

سنتر نانوذرات نقره با استفاده از عصاره اتانولی گیاه *Artemisia turcomanica* و بررسی اثرات ضد تکثیری آن بر روی رده سلولی سرطان معده

بیبا موسوی^۱، فرزانه تفویضی^{۲*}، سعید ذاکر بستان‌آباد^۳

- ۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تکوین، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران
 ۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران
 ۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران
 * آدرس مکاتبه: پرند، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند
 تلفن: ۰۹۱۲۵۷۰۹۵۳۲
 پست الکترونیک: farzanehtafvizi54@gmail.com

تاریخ تصویب: ۹۵/۱۱/۴

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۸

چکیده

مقدمه: استفاده از گیاهان جهت سنتر نانوذرات به دلیل عدم استفاده از مواد آلاینده و سمی یکی از روش‌های دوست‌دار محیط زیست به شمار می‌رود.

هدف: از انجام این مطالعه، سنتر سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia turcomanica* و ارزیابی سمیت نانوذرات نقره سنتر شده بر روی رده سلولی سرطان معده (AGS) می‌باشد.

روش بررسی: جهت سنتر نانوذرات نقره زیستی، از عصاره برگ گیاه *Artemisia turcomanica* استفاده شد. ریخت‌شناسی نانوذرات نقره زیستی با استفاده از آنالیز میکروسکوپ الکترونی گذاره و میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد ارزیابی قرار گرفت. اثرات سمیت سلولی نانوذرات زیستی در دو رده سلولی سرطان معده (AGS) و سلول نرمال فیروبلاست (L-929) در غلظت‌های ۳، ۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با روش رنگ‌سنجی MTT طی ۲۴ ساعت بررسی شد. آزمون فلوسایتومتری جهت بررسی آپوپتوز انجام شد.

نتایج: مقدار IC50 نانوذره نقره در زمان ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی AGS، ۴/۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد که در مقایسه با گروه کنترل (سلول AGS که تیمار نانو ذره دریافت نکردند) معنی‌دار بود. همچنین IC50 مربوط به نانو ذره نقره در زمان ۲۴ ساعت برای سلول‌های نرمال و غیرسرطانی مقدار ۱۴/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. القا آپوپتوز بیشتری در برابر نکروز در سلول‌های AGS نسبت به کنترل دیده شد که از نظر آماری معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه برای اولین بار از عصاره گیاه *Artemisia turcomanica* جهت سنتر زیستی نانو ذره نقره استفاده شد و نتایج نشان داد که نانوذرات نقره سنتر شده دارای اثر سمیت سلولی و القا آپوپتوز بر روی سلول‌های سرطانی معده می‌باشند.

کل‌واژگان: *Artemisia turcomanica*، سمیت سلولی، نانوذرات نقره زیستی



مقدمه

است که می‌تواند ناشی از مقاومت ذاتی تومور نسبت به دارو باشد یا در طول شیمی درمانی کسب شود و در نتیجه با افزایش سلول‌های مقاوم روند درمان مشکل‌تر می‌شود [۸].

درمان‌های رایج سرطان، اغلب باعث از بین رفتن سلول‌های سالم می‌شود که می‌تواند باعث اثرات سمی و عوارض جانبی در بیمار شود. به همین دلیل نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای درمان این بیماری احساس می‌شود [۹، ۱۰].

به منظور کاهش اثرات سمی دارو بر روی سلول‌های طبیعی و جهت تحویل اختصاصی دارو به بافت سرطانی از روش‌های جدید تحویل دارو به بافت با کمک نانوذرزات به عنوان حامل می‌توان کمک گرفت. استفاده از نانوذرزات با حدود اندازه ۱۰۰ نانومتر یا کمتر برای رساندن و هدف‌گیری عوامل تشخیصی و دارویی در پروژیه‌های پزشکی مربوط به سرطان بسیار گسترده شده است. به تازگی بسیاری از نانوذرزات در انتقال دارویی به صورت هدفمند به سلول‌های توموری بدخیم با کاهش سمیت سیستمیک داروهای ضدسرطانی به خدمت گرفته شده‌اند [۱۱، ۱۲].

در کاربردهای زیست پزشکی مانند دارورسانی و تصویربرداری، اندازه نقش مهمی در کارایی و موفقیت درمان دارد. در کاربردهای زیستی، اندازه ماکرو در مقایسه با اندازه نانو به خاطر اندازه اجزای سلولی و زیر سلولی محدودیت‌هایی دارد. برای مثال، روش‌های مرسوم دارورسانی در ابعاد میکرون که برای درمان سرطان استفاده می‌شوند از ناکارآمدی انتقال، هدف‌گیری نامناسب، اثرات سمی روی بافت‌های سالم و اختلالات منتقل شده به نقاط تومور، رنج می‌برند. در آغاز کاربردهای دارورسانی، روش‌های مختلفی برای تجویز دارو وجود داشت که از آن جمله می‌توان به روش‌های خوراکی، استنشاقی، تراپوستی، درون رگی و غیره اشاره کرد. انتقال به روش خوراکی و استنشاقی موجب افزایش دارو در خون می‌شود و در عین حال پروفیل رهایش دارو بسیار ضعیف است. انتقال پوستی هم فاقد هدف‌گیری است و به سلول‌های سالم هم آسیب می‌زند [۱۳]. این چالش‌ها منجر به توسعه (داروسازی هدفمند) به عنوان راه حل غلبه بر مشکلات انتقال شدند. به هر حال، وسیله‌های انتقال که در اندازه میکرون

سرطان در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه به ترتیب اولین و دومین عامل مرگ و میر می‌باشد. سرطان معده در جهان به عنوان چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ بر اثر سرطان شناخته می‌شود [۱]. سرطان، جزء بیماری‌های چند عاملی (Multifactorial) به حساب می‌آید که ناشی از ایجاد بافت سرطانی در معده می‌باشد و عوامل ژنتیکی، محیطی و عفونی در بروز آن دخالت دارند [۲، ۳]. یکی از مهم‌ترین عوامل شناخته شده برای ایجاد سرطان، غیرفعال شدن ژن‌های سرکوب‌کننده تومور (Tumor suppressor genes) و فعال شدن انکوژن‌ها (Oncogenes) بر اثر تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی می‌باشد [۴]. همچنین از عوامل غیرژنتیکی مرتبط با سرطان معده می‌توان به نوع تغذیه، مصرف الکل، استعمال دخانیات و عفونت هلیکوباکتر پیلوری اشاره کرد. طبق گزارش‌های منتشر شده توسط انجمن سرطان آمریکا، غذاهای دودی، ماهی شور، گوشت و سبزیجات ترش، ریسک بروز سرطان معده را بالا می‌برند. در مقابل، میوه‌ها و سبزیجات تازه که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند احتمال ابتلا به سرطان را کاهش می‌دهند [۵]. از عوامل دیگر ایجاد سرطان معده عفونت هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد. به طور کلی عفونت اولیه هلیکوباکتر پیلوری باعث ایجاد یک گاستریت خفیف می‌شود. در بعضی افراد این التهاب به زخم معده منجر خواهد شد. در صورت ادامه روند بیماری‌زایی و عدم درمان زخم معده، التهاب آتروفیک معده ایجاد خواهد شد. افرادی که دچار این نوع التهاب هستند در خطر ایجاد بدخیمی و سرطان قرار دارند [۶].

از جمله روش‌های درمانی سرطان معده می‌توان به جراحی، شیمی درمانی و اشعه درمانی اشاره کرد. متأسفانه سرطان معده چندان به شیمی درمانی حساس نیست و در بعضی موارد بعد از عمل جراحی به منظور کوچک نمودن تومور و کاهش علائم انجام می‌شود. در روش اشعه درمانی، با استفاده از انرژی بالای رادیواکتیو، رشد سلول‌های سرطانی تا حدی متوقف می‌شود. در بیشتر موارد، اشعه درمانی با شیمی درمانی و جراحی ترکیب می‌شود [۷].

همچنین استفاده از داروهای ضدسرطان دارای محدودیت‌هایی می‌باشند که یکی از آنها مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به دارو



مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری و سنتز سبز نانوذره

به منظور سنتز نانوذرات نقره زیستی با خلوص بالا از روش رسوب‌گذاری با احیای یون‌های نقره ($AgNO_3$) (مرک آلمان) توسط عصاره برگ گیاه *Artemisia turcomanica* استفاده شد. برای ساخت عصاره گیاهی، ۲۰ گرم از پودر گیاه به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول رسانیده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط و در دستگاه شیکر قرار گرفت. عصاره حاصل توسط کاغذ صافی فیلتر شد. نانوذرات نقره با افزودن ۳ میلی‌لیتر از حجم عصاره با غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌مولار $AgNO_3$ سنتز شدند.

عصاره گیاهی به دلیل ترکیباتی که دارد منجر به احیای نمک نیترات نقره به نانوذرات نقره می‌شوند. پس از گذشت یک ساعت از زمان واکنش و تغییر رنگ محلول، سه مرتبه شستشوی رسوب با آب مقطر انجام گرفت. جهت شستشو در ۹۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت شستشوی انتهایی با اتانول انجام شد و محصول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۴ ساعت قرار داده شد.

تأیید ساختار نانوذرات

پس از سنتز نانوذرات به روش زیستی، تأیید ساختار و ریخت شناسی نانوذرات تولید شده به وسیله تکنیک‌های مختلفی از جمله Scanning Electron Microscopy (SEM), transmission electron Microscopy (TEM) انجام گرفت. عکسبرداری SEM توسط دستگاه Sigma Zeiss (آلمان) و عکسبرداری TEM از نانوذرات نقره توسط دستگاه Zeiss EM10C-100 KV (آلمان) توسط شرکت دی‌پترونیک انجام شد.

کشت سلول

در این مطالعه رده سلول‌های سرطانی معده (AGS) و رده سلولی نرمال فیروبلاست L-929 از بانک سلولی مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی تهیه شد. این سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS)، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک

هستند نمی‌توانند به روش غیرفعال از سلول‌ها و منافذ سلول عبور کنند و این مسأله شامل سلول‌های توموری که اندازه منفذ آنها ۳۸۰ تا ۷۸۰ نانومتر است نیز می‌شود. در نتیجه سیستم انتقال نانوهدفمند سیستم ایده‌آلی برای کاربردهای بیولوژیکی محسوب می‌شود [۱۶، ۱۵، ۱۴].

روش‌های متداول تولید نانوذرات شامل روش‌های فیزیکی، شیمیایی و روش زیستی می‌باشند [۱۷]. مزایای روش زیستی مانند هزینه کمتر، سرعت بیشتر، مقیاس بالای تولید و عدم آسیب به محیط زیست باعث شده که توجه بیشتری به تولید نانوذرات با این روش نسبت به دو روش دیگر شود [۱۸]. امروزه داروهای گیاهی به علت عدم عوارض جانبی نسبت به داروهای شیمیایی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۹].

سالانه بر روی کره زمین در حدود چهارصد میلیارد تن، کربوهیدرات از گیاهان تولید می‌شود که بسیاری از این کربوهیدرات‌ها، پلی‌ساکارید هستند [۲۰]. پلی‌ساکاریدها دارای عوامل بسیاری از جمله گروه‌های هیدروکسیل و دسته ترکیبات آلی بوده که قادر به احیای محلول‌هایی حاوی نمک فلزات می‌باشند [۲۱].

عصاره برگ گیاهان که غنی از پلی‌فنیل‌هایی مانند فلاونوئیدها هستند، عوامل قدرتمندی برای احیاء کننده در سنتز نانوذرات طلا و نقره خواهند بود. بنابراین در بسیاری از مقالات به استفاده از عصاره‌های گیاهی برای سنتز نانوذرات اشاره شده است [۲۲].

گونه‌های *Artemisia* به دلیل دارا بودن خاصیت ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدعفونی‌کنندگی، کاربرد وسیع در درمان بیماری‌هایی نظیر مالاریا، هپاتیت، سرطان، تومور، دردهای عصبی، تب، تورم و التیام زخم در صنایع دارویی دارند [۲۳].

استفاده از گیاهان جهت سنتز نانوذرات به دلیل عدم استفاده از مواد آلاینده و سمی یکی از روش‌های دوست‌دار محیط زیست به شمار می‌رود. گیاهان از جمله سامانه‌های زنده اقتصادی و مؤثر جهت تولید نانوذرات نقره می‌باشند. در این تحقیق برای اولین بار از عصاره گیاه *Artemisia turcomanica* جهت سنتز نانوذره زیستی و بررسی اثرات سابتوکسیک و القا آپوپتوز در رده سلولی AGS استفاده شد.



انکوبه شد. پس از گذشت ۴ ساعت، محیط رویی پلیت خارج شد و به چاهک‌ها ایزوپروپانول اضافه شد تا کریستال‌های بنفش رنگ فورمازون ایجاد شده در سلول‌هایی که زنده مانده‌اند، حل شده و مایع رنگی یکنواختی ایجاد شود. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه ELISA READER در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. نتایج حاصله به صورت میزان درصد زیستایی و IC50 (غلظتی که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می‌شود) گزارش شدند. جهت گرفتن نتیجه‌ی بهتر، آزمایش‌های این تحقیق سه بار تکرار انجام گرفت و میزان بقای سلولی طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$100 \times (\text{جذب نوری کنترل/جذب نوری تست}) = \text{میزان بقای سلولی}$$

آزمون بررسی آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی سلول با کیت

Annexin V-FITC توسط دستگاه فلوسایتومتری

به منظور بررسی القا آپوپتوز در سلول‌های AGS تیمار شده با نانو نقره زیستی و مقایسه آن با گروه کنترل، رنگ آمیزی سلول‌ها با دو رنگ Annexin-FITC و پروپیدیوم یدید (PI)، طبق دستورالعمل کیت Annexin V-FITC (Affymetrix, USA) انجام گرفت. در طی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا آپوپتوز، فسفا تبدیل سرین از سطح داخلی به سطح خارجی غشا سلول منتقل می‌شود. Annexin به فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارج سلولی متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری شناسایی می‌شود. همچنین PI نیز به DNA قطعه قطعه شده هسته سلول‌های مرده متصل شده و قابل تشخیص توسط دستگاه فلوسایتومتری می‌باشد.

تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از تقسیم‌بندی انجام شده توسط نرم افزار دستگاه به چهار ناحیه Q₁ تا Q₄ انجام شد. بر طبق گروه‌بندی، Q₁ نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده جوان با شاخص رنگ‌آمیزی Annexin-FITC⁺ و PI⁻، Q₂ نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده پیر با ویژگی Annexin-FITC⁺ و PI⁺، Q₃ نمایانگر سلول‌های سالم با شاخص رنگ‌آمیزی Annexin-FITC⁻ و PI⁻ و Q₄ سلول‌های نکروز شده با شاخص رنگ‌آمیزی Annexin-FITC⁻ و PI⁺ می‌باشند. برای

پنی‌سیلین- استریتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک اتمسفر مرطوب با غلظت CO₂ ۵ درصد کشت داده شدند. جهت بررسی وضعیت مورفولوژی، سلامت و تعداد سلول‌ها در زیر میکروسکوپ اینورت بررسی شدند. زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد سلولی رسیدند، توسط تریپسین ۰/۰۵ درصد از ته فلاسک جدا شدند و در دور rpm ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب سلولی حاصل به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در آن با استفاده از لام نئوبار و رنگ ترپان بلو توسط میکروسکوپ نوری تعیین شد. پس از اطمینان از عدم آلودگی، از سلول‌های با درصد زیستایی بالای ۹۰ درصد جهت انجام آزمایش استفاده شد.

بررسی میزان سمیت سلولی

به منظور بررسی اثر نانوذررات نقره زیستی بر روی رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و نرمال از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. آزمایش MTT، یکی از روش‌های رنگ‌سنجی متداول برای بررسی میزان سمیت مواد برحیات سلول است. این مسأله با سنجش قدرت احیاء رنگ تترازولیوم (MTT) توسط آنزیم‌های سلولی و تبدیل آن به بلورهای فورمازان با رنگ بنفش مورد بررسی قرار می‌گیرد. در نتیجه‌ی فرآیند احیاء، بلورهای بنفش رنگ فورمازون تشکیل می‌شود. سپس این بلورها در حلال مناسب حل شده و بوسیله روش‌های اسپکتروفوتومتری مقدار سنجی می‌شود. مقدار بلور فورمازون ایجاد شده می‌تواند نشان‌دهنده درصد سلول‌های زنده باشد.

برای انجام آزمایش، حجم ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۱۰۰۰۰ سلول AGS و L-929 در هر خانه پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد. انکوباسیون با غلظت‌های مختلف ۳، ۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذررات زیستی طی زمان ۲۴ ساعت انجام شد. پس از طی زمان مذکور به هر خانه پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر رنگ MTT (۵،۴،۳) - دیتمیل تیازولیل (۲-، ۲-، ۵- دیفنیل تترازولیوم بروماید) (Sigma, Germany) با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و به مدت چهار ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه



تست با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفتند. معنی‌دار بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver.19 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) و آزمون Tukey's و One way ANOVA و بر اساس $P < 0.05$ محاسبه شد.

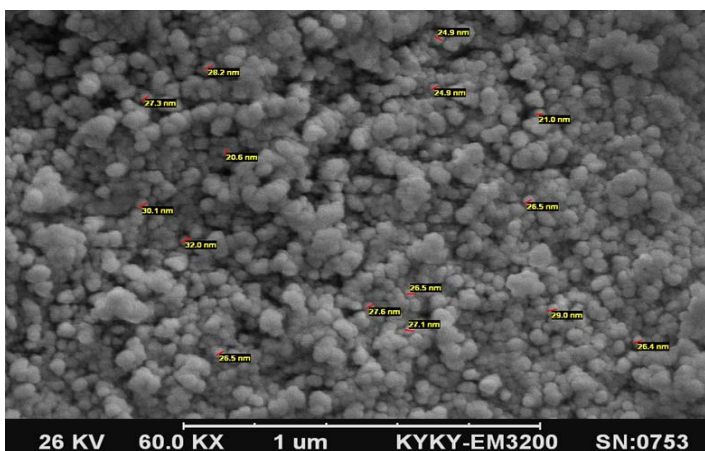
نتایج

شناسایی نانوذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و عبوری (TEM) با توجه به تصویر SEM، نانوذرات سنتز شده دارای اندازه در محدوده بین ۲۰ nm تا ۶۰ nm داشتند. عکس‌های TEM و SEM در شکل‌های شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است. قطر میانگین نانوذرات سنتز شده، ۲۲ نانومتر محاسبه شد. هیستوگرام مربوط به اندازه نانوذرات در شکل شماره ۳ نمایش داده شده است.

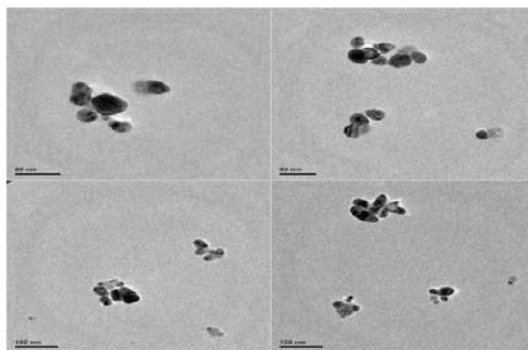
انجام تست، سلول‌ها برطبق روش گفته شده در آزمون سنجش زیستایی کشت شدند. پس از مشخص شدن غلظت IC50 تیمار مربوطه، سلول‌های AGS با غلظت ۴/۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو نقره زیستی به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌ها با بافر فسفات سالین شسته شدند. به رسوب حاصل از سانتریفوژ سلول‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر بافر بایندینگ در اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر از رنگ Annexin V اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس سلول‌ها با محلول بایندینگ شستشو داده شدند و سپس ۱۰ میکرولیتر رنگ PI به سلول‌ها اضافه شد. در نهایت آنالیز توسط دستگاه فلوسایتمتری انجام گرفت.

آنالیز آماری

بر اساس تست آماری two way ANOVA گروه‌های

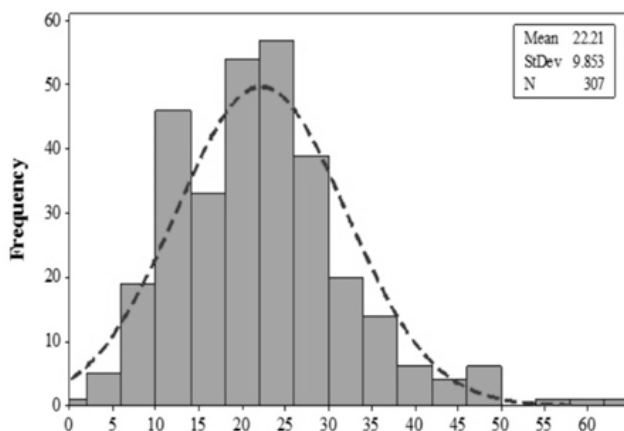


شکل شماره ۱- تصویر SEM از نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه *Artemisia turcomanica*



شکل شماره ۲- تصویر TEM نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه *Artemisia turcomanica*





شکل شماره ۳- هیستوگرام نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه *Artemisia turcomanica*

نانو ذره نقره در زمان ۲۴ ساعت برای سلول‌های نرمال مقدار ۱۴/۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد.

نتایج حاصل از بررسی القا آپوپتوز در سلول‌های AGS تیمار شده با نانو نقره زیستی سنتز شده

در شکل شماره ۶ نتایج حاصل از القا آپوپتوز با کیت Annexin V-FITC توسط فلوسایتومتری (تست‌ها با دو تکرار انجام شده‌اند و در شکل فقط یک تکرار نمایش داده شده است). نتایج فلوسایتومتری در شکل شماره ۶ (الف)، بیانگر زنده ماندن ۹۲/۲۵ درصدی سلول‌ها می‌باشد که انتظار ما نیز از سلول‌های کنترل همین می‌باشد که اکثریت آنها تحت آپوپتوز قرار نگیرند، زیرا با دارو تیمار نشدند. تعداد سلول‌هایی که دچار آپوپتوز اولیه و تأخیری شدند به ترتیب ۲/۲۹ و ۰/۰۸ درصد و اندکی از سلول‌ها که تحت تأثیر مراحل جمع‌آوری و آماده‌سازی، دچار نکروز شدند ۵/۳۸ درصد بود که این تعداد در مقابل سلول‌های سالم و زنده مقادیر ناچیزی محسوب می‌شود. نتایج القا آپوپتوز در سلول‌هایی که با دوز IC_{50} تیمار شدند در شکل شماره ۶ (ب) ارائه شده است. نتایج مربوط به محاسبه درصد سلول‌های آپوپتوزی، نکروزی توسط فلوسایتومتری حداقل با دو بار تکرار آزمایش به شکل درصد میانگین سلول‌ها \pm انحراف معیار در جدول شماره ۳ نمایش داده شده است.

تیمار سلول AGS با نانوذره نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت

تیمار سلول‌های AGS با غلظت‌های مختلف ۳، ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ $\mu g/ml$ با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴ ساعت انجام شد. نتایج نشان داد که نانوذره نقره در غلظت‌های ۱۰۰ $\mu g/ml$ بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشت که از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0/001$). در حالی که غلظت ۳ $\mu g/ml$ کمترین میزان کشندگی را نشان داد. نتایج سنجش توان زیستی سلول‌ها بر اساس روش رنگ سنجی در جدول شماره ۱ و شکل شماره ۴ ارائه شده است.

تیمار سلول L-929 با نانو ذره نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت

تیمار سلول‌های L-929 با غلظت‌های مختلف ۳، ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ $\mu g/ml$ با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴ ساعت انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که نانوذره نقره در غلظت‌های ۱۰۰ $\mu g/ml$ بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشت که از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0/001$). در حالی که غلظت ۳ $\mu g/ml$ نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداد و از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0/05$). درصد زیستایی ۹۲ درصد در غلظت ۳ $\mu g/ml$ مشاهده شد (جدول شماره ۲ و شکل شماره ۵).

مقدار IC_{50} نانوذره نقره در زمان ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی AGS، مقدار ۴/۸۸ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد که در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود. همچنین IC_{50} مربوط به

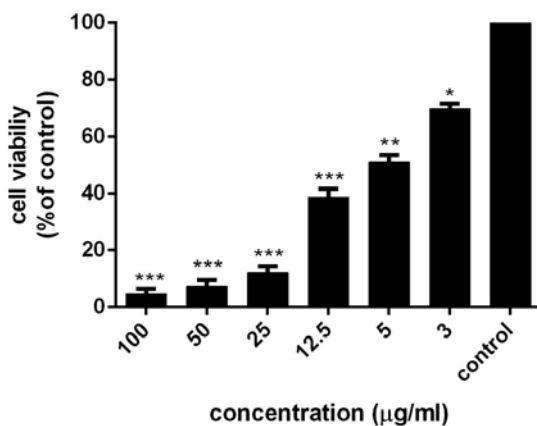


جدول شماره ۱- میانگین توان زیستی سلول رده AGS با نانوذره نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت با روش رنگ سنجی.

زمان	۳ µg/ml	۵ µg/ml	۱۲/۵ µg/ml	۲۵ µg/ml	۵۰ µg/ml	۱۰۰ µg/ml
۲۴ H	۰/۰۷±۶۹	۰/۱۸±۵۱/۵	۰/۲۱±۳۸/۷۵	۰/۱۳±۱۲/۲۵	۰/۱۵±۷/۳۷	۰/۱±۴/۷۷
p-value	۰/۰۳	۰/۰۰۸	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۰۶

مقادیر به دست آمده براساس میانگین ± انحراف از معیار و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شده است (ANOVA and t-test).

24-hr



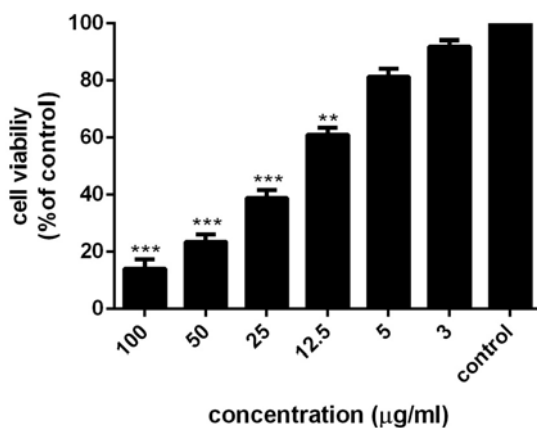
شکل شماره ۴- درصد بقای سلول‌های AGS در برابر غلظت‌های مختلف نانوذره نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت؛ نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است ($P < ۰/۰۵$: * , $P < ۰/۰۱$: ** , $P < ۰/۰۰۱$: ***). (n=۳)

جدول شماره ۲- میانگین توان زیستی سلول رده L-929 با نانوذره نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت با روش رنگ سنجی

زمان	۳ µg/ml	۵ µg/ml	۱۲/۵ µg/ml	۲۵ µg/ml	۵۰ µg/ml	۱۰۰ µg/ml
۲۴H	۹۲± ۰/۰۷	۸۱/۲۵ ± ۰/۱۸	۶۱/۷۵ ± ۰/۲۱	۳۸/۷۵±۰/۱۳	۲۳/۵±۰/۱۵	۱۶/۵۶±۰/۱
p-value	۰/۱۲	۰/۰۸	۰/۰۰۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۰۷

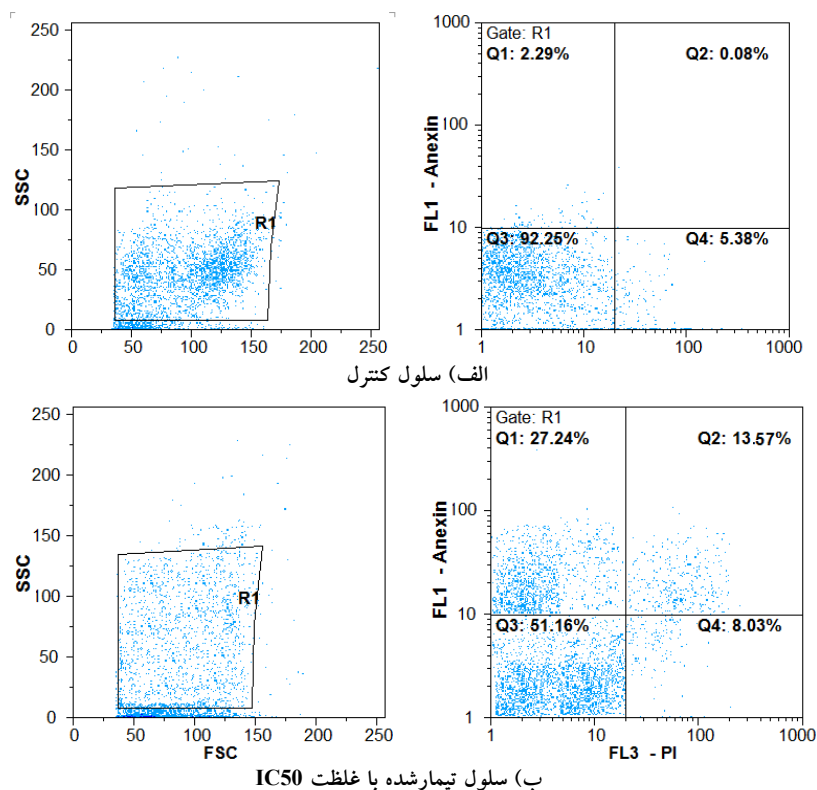
مقادیر به دست آمده براساس میانگین ± انحراف از معیار و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شده است (ANOVA and t-test).

24-hr



شکل شماره ۵- درصد بقای سلول‌های نرمال فیبروبلاست L-929 در برابر غلظت‌های مختلف نانوذره نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت؛ نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است ($P < ۰/۰۵$: * , $P < ۰/۰۱$: ** , $P < ۰/۰۰۱$: ***). (n=3)





شکل شماره ۶- الف) سلول کنترل، ب) سلول تیمار شده با غلظت IC50

جدول شماره ۳- آپویتوز القا شده توسط نانو ذره نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه *Artemisia turcomanica*

گروه کنترل	گروه تیمار شده با غلظت IC50 نانو نقره زیستی	P value نسبت به گروه کنترل
آپویتوز اولیه	۲۸/۵۵±۰/۲۷	۰/۰۰۰۷
آپویتوز تاخیری	۱۰/۳۹±۰/۱۹	۰/۰۰۰۸
نکروز	۹/۴۲±۰/۲۳	۰/۰۷

جدول شماره ۴- مقایسه درصد سلول‌های آپویتوز شده و نکروز شده در غلظت IC50

میزان مرگ سلولی در سلول‌های تیمار شده با غلظت IC50 نانو نقره زیستی	
سلول‌های آپویتوز شده	۳۸/۹۴
سلول‌های نکروز شده	۹/۴۲
P value	۰/۰۰۰۷۳

افزایش معنی دار داشت ($P < 0/001$). میزان آپویتوز تأخیری نیز با مقدار $10/39 \pm 0/19$ نسبت به گروه کنترل معنی دار بود ($P < 0/001$). میزان سلول‌های نکروز شده نسبت به کنترل افزایش داشت ولی این اختلاف، معنی دار نبود ($P > 0/05$).

مقایسه آپویتوز و نکروز القا شده بر اساس داده‌های فلوسایتومتری در سلول‌های تیمار شده با غلظت IC50 و سلول‌های تیمار نشده به عنوان گروه کنترل، نشان داد که میزان آپویتوز اولیه با مقدار $28/55 \pm 0/27$ نسبت به گروه کنترل



از سسکوئی ترین‌هایی است که در گونه‌های مختلف گیاه درمنه (*Artemisia*) وجود دارد و فعالیت ضدسرطانی آن در *in vitro* و *in vivo* ثابت شده است. اثر آرتمیزین موجود در این گیاه بر روی سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفته است و پاسخ آن در سلول‌های سرطانی شامل مهار رشد سلول و آپوپتوزیس می‌باشد. گیاه *Artemisia turcomanica* نیز بر همین اساس برای سنتز نانوذرات نقره و بررسی سمیت سلولی مورد استفاده قرار گرفته است [۲۹].

وی جایا کومار و همکارانش در سال ۲۰۱۲ با استفاده از گیاه *Artemisia nilagirica* اقدام به سنتز سبز نانوذرات نقره نمودند. در این تحقیق از نیترات نقره به عنوان پیش ساز فلزی و هیدرات هیدرازین به عنوان عامل کاهنده استفاده شد که تغییر رنگ از زرد ملایم به تیره نشان دهنده سنتز نانوذرات نقره بود که این تغییر رنگ با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی دارد. متوسط اندازه ذرات تولید شده بین ۹۰-۷۰ نانومتر تعیین شد [۳۰]. در مطالعه حاضر، نانوذرات دارای میانگین حدود ۲۲ نانومتر دارند که سایزی کوچکتر از تحقیق کومار و همکارانش می‌باشد.

آردی و همکارانش در سال ۲۰۱۴ با استفاده از گیاه *Artemisia pallens* و در دمای اتاق موفق به سنتز نانوذرات نقره شدند. این نانوذرات دارای ساختارهای کروی با اندازه متوسط ۲۸ نانومتر بودند. نانوذرات تولید شده خواص آنتی‌باکتریال مؤثری در برابر عوامل بیماری‌زا از خود نشان دادند [۳۱]. نانو ذره سنتز شده در تحقیق حاضر نزدیک به تحقیق آردی و همکاران هست ولی اندازه کوچکتری در تحقیق حاضر حاصل شده است.

شفقت و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از گیاه *Viburnum lantana* نانوذرات نقره را سنتز و اثر آنتی‌باکتریال و ضدقارچی آن را بررسی کردند. در این تحقیق با استفاده از عصاره متانولی گیاه، نانوذراتی در محدوده ۲۰-۸۰ نانومتر و با اندازه متوسط ۴۸ نانومتر سنتز شد. در این بررسی‌ها مشخص شده است که فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره با ساختار مکعب و مکعب مستطیل، نسبت به شکل کروی، دارای تأثیرات بیشتری روی میکروارگانیسم‌ها و سلول‌ها است [۳۲].

در آنالیز دیگری، مجموع درصد سلول‌های قرار گرفته در نواحی Q1 و Q2 به عنوان درصد کل وقوع آپوپتوز (سلول‌های آپوپتوز شده پیر و جوان) در نظر گرفته شد و با سلول‌های واقع در نواحی Q4 که معرف سلول‌های نکروز شده می‌باشند مورد مقایسه قرار گرفتند. درصد کل سلول‌های آپوپتوز شده و نکروز شده به ترتیب ۳۸/۹۴ و ۹/۴۲ درصد محاسبه شد، بطوری‌که افزایش میزان آپوپتوز بیشتری نسبت به نکروز مشاهده شد که از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < 0.001$) (جدول شماره ۴).

بحث

در دنیای امروز نانو فناوری به علت کاربرد وسیع در علوم و صنایع مختلف با سرعت بالایی در حال رشد می‌باشد. نانو فناوری علمی است که بر پایه نانوذرات استوار است [۲۴]. نانوذرات موادی با حدود اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشند. این مواد از ده‌ها و یا صدها اتم یا مولکول تشکیل شده‌اند که اندازه و اشکال مختلفی مانند کروی، بلوری، سوزنی و ... را شامل می‌شوند [۲۵].

برای تولید نانوذرات روش‌های متفاوتی مانند واکنش‌های شیمیایی، تجزیه حرارتی ترکیبات با کمک گرفتن از پرتوها، روش‌های الکتروشیمیایی، سونوشیمیایی، پردازش با امواج میکرو و غیره وجود دارد اما متأسفانه در اکثر روش‌هایی که منجر به تولید نانوذرات می‌شود، استفاده از مواد خطرناک یک اجبار است. از معایب دیگر این روش‌ها می‌توان به تولید کم نانوذرات، اتلاف انرژی زیاد و اشکال در تخلیص اشاره نمود [۲۶].

از اینرو نیاز به روشی با بازده بالا، کم هزینه، بدون تولید مواد سمی و بدون آسیب‌های زیست محیطی رو به افزایش می‌باشد. یکی از روش‌های تولید نانوذرات، تولید به روش زیستی است و توجه به این روش برای تولید نانوذرات رو به افزایش می‌باشد. منابع متعددی مانند گیاهان، جلبک‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، باکتری‌ها در تولید زیستی نانوذرات کاربرد دارند [۲۷]. به طور کلی مزیت تولید گیاهی نانوذرات بر سایر روش‌های زیستی، بی‌خطر بودن و همچنین قابلیت‌های بالا گیاهان دارویی است که بسیار قابل اعتماد و سالم‌تر از باکتری، قارچ و مخمر برای تولید نانوذرات است [۲۸]. آرتمیزین یکی



و *Pseudomonas aeruginosa* بررسی شد. مقدار IC_{50} بر روی رده سلولی AGS پس از ۲۴ ساعت مقدار $21/05$ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. وقتی غلظت نانوذرات به 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رسید، درصد سلول‌های زنده $6/51$ درصد تخمین زده شد در حالی که در مطالعه حاضر این سلول‌ها مقدار $4/77$ درصد محاسبه شد همچنین در مطالعه صالحی و همکاران، نتایج فلوسایتومتری نشان دهنده افزایش 7 و 30 درصدی در آپوپتوز اولیه و تأخیری در سلول‌های تیمار شده با غلظت IC_{50} نانوذرات در مقایسه با سلول‌های کنترل بود [۳۵]. در حالی که نانوذره سنتز شده در تحقیق حاضر قدرت القا آپوپتوز بیشتری را نشان داد.

سایز نانوذرات سنتز شده در مطالعات مختلف بسیار وابسته به نوع روش به کار رفته و جنس و گونه گیاه دارد. با مقایسه اندازه نانو نقره زیستی سنتز شده با میانگین حدود 22 نانومتر در تحقیق حاضر در مقایسه با مطالعات دیگر، به نظر می‌رسد که روش به کار رفته و نوع گیاه مورد استفاده در این تحقیق از کارایی بالایی جهت سنتز برخوردار است. به طوری که اندازه نانوذرات سنتز شده در این تحقیق نسبت به سایر تحقیقات کوچکتر بوده و خاصیت سمیت و کشندگی بیشتری نشان داد. نتایج این تحقیق نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده کاملاً وابسته به غلظت و زمان دارای آثار مهاری و ضدتکثیری سلول‌های سرطانی می‌باشند.

به طوری که، اثر کشندگی بر روی رده سلولی AGS وابسته به غلظت نانوذرات نقره است و بدین ترتیب مقدار IC_{50} طی 24 ساعت برای نانوذرات زیستی و برای رده سلولی سرطانی و نرمال به ترتیب $4/88$ و $14/56$ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد که در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0/001$).

بررسی القا آپوپتوز هم نشان داد که نانو نقره زیستی مذکور، با القا آپوپتوز سبب ایجاد کشندگی و مرگ سلولی در رده سلولی AGS شد. زیرا بر اساس نتایج حاصل از فلوسایتومتری، القا آپوپتوز بیشتر از بروز نکروز سلولی بود که این افزایش نیز از نظر آماری معنی‌دار بود.

نانوذرات با اثر بر روی زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری باعث اختلال و توقف تنفس سلولی می‌شوند که

ردی و همکارانش در سال 2013 ، نانوذرات نقره با استفاده از گیاه *Piper longum* را سنتز نمودند. در این تحقیق خواص ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی نانوذرات تولید شده مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات دارای اشکال کروی و با میانگین 46 نانومتر اعلام شد. نتایج نشان داد که نانوذرات سنتز شده پتانسیل بیشتری علیه باکتری‌های پاتوژنیک نسبت به عصاره گیاه داشتند. این ذرات همچنین دارای خاصیت سایتوتوکسیک علیه رده سلولی MCF-7 سرطان سینه بودند. مقدار IC_{50} محاسبه شده برای این نانوذرات بر اساس تست MTT معادل $67 \mu g/ml$ طی 24 ساعت محاسبه شد [۳۳]. در حالی که در مطالعه انجام شده میانگین اندازه ذرات 22 نانومتر و مقدار IC_{50} نانو ذره نقره در زمان 24 ساعت بر روی رده سلولی AGS مقدار $4/88$ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد که نشان‌دهنده سنتز مؤثرتر و اثر کشندگی قوی‌تر نانو ذره تحقیق حاضر می‌باشد.

رشمه زاد و همکاران در سال 1393 ، سمیت نانوذرات نقره تجاری و نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره برگ گیاه اکالیپتوس بر روی رده‌های سلولی سرطانی معده (AGS) و فیروبلاست ریه (MRC-5) را مورد بررسی قرار دادند. اندازه نانوذرات سنتز شده بین 30 تا 70 نانومتر بود و میانگین حدود $63/7$ نانومتر محاسبه شد. نتایج تحقیق فوق نشان داد که اثر کشندگی بر روی رده سلولی سرطانی AGS، وابسته به غلظت نانوذرات است و به طوری که مقدار IC_{50} نانوذرات زیستی بر روی رده سلولی AGS طی 24 ساعت $9/01$ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بر روی رده سلولی فیروبلاست MRC-5 نرمال، $35/44$ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد [۳۴].

صالحی و همکارانش در سال 94 با استفاده از گیاه *Artemisia marschalliana* نانوذرات نقره را سنتز کردند. در عکس‌برداری TEM، ذرات با اندازه تقریبی $5-50$ نانومتر تعیین شد که در مقایسه با اندازه ذرات تحقیق انجام شده (که دارای اندازه 20 تا 60 نانومتر هستند) دارای اندازه کوچکتری بودند. سپس اثر سمیت سلولی آن بر روی رده سلولی AGS و اثر آنتی‌باکتریالی آن علیه باکتری‌های پاتوژنیک *Bacillus cereus* و *Acinetobacter baumannii* و *Staphylococcus aureus*



گیاهی انجام گرفت. از مزایای روش می‌توان به کاهش زمان انجام واکنش (تغییر رنگ کامل محلول از روشن به تیره در همان لحظه انجام واکنش) و تولید ذراتی با اندازه‌ی کوچک اشاره نمود. نتیجه‌گیری کلی نشان داد که نانوذرات زیستی حاصل از این پژوهش دارای اثرات ضدتکثیر قوی بر روی رشد رده سلول‌های سرطانی و القا آپوپتوز می‌باشند. لذا می‌توان امید داشت با انجام تست‌های تکمیلی و مطالعات *In vivo* از آنها در زمینه‌های تشخیص و درمان بیماری‌ها و تحویل دارو در پزشکی استفاده نمود.

این امر باعث بیان ژن‌های محرک تولید کاسپاز ۳ از قبیل BAX و BCL-2 می‌شود و سیکل سلولی به سمت آپوپتوز پیش می‌رود. از آنجایی که تنفس سلولی در سلول‌های سرطانی یک امر حیاتی بوده و نسبت به سلول‌های نرمال با سرعت بسیار بالاتری انجام می‌شود هر گونه توقف یا اختلال در آن به سرعت سلول را به سمت آپوپتوز سوق می‌دهد [۳۶].

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره

منابع

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2011; 61 (2): 69-90.
- Zabaleta J. Multifactorial etiology of gastric cancer. *Methods Mol. Biol.* 2012; 863: 411-35.
- Huang JQ, Sridhar S, Chen Y and Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterol.* 1998; 114: 6: 1169-79.
- Fock KM. Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2014; 40 (3): 250-60.
- Kushi LH and Doyle C. American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA. Cancer J. Clin.* 2006; 56 (5): 254-81.
- Carl-mcgrath S, Ebert M and Rocken C. Gastric adenocarcinoma: epidemiology, pathology and pathogenesis. *Cancer Therapy* 2007; 5: 879 - 896.
- Alberts SR, Cervantes A and Van de Velde CJ. Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. *Ann. Oncol.* 2003; 14: 31-36.
- Katzung BG, Masters SB, Terevor AJ. Basic and clinical pharmacology. *New York: Norwalk.* 1997, 409.
- Fock KM. Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. *Aliment Pharmacol. Ther.* 2014; 40 (3): 250-60.
- Szymanski MS and Porter RA. Preparation and quality control of silver nanoparticle-antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays. *J. Immunol. Methods* 2013; 387 (1-2): 262-9.
- Narayanan KB and Sakthivel N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Adv. Colloid. Interface Sci.* 2011; 169 (2): 59-79.
- Iizumi M, Liu W, Pai SK, Furuta E and Watabe K. Drug development against metastasis-related genes and their pathways: a rationale for cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1786 (2): 87-104.
- Frieboes H, Sinek J. Handbook of biomems & bio nanotechnology prospectus, biological and biomedical nanotechnology: nanotechnology in cancer drug therapy: a biocomputational approach. In *onco imaging, medicine hematology/ oncology.* 2006; 1: 435-460.



14. Gerwins P, Skoldenberg E, Claesson Welsh L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis, *crit. Rev. Oncol/Hematol.* 2000; 34: 3.
15. Muro S, Wiewrdt R, Thomas A, Koniaris L, Albelda SM, Muzykantov VR and Koval MA. novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. *J. Cell Sci.* 2003; 116 (8): 1599 - 1609.
16. Brannon-Peppas L and Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2004; 56: 1649-1659.
17. Panacek A, Kvitek L, Pucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, Sharma VK, Nevecna T and Zboril R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem. B.* 2006; 110: 16248-53.
18. Parikh RY, Singh S, Prasad BL, Patole MS, Sastry M and Shouche YS. Extracellular synthesis of crystalline silver nanoparticles and molecular evidence of silver resistance from *Morganella* sp.: towards understanding biochemical synthesis mechanism. *ChemBioChem* 2008; 16, 9: 9: 1415-22.
19. Hoffman EJ. Cancer and the search for selective biochemical inhibitors. London: *Boca Raton, CRC Press.* 1999; 95-97.
20. Lindhorst TK. Structure of saccharides, essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry. *Wiley-VCH.* 2007; 3.
21. Mata YN, Torres E, Blazquez M.L, Ballester, A, Gonzalez F and Munoz JA. Gold (III) Biosorption and Bioreduction with the Brown Alga *Fucus Vesiculosus*. *J. Hazard Mater.* 2009; 166: 612-618.
22. Song JY and Kim BS. Rapid Biological Synthesis of Silver Nanoparticles using Plant Leaf Extracts, *Bioprocess Biosyst Eng.* 2009; 32: 79-84.
23. Carvalho IS, Cavaco T and Brodelius M. Phenolic composition and antioxidant capacity of six *Artemisia* species. *Industrial Crops and Products* 2011; 33 (2): 382-388.
24. Kaviya S, Santhanalakshmi J, Viswanathan B, Muthumary J and Srinivasan K. Biosynthesis of silver nanoparticles. using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2011; 79: 594-98.
25. Harrison RM, Shi JP, Shuhua X, Kahn A, Mark D, Kinnersley R, Yin J. Measurement of number, mass and size distribution of particles in the atmosphere. *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. a – Math. Phys. Eng. Sci.* 2000; 358: 2567 - 2580.
26. Veerasamy R, Xin TZ, Gunasagaran S, Xiang TFW, Yang EFC, Jeyakumar N and Dhanaraj SA. Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. *J. Saudi Chem. Soc.* 2011; 15: 113-120.
27. Thakkar KN, Mhatre SS and Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine* 2010; 6: 257-62.
28. Karimi Andeani J, Kazemi H, Mohsenzadeh S, Safavi A. Biosynthesis of gold nanoparticles using dried flowers extract of *Achillea Wilhemsii* plant. *Dig. J. Nanomater. Bios.* 2011; 6 (3): 1011-1016.
29. Gordanian B, Behbahani M, Carapetian Jirair and Fazilati M. Cytotoxic effect of *Artemisia absinthium* L. grown at two different altitudes on human breast cancer cell line MCF7. *Research Journal of Faculty of Medicine* 1391; 36 (3): 124-131.
30. Vijayakumar M, Priya K, Nancy FT, Noorlidah A and Ahmed ABA. Biosynthesis, characterisation and anti-bacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Artemisia nilagirica*. *Industrial Crops and Products* 2013; 41: 235-240.
31. Arde SM, Salokhe PR, Mane AH and Salunkhe RS. Facile Green Synthesis of Silver Nanoparticles by *Artemisia pallens* Leaves Extract and Evaluation of Antimicrobial Activity. *Chemical Sciene Review and Letters* 2014; 3 (11): 557-562.
32. Shafaghat A. Synthesis and characterization of silver nanoparticles by phytosynthesis method and



their biological activity, Synthesis and Reactivity in *Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry* 2015; 45 (3): 381-387.

33. Reddy NJ, Nagoor Vali D, Rani M and Rani SS. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by Piper longum fruit. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2014; 1 (34): 115-122.

34. Rashmezzad MA, Ali Asgary E, Tafvizi F, Shandiz SA and Mirzaie A. Comparative study on cytotoxicity effect of biological and commercial synthesized nanosilver on human gastric

carcinoma and normal lung fibroblast cell lines. *Tehran Univ. Med. J.* 2015; 72 (12): 799-807.

35. Salehi S, Shandiz SAS, Ghanbar F, Darvish MR, Ardestani MSH, Mirzaie A and Jafari M. Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Artemisia marschalliana* Sprengel aerial part extract and assessment of their antioxidant, anticancer, and antibacterial properties. *Int. J. Nanomedicine* 2016; 11: 1835 - 1846.

36. Daizy P. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa*. *Physica E.* 2010; 42: 1417 - 24.



Silver Nanoparticles Synthesis Using *Artemisia turcomanica* Ethanolic Extract and Study of Anti-proliferative Effects on Cell Line of Gastric Cancer

Mousavi B (M.Sc. student)¹, Tafvizi F (Ph.D.)^{1*}, Zaker Bostanabad S (Ph.D.)¹

1- Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran

*Corresponding author: Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran

Tel: +98- 912- 5709532

Email: farzanehtafvizi54@gmail.com

Abstract

Background: The use of plants for the synthesis of nanoparticles, because of not using pollutants and toxins, is considered an eco-friendly method.

Objective: The purpose of this study is silver nanoparticles biosynthesis using *Artemisia turcomanica* extract and evaluating the toxicity of synthesized silver nanoparticles on gastric cancer cell line (AGS).

Methods: For synthesizing silver nanoparticles, the leaf extract of *Artemisia turcomanica* was used. Phytomorphology of bio silver nanoparticles using Transmission Electron Microscopy (TEM) and Scanning Electron Microscope (SEM) analysis was evaluated. Cytotoxicity effects of bio nanoparticles in two cell lines of gastric cancer (AGS) and fibroblast normal cell (L-929) in concentrations of 3, 5, 12.5, 25, 50, and 100 µg/ml were evaluated in 24 hours by MTT assay. Apoptosis was analysed by floctometry.

Results: The IC₅₀ value for silver nanoparticles was 4.88 µg/ml during 24 h on AGS cell line, which was significant comparing to the control group. Also the IC₅₀ value for silver nanoparticles in 24 hours for normal cells was 14.56 µg/ml. Apoptosis was detected in test group which was more than necrosis. A significant difference was observed between apoptosis and necrosis.

Conclusion: In this study the extract of *Artemisia turcomanica* was used for the first time for biosynthesis of silver nanoparticles and results suggest that synthesized silver nanoparticles have cytotoxicity and apoptosis induction effect on gastric cancer cells.

Keywords: *Artemisia turcomanica*, Biological nanosilver, Cytotoxicity

