریستالوگرافی نانوذرات نقره آزمون پراش اشعه ایکس (XRD)^(۱) به وسیله دستگاه Panalytical, X, PERT PRO ساخت کشور هلند با تشعشع لامپ CuK α و زاویه ۲ تا (۲ θ) در دامنه ۰ تا ۱۱۰ درجه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین جهت یافتن ریخت‌شناسی و شکل نانوذرات، آنالیز میکروسکوپی الکترونی گذاره (TEM)^(۲) (مدل KV ۱۰۰ Zeiss)، ساخت کشور آلمان مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور، بر روی گرید فیلم کربنی، یک قطره از نمونه سوسپانسیون نانوذرات قرار داده شد و پس از خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با کمک دستگاه میکروسکوپ الکترونی گذاره با ولتاژ شتاب دهنده ۱۲۰ کیلوولت عکس برداری شد.

بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات نقره به وسیله روش حداقل غلظت مهار (MIC) انجام شد. مقدار غلظت MIC به کمترین غلظت از ترکیب‌هایی که رشد میکروارگانیسم را مهار می‌نماید، گفته می‌شود. بدین منظور، ابتدا باکتری‌های بیماری‌زای آسینتوباکتر بومانی، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی (10^6 CFU/mL) در محیط کشت مایع به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به منظور به دست آوردن سوسپانسیون‌های یکنواخت و همگن از معیار کدورت سنجی استاندارد نیم مک فارلند استفاده شد. سپس رقت‌های متوالی از

نانوذرات نقره در محدوده غلظت از ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶، ۰/۷۸ میکرولیتر بر میلی‌لیتر تهیه گردید. پس از آن پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به کمک توزیع ۹۵ میکرولیتر از محیط مولر هیتون برات، ۵ میکرولیتر از تلقیح میکروبی و ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذرات نقره با غلظت‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفتند. چاهک انتهایی پلیت به عنوان شاهد (شامل ۹۵ میکرولیتر محیط مولر هیتون برات با ۵ میکرولیتر از باکتری‌های منتخب بدون نانوذرات) استفاده شد. محتویات هر چاهک روی شیکر به مدت ۱ دقیقه در ۱۰۰ دور بر دقیقه مخلوط گردید و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از این مدت، کدورت تمامی چاهک‌ها با استفاده از دستگاه قرائت گر ایزا در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانش شد. چاهکی که کدورت آن به علت عدم رشد باکتری شفاف‌تر بود، به عنوان مقدار MIC نانوذرات نقره گزارش شد.

میزان سمیت نانو ذرات از روش رنگ‌سنجی MTT (-2,5-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3-Diphenyltetrazolium Bromide) ارزیابی شد. رده سلولی سرطانی پستان (T47D) از بانک سلولی انسیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI₁₆₄₀ مکمل شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)^(۳) در شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن، رطوبت

1-X-Ray Diffraction
2-Transmission Electron Microscopy
3-Fetal Bovine Serum

به منظور ارزیابی میزان درصد آپوپتوز و نکروز القا شده در سلول های سرطانی T47D تیمار شده با غلظت IC_{50} نانوذرات نقره، این سلول ها با دستگاه فلوسایتومتری مطالعه شدند. در طی فاز اولیه مرگ برنامه ریزی شده آپوپتوز، براساس جا به جایی فسفولپیدهای فسفاتیدیل سرین (PS)^(۳) از نیم لایه داخلی غشاء سلولی به نیم لایه خارجی غشاء سلولی با معرف انکسین ۵ رنگ می گیرند. همچنین معرف PI^(۴) نیز در زمان نکروز سلولی باعث رنگ آمیزی هسته های سلول می شود. ارزیابی درصد القای آپوپتوز و نکروز در رده سلولی سرطانی T47D تیمار شده با نانوذرات نقره با استفاده از روش Annexin V/propidium iodide (PI) و بر اساس دستورالعمل کیت تشخیص Apoptosis (Roch, Germany) انجام گرفت. سلول های T47D (1×10^5 سلول/چاهک) با غلظت IC_{50} نانوذرات به مدت ۲۴ ساعت در پلیت ۶ خانه ای تیمار شدند. پس از جمع آوری و سانترفیوژ، سلول ها با بافر PBS^(۵) شسته شدند و سپس با حجم ۲۰ میکرولیتر از رنگ انکسین ۵ و پروپیدیدوم دید به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط تاریکی انکوبه شدند. در این مطالعه، سلول های تیمار نشده با نانوذرات به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت میزان درصد سلول های آپوپتوز/نکروز شده به وسیله

۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در فلاسک کشت سلول کشت داده شدند. سلول ها از فلاسک کشت سلولی جداسازی و جمع آوری شدند. پس از افزودن محیط کشت، سوسپانسیون سلولی به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه ای با حجم ۱۰۰ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی میزان 10^5 منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط کشت انکوبه شد. پس از گذشت این مدت زمان، محیط کشت تخلیه شد و نانوذرات نقره با غلظت های ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ای اضافه شد. چاهک های حاوی سلول های تیمار نشده با نانوذرات به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. پس از پایان انکوباسیون، مقدار ۱۰ میکرولیتر رنگ MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت انکوباسیون انجام گرفت. به منظور حل نمودن کریستال های بنفش رنگ فورمازان (شاخص مولکولی سلول های زنده) تولید شده به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO)^(۱) اضافه شد. سپس جذب نوری به وسیله دستگاه قرائتگر الیزا و در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت گردید. میزان دوز ۵۰ درصد کشندگی (IC_{50})^(۲) محاسبه شد. نتایج برحسب درصد سلول های زنده تیمار شده نسبت به سلول های تیمار نشده، از رابطه ی زیر محاسبه شد؛ $100 \times$ (جذب نوری سلول های تیمار نشده/جذب نوری سلول های تیمار شده با نانوذرات) = درصد سلول های زنده

1- Dimethyl Sulfoxide

2-Half Maximal Inhibitory Concentration

3- Phosphatidylserine

4-Propidium Iodide

5-Phosphate Buffered Saline

دستگاه فلوسیتومتری (Cyflow, UK) مورد مطالعه قرار گرفتند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند. همچنین تمامی نتایج به دست آمده در این پژوهش براساس حداقل سه بار تکرار استوار است که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار میزان تغییرات ارزیابی شد.

یافته‌ها

الگوی پیک‌های حاصل از طیف تفرق اشعه ایکس، تشکیل کریستال‌های نقره را در نمونه تأیید نمود (تصویر ۱). پیک‌های مجزا در زوایای ۲ تا (θ) ۳۸، ۴۴، ۶۴ و ۷۷ درجه مشاهده می‌شود که به ترتیب با سطوح کریستالی (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) نقره همخوانی دارد.

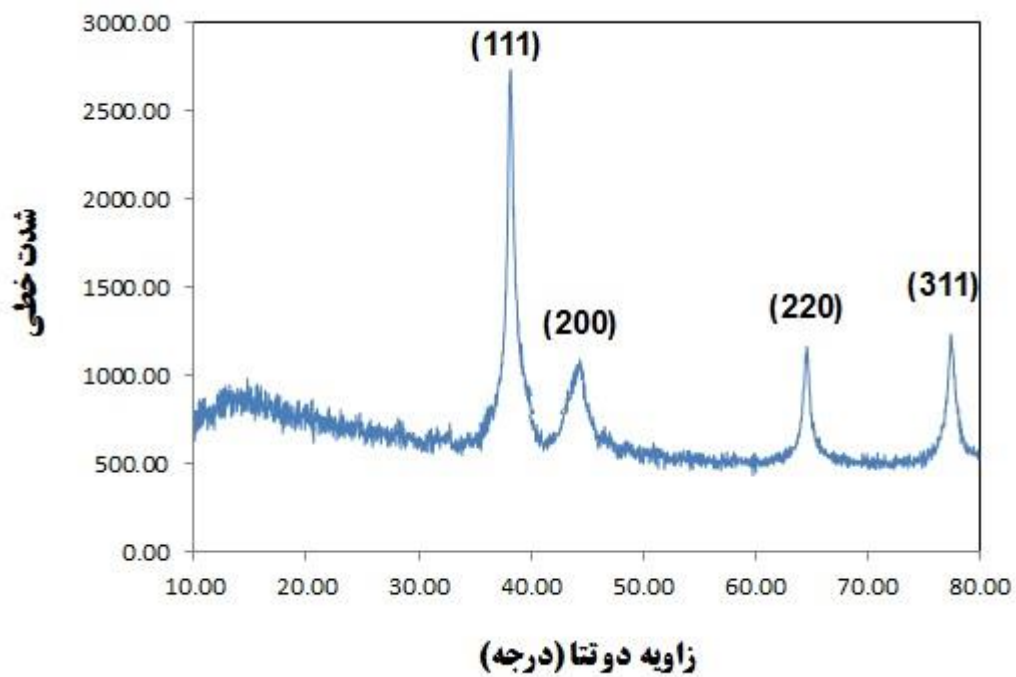
تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM نانوذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره اسیلاتوریا در تصویر ۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج میکروگراف الکترونی نانوذرات نقره مشخص شد که اندازه‌ای در محدوده ۵ تا ۳۰ نانومتر دارند و غالباً به شکل کروی دیده می‌شوند.

نتایج حاصل از آزمون رقت‌گیری سریالی نانوذرات نقره علیه باکتری‌ها محاسبه شد. نانوذرات

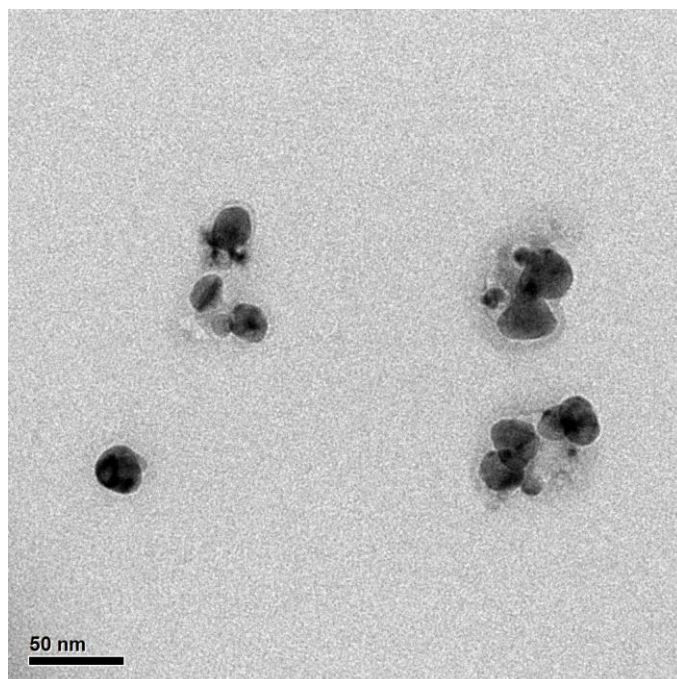
نقره سنتز شده فعالیت خوبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی در این مطالعه از خود نشان داد. به طوری که اشیریشیاکلی، اسینتوباکتر بومانی و استافیلوکوک اورئوس در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ و ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب مهار شدند.

بیشترین مهار تکثیر سلولی نانوذرات نقره بیوسنتزی در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد که از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است ($p < 0.001$). مقدار عددی IC_{50} در طی زمان ۲۴ ساعت در غلظت ۲۹/۶۶ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد. نتایج حاصل از بقای سلول‌ها در مدت زمان ۲۴ ساعت در تصویر ۳ نشان داده شده است.

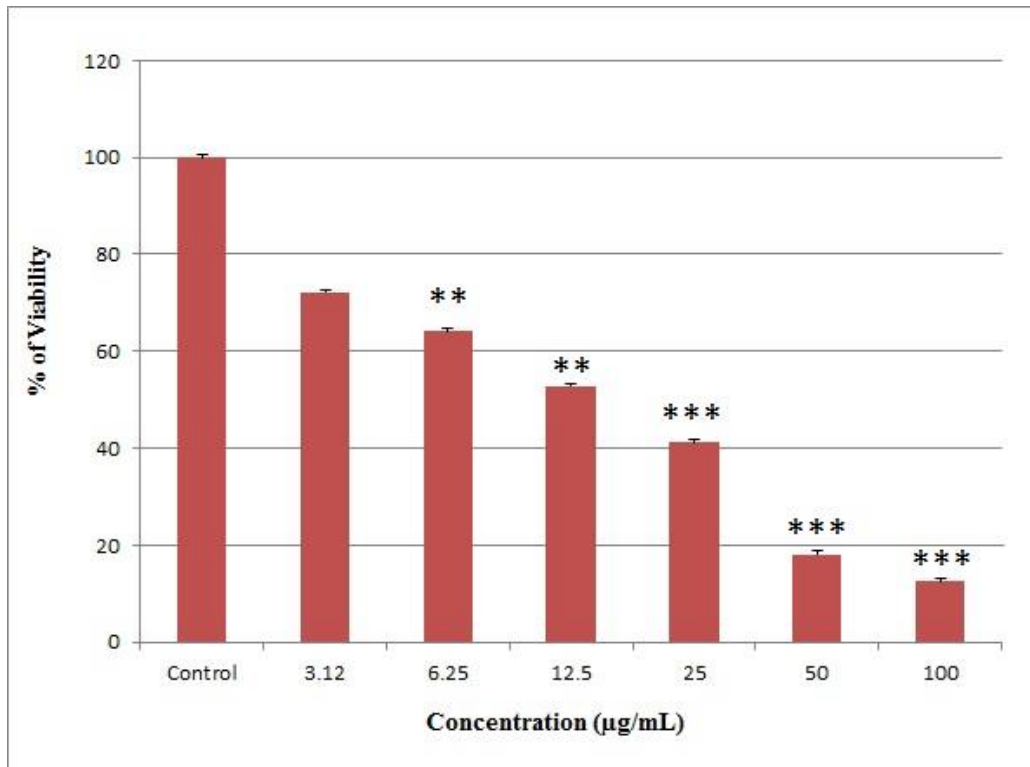
یافته‌های حاصل از بررسی فلوسایتومتری در تصویر ۴ نشان داده شده است. همان‌طوری که نتایج نشان می‌دهد، مربع سمت چپ پایین، درصد سلول‌های زنده، و مربع سمت راست پایین، درصد سلول‌های نکروز را نشان می‌دهد. همچنین مربع‌های سمت چپ و سمت راست بالا به ترتیب درصد آپوپتوزهای اولیه و تأخیری را نشان می‌دهند. در نمونه‌های تحت تیمار با نانوذرات نقره، سلول‌ها وارد مرگ سلولی از نوع آپوپتوز به میزان ۳۵ درصد شدند.



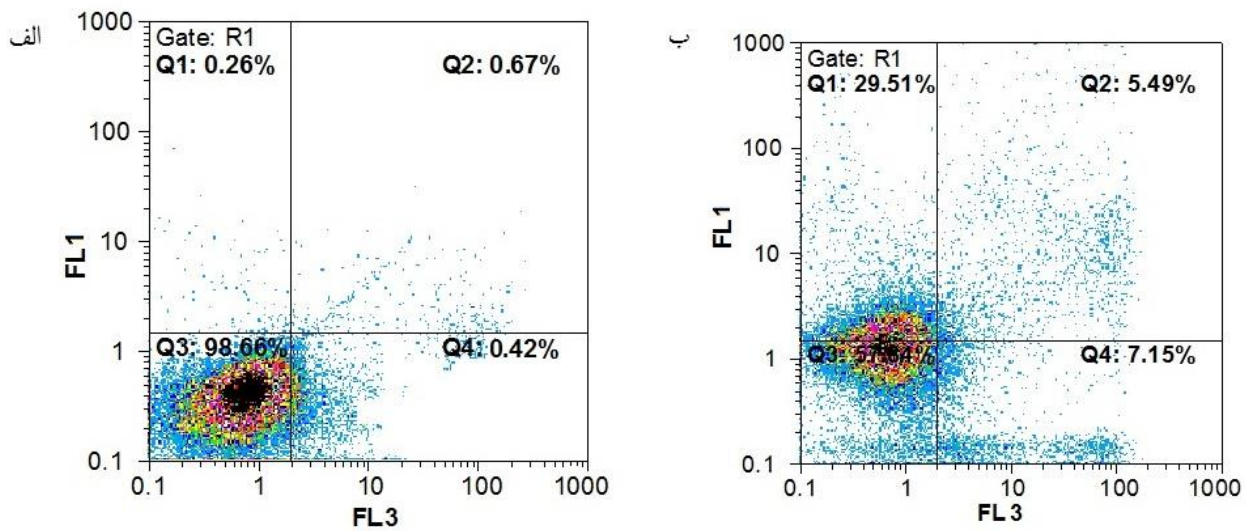
تصویر ۱: الگو پراش اشعه ایکس به دست آمده از نانوذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از عصاره اسیلاتوریا



تصویر ۲: میکروگراف الکترونی گذاره (TEM) از نانوذرات نقره



تصویر ۳: درصد زنده مانی رده ی سلولی T47D تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شده است (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).



تصویر ۴: نتایج آنالیز فلوسایتومتری تاثیر نانوذرات بر روی رده سلولی سرطان پستان. (الف) نمونه کنترل تیمار نشده (ب) نمونه تحت تیمار با نانوذرات بیوستزی. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت شده در منحنی دو بعدی به چهار ناحیه Q1 تا Q4 صورت گرفت. به نحوی که ناحیه Q1 نمایانگر سلول‌های نکروزی با ویژگی Annexin-V-PI+ و ناحیه Q2 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده دیررس یا نکروزی با ویژگی Annexin-V+PI+ و ناحیه Q3 نمایانگر سلول‌های سالم با ویژگی Annexin-V-PI- و ناحیه Q4 نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده جوان با ویژگی Annexin-V+PI- می‌باشد. فلئوروکروم‌های مورد استفاده، فلئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) کنژوگه با Annexin-V بود که در کانال FL1 و فیکواریترین (PE) کنژوگه با PI بود که در کانال FL3 مورد ارزیابی قرار گرفت.

بحث

در پژوهش حاضر، بیوسنتز نانوذرات نقره با پوشش عصاره سیانوباکتری اسپلاتوریا انجام گرفت. عصاره سیانوباکتری به عنوان عامل پایدار کننده و پوشش دهنده نانوذرات نقره به خوبی نشان داده شد. نتایج آزمون MTT بر روی سلول های رده سرطانی پستان (T47D) در طی ۲۴ ساعت نشان داد که نانوذرات نقره سنتزی توانایی کشندگی وابسته به زمان و غلظت را دارند. همچنین در بخش دیگر این مطالعه، ارزیابی نوع مرگ سلولی نانوذرات بیوسنتزی به وسیله دستگاه فلوسایتومتری انجام گرفت. امروزه نانوذرات نقره به عنوان عامل ضد سرطان و ضد میکروبی در کانون توجهات محقق ها در سراسر دنیا قرار گرفته است. از آنجایی که مشکلات عمده ای در روش های سنتز فیزیکی و شیمیایی نانوذرات فلزی وجود دارد، نیاز به روش هایی ایمن، مقرون به صرفه و بدون به کارگیری ترکیب های شیمیایی مضر ضروری به نظر می رسد. در این میان، رویکرد سنتز زیستی به عنوان روشی آسان، سازگار با محیط زیست و مقرون به صرفه جهت سنتز نانوذرات با استفاده از عصاره میکروارگانیسم ها مطرح شده است (۲۸). طی پژوهش ها و مقالات گذشته، احیاءکننده های بیولوژیکی متعددی جهت سنتز نانوذرات فلزی گزارش شده است. در پژوهش Devi و همکاران منتشر شد، سنتز سبزی نانوذرات نقره از طریق عصاره ی جلبک *Ulva Lactuca* نشان داده شد. در تحقیق آنها، نانوذراتی با ابعاد ۲۰ تا ۵۶ نانومتر سنتز شد و اثرات ضد سرطانی آن بر روی

رده های سلولی سرطانی کبد HepG-2، پستان MCF-7، کولون HT29 و سلول نرمال Vero نشان داده شد (۲۹). بر آبدی و همکاران سنتز زیستی نانوذرات نقره به وسیله گونه استاندارد قارچ پنیسیلیوم کرایسوژنوم را مطرح نمودند. در مطالعه آنها نشان داده شد پروتئین ها و آنزیم های آزاد شده به وسیله این قارچ قابلیت احیای یون های فلزی نقره و تولید برون سلولی نانوذرات نقره را دارند (۳۰). همچنین اثرات امیدوارکننده ضد سرطانی بیوسنتز نانوذرات نقره با کمک عصاره جلبک های *Laurencia aldingensis* و *Laurencia sp* علیه سرطان سارکومای رحم (MES-SA) به وسیله ویرا و همکاران گزارش شد (۳۴). به طور کلی القاء مرگ برنامه ریزی شده سلولی یا آپوپتوز یکی از رویکردهای جذاب در درمان سرطان ها به شمار می رود. در بسیاری از گزارش های گذشته مشخص شد که نانوذرات نقره اثرات ضد رگزیایی، ضد تکثیر و القاء مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوز) سلول را دارا هستند. همچنین القاء آپوپتوز با افزایش بیان ژن های آنزیم های کاسپاز و آزادسازی رادیکال های آزاد اکسیژن در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسیده است (۳۵). در این تحقیق از معرف انکسین ۵ برای ارزیابی درصد سلول های آپوپتوز شده و از معرف پروبیوم یداید به منظور ارزیابی تعداد سلول های نکروز شده استفاده شد. در تحقیق کنونی نتایج فلوسایتومتری تأثیر نانوذرات بیوسنتز شده نشان داد که توانایی القاء مرگ سلولی آپوپتوز نسبت به نکروز در رده سلولی سرطان پستان T47D را دارد که در گزارش های قبلی این میزان

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت که عصاره سیانوباکتر اسیلاتوریا توانایی مؤثری جهت احیای نمک نقره را دارا می‌باشد. نانوذرات نقره بیوسنتز شده با کمک سیانوباکتر اسیلاتوریا با اندازه‌ای در محدوده ۵ تا ۳۰ نانومتر و غالباً کروی و دارای فعالیت‌های ضد سرطانی و ضدباکتریایی قابل قبولی بوده‌اند و می‌تواند در جهت درمان سرطان پستان و عفونت‌های ناشی از باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه بیشتری قرار گیرند.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر استنتاج شده از داده‌های پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت می‌باشد.

مقایسه انجام نگرفته بود. بنابراین توانایی القاء آپوپتوز به وسیله نانوذرات نقره بیوسنتز شده در این تحقیق رویکردی مؤثر در جهت درمان سرطان‌ها به شمار می‌رود. در مطالعه‌های مختلف فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی علیه باکتری‌های گرم منفی و مثبت مشخص شده است. در مطالعه شریواستوا و همکاران فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره نشان داده شد که وابسته به غلظت بوده و اثر مؤثرتری بر روی باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت داشتند (۳۱). این در حالی است که نانوذرات نقره تولید شده به روش زیستی در مطالعه حاضر با غلظت کمتری باکتری‌های گرم مثبت را مهار نمود. همچنین در مطالعه حاضر بهترین عملکرد نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره اسیلاتوریا مربوط به باکتری استافیلوکوک اورئوس بود. باکتری‌های گرم منفی به دلیل داشتن دیواره نازک‌تر نسبت به گرم مثبت‌ها، و منفی بودن بار لایه لیپوپلی‌ساکاریدی این باکتری‌ها، باعث بر همکنش بین نانوذرات دارای بار مثبت ضعیف با باکتری گرم منفی می‌شوند و این در نهایت باعث ایجاد منافذ و ورود نانوذرات به درون سلول و مرگ سلول می‌شود (۳۲). بنابراین اختلاف بار بین باکتری‌ها در برابر نانوذرات نقره به ساختار دیواره سلولی بر می‌گردد. در مطالعه حاضر، نانوذرات نقره نسبت به باکتری گرم مثبت استافیلوکوک اورئوس مؤثر بود. عدم همخوانی با مطالعه‌های قبلی این مطالعه را احتمالاً بتوان به بار، اندازه، نوع عصاره احیاء کننده و شکل نانوذرات نقره بیوسنتز شده نسبت داد.

REFERENCES

1. Ghanbar F, Mirzaie A, Ashrafi F, Noorbazargan H, Dalirsaber Jalali M, Salehi S, et al. Antioxidant, antibacterial and anti-cancer properties of phyto-synthesized *Artemisia quttensis* Podlech extract mediated silver nanoparticles. IET Nanobiotechnol 2017; 11: 485-92.
2. Saxena A, Tripathi RM, Zafar F, Singh P. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous solution of *Ficus benghalensis* leaf extract and characterization of their antibacterial activity. Mater Lett 2012; 67: 91-4.
3. Baharara J, Namvar F, Ramezani T, Mousavi M, Mohamad R. Silver nanoparticles biosynthesized using *achillea biebersteinii* flower extract: apoptosis induction in mcf-7 cells via caspase activation and regulation of *bax* and *bcl-2* gene expression. Molecules 2015; 20: 2693-706.
4. Honary S, Barabadi H, Gharaei-Fathabad E, Naghibi F. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium citrinum* and *Penicillium waksmanii*. Dig J Nanomater Bios 2012; 7: 999-1005.
5. Bollella P, Schulz C, Favero G, Mazzei F, Ludwig R, Gorton L, et al. Green synthesis and characterization of gold and silver nanoparticles and their application for development of a third generation lactose biosensor. Electroanalysis 2017; 29(1): 77-86.
6. Malhotra S P K, TK Mandal, Biomedical applications of Zinc Oxide nanomaterials in cancer treatment: a review, SCIREA J Chem 2016;1(2): 67-89.
7. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnol Adv 2009; 27(1): 76-83.
8. Gurunathan S, Jegadeesh R, Sri NAM, Priscilla AJ, Sabaratnam V. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: a potential cytotoxic agent against breast cancer cells. Int J Nanomed 2013; 8: 4399-413.
9. Netala VR, Satyanarayana M, Pushpalatha B, Baki VB, Aishwarya S, Rao JV, et al. Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus *Pestalotiopsis microspore* and evaluation of their antioxidant and anticancer activities. Int J Nanomed 2016; 11: 5683-96.
10. Panyala NR, Pena-Mendez EM, Havel J. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health. J Appl Biomed 2008; 6:117-29.
11. Verma DK, Hasan SH, Banik RM. Photo-catalyzed and phyto-mediated rapid green synthesis of silver nanoparticles using herbal extract of *Salvinia molesta* and its antimicrobial efficacy. J Photochem & Photobiol B Biol 2016; 155: 51-9.
12. Marambio-Jones C, Hoek EM. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. J Nanopart Res 2010; 12(5): 1531-51.
13. Kundu JR, Bellare BA. Rapid efficient synthesis and characterization of silver, gold, and bimetallic nanoparticles from the medicinal plant *Plumbago zeylanica* and their application in biofilm control. Int J Nanomed 2014; 9: 2635-53.
14. Jha AK, Prasad K. Green synthesis of silver nanoparticles using *Cycas* leaf. Int J Green Nanotechnol: Physics and Chemistry 2010; 1(2): P110-P7.
15. Ahmad N, Sharma S, Alam MK, Singh V, Shamsi S, Mehta B, et al. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. Colloids Surf B 2010; 81(1): 81-6.
16. Saxena A, Tripathi RM, Zafar F, Singh P. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous solution of *Ficus benghalensis* leaf extract and characterization of their antibacterial activity. Mater Lett 2012; 67: 91-4.
17. Sulaiman GM, Mohammed WH, Marzoog TR, Al-Amiery AAA, Kadhum AAH, Mohamad AB. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. Asian Pac J Trop Biomed 2013; 3(1): 58-63.
18. Krishnaraj C, Jagan E, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan P, Mohan N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. Colloids Surf B 2010; 76(1): 50-6.
19. Dhayalan M, Denison MIJ, Krishnan K. In vitro antioxidant, antimicrobial, cytotoxic potential of gold and silver nanoparticles prepared using *Embelia ribes*. Nat Prod Res 2017; 31(4): 465-8.
20. Ghanbar F, Mirzaie A, Ashrafi F, Noorbazargan H, Dalirsaber Jalali M, Salehi S, et al. Antioxidant, antibacterial and anti-cancer properties of phyto-synthesized *Artemisia quttensis* Podlech extract mediated silver nanoparticles. IET. Nanobiotechnol 2017; 11(4): 485-92.

21. Rashidipour M, Heydari R. Biosynthesis of silver nanoparticles using extract of olive leaf: synthesis and in vitro cytotoxic effect on MCF-7 cells. *J Nanostruct Chem* 2014; 4(3): 1-6.
22. Begum NA, Mondal S, Basu S, Laskar RA, Mandal D. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. *Colloids Surf, B* 2009; 71(1): 113-8.
23. Victory KJ. Isolation and characterization of antimicrobial compounds synthesized by *Microcystis* SP. Phd Thesis, School of Chemical Engineering, Faculty of Engineering. Computer and Mathematica Sciences 2008; 36: 3881-90.
24. Oftedal L, Skjærven KH, Coyne RT, Edvardsen B, Rohrlack T, Skulberg OM, et al. The apoptosis-inducing activity towards leukemia and lymphoma cells in a cyanobacterial culture collection is not associated with mouse bioassay toxicity. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011; 38: 489-501.
25. Nair S, Bhimba BV. Bioactive potency of cyanobacteria *oscillatoria* SPP. *International J Pharm Pharma Sci* 2013; 5(2): 611-2.
26. Li S, Shen Y, Xie A, Yu X, Qiu L, Zhang L, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annum* L. extract. *Green Chem* 2007; 9(8): 852-8.
27. Shahnazi M, Azadmehr A, Hajiaghvae R, Mosalla S, Latifi R. Effects of *artemisia absinthium* L. Extract on the maturation and function of dendritic Cells. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2015; 10(2): 10.17795/jjnpp-20163.
28. Mohasseli T. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using aqueous extract of *Sesamum indicum* seeds. *Modares Semiannual Biol Sci* 2015; 6(1): 10-20.
29. Saraniya Devi J, Valentin Bhimba B. Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized by the seaweed *ulva lactuca* in vitro. *Scientific Reports* 2012; 1(4): <http://dx.doi.org/10.4172/scientificreports.242>
30. Barabadi H, Honary S. Biological synthesis of silver nanoparticles using standard fungus of *Penicillium chrysogenum*. *Razi J Med Sci* 2014; 21(122): 20-8.
31. Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnol* 2007; 18(22): 225103-9.
32. Mittal AK, Bhaumik J, Kumar S, Banerjee UC. Biosynthesis of silver nanoparticles: elucidation of prospective mechanism and therapeutic potential. *J Colloid Interface Sci* 2014; 415: 39-47.
33. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J-H, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2007; 3(1): 95-101.
34. Vieira AP, Stein EM, Andregueti DX, Colepicolo P, Ferreira AMC. Preparation of silver nanoparticles using aqueous extracts of the red algae *Laurencia oldingensis* and *Laurenciella* sp and their cytotoxic activities. *J Appl Phycol* 2016; 28(4): 2615-2622.
35. Vaidyanathan R, Kalishwaralal K, Gopalram S, Gurunathan S. Nanosilver-the burgeoning therapeutic molecule and its green synthesis. *Biotechnol Adv* 2009; 27(6): 924-37.

Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Oscillatoria* Extract and Evaluation the Anticancer and Antibacterial Activities

Ghasemipour T¹, Salehzadeh A^{1*}, S adat Shandiz SA²

¹Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran, ²Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 27 Apr 2017 Accepted: 28 Sep 2017

Abstract

Background and aim: The emergence of nanotechnology is one of the most promising areas for medical research. Today, biological methods of synthesizing nanoparticles have been considered in the fight against many diseases. The purpose of this study was to evaluate the anti-cancer and anti-bacterial activity of silver nanoparticles, biosynthesized with cyanobacteria acetate extract.

Methods: In the present experimental study, the silver nanoparticles biosynthesis was performed using silver ions regeneration with cyanobacteria acetate extracts. Techniques such as X-ray diffraction, scanning electron microscopy and transient evaluation of silver nanoparticles were evaluated. In order to investigate the antibacterial activity of synthesized nanosilver, serial dilution method was used for broth microdilution test to determine minimum inhibitory concentration (MIC). The effects of silver nanoparticle toxicity on T47D breast cancer cell line were evaluated using MTT colorimetric method. Also, the proximal aniline 0.5 propidium iodide kit and flow cytometry system were evaluated to evaluate the percentage of apoptosis and necrosis in cancer cells treated with silver nanoparticles.

Results: Characterization of biosynthetic silver nanoparticles indicated that these nanoparticles had a mean size of 30 nm with dominant spherical morphology. The evaluation of the antibacterial properties of biosynthetic nanoparticles showed that the minimum inhibitory concentration for *Escherichia coli*, *Acinetobacter* Bumanni and *Staphylococcus aureus* was 25, 50 and 12.5 µg / ml, respectively. The results of cell proliferation of nanoparticles showed that its effect depends on the concentration and time of treatment of silver nanoparticles on cancerous cells. In addition, flow cytometric results showed an apoptotic cell death rate of 35% in the T47D cell line.

Conclusion: Biosynthesis nanoparticles have anticancer and antibacterial activity and can be studied further in the treatment of breast cancer and infections caused by pathogenic bacteria.

Key words: Anticancer, Apoptosis, *Oscillatoria*, Antibacterial

Corresponding author: Salehzadeh A, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Email: salehzadeh@iaurasht.ac.ir

Please cite this article as follows:

Ghasemipour T, Salehzadeh A, Sadat Shandiz SA. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Oscillatoria* Extract and Evaluation the Anticancer and Antibacterial Activities. *Armaghane-danesh* 2017; 22 (4): 459-471.