

بررسی پتانسیل جهش‌زایی و فعالیت سیتوتوکسیک نانوذرات نقره بیوسنتزی

سید محمد غفوری^۱، غلامرضا بخشی خانیکی^۲، *مهرداد هاشمی^۳

چکیده

مقدمه: اطلاعات محدودی در رابطه با سمیت و آسیب‌زایی نانوذررات موجود است. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر سیتوتوکسیک و پتانسیل جهش‌زایی نانوذررات نقره بیوسنتز شده به وسیله عصاره آبی گیاه فلوس (Cassia fistula) بود.

روش بررسی: بدین منظور محلول نیترات نقره و عصاره آبی میوه گیاه فلوس به نسبت ۹ به ۱ مجاور شدند. پس از تغییر رنگ محلول، تولید نانوذررات نقره به وسیله روش‌های اسپکتروفتومتری، پراش پرتوی ایکس، تهیه میکروگراف به وسیله میکروسکوپ الکترونی عبوری و آزمون پراکندگی نور پویا مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه پتانسیل جهش‌زایی نانوذررات تولیدی به وسیله آزمون ایمرز بررسی شد و در نهایت خاصیت سیتوتوکسیک نانوذررات نقره بر روی رده سلولی 4T1 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد.

یافته‌ها: تغییر رنگ محلول پس از ۱۶ ساعت مشاهده شد که نشان‌دهنده تولید نانوذررات نقره بود. حضور نانوذررات نقره به وسیله آزمون‌های اسپکتروفتومتری، پراش اشعه ایکس و تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری تأیید شد. آزمون تفرق دینامیک نور مشخص کرد که غالب نانوذررات تولید شده در اندازه ۳/۶ الی ۴/۵ نانومتر هستند. نتایج آزمون ایمرز نشان داد که نانوذررات نقره در هیچ یک از رقت‌های مورد آزمایش خاصیت جهش‌زایی از خود نشان نمی‌دهند. همچنین آزمون MTT تأیید نمود که نانوذررات بیوسنتز شده دارای اثر سیتوتوکسیک وابسته به دوز هستند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه حاکی بر آن بود که نانوذررات نقره می‌توانند به عنوان یک گزینه مناسب جهت استفاده در صنایع گوناگون مطرح شوند هرچند که اثرات جانبی نانوذررات نقره می‌بایست به صورت دقیق‌تری مورد مطالعه قرار گیرند.

کلمات کلیدی: نانوذررات، نقره، بیوسنتز، آزمون جهش‌زایی، عوامل سیتوتوکسیک

مقدمه

بسیاری از واکنش‌های طبیعی در مقیاس نانو رخ می‌دهند، بنابراین تلاقی علم زیست‌شناسی و نانوتکنولوژی می‌تواند مشکلات متعددی را حل کند و علومی مانند پزشکی و بهداشت را متحول نماید [۱]. در حال حاضر نانوتکنولوژی به عنوان ابزاری برای کاوش در ناشناخته‌ترین زمینه‌های علوم پزشکی مانند تصویر برداری، حسگرها، دارورسانی هدفمند، ژن درمانی و ایمپلنت‌های مصنوعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. داروهای نوین نانوذرات پلیمری، فلزی و یا سرامیکی هستند که می‌توانند با بیماری‌هایی مانند سرطان و پاتوژن‌های باکتریایی مبارزه کنند [۲].

از دیرباز نقره به عنوان یک عامل ضد باکتری، ضد قارچ و ضد ویروس مورد استفاده قرار گرفته است زیرا درحالی که این ماده اثر سمیت بسیار زیادی بر روی میکروارگانیسم‌ها دارد، اما سمیت آن برای انسان بسیار کمتر است [۳]. مواد ضد میکروبی مانند نیترات نقره به راحتی از راه تشکیل کمپلکس و رسوب غیرفعال می‌شوند با این حال، نانوذرات نقره جایگزین ارزشمندی برای آن است. نانوذرات نقره فعالیت ضد میکروبی گسترده‌ای علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی، قارچ‌ها و ویروس‌ها از خود نشان می‌دهند، در نتیجه از آنها در مواردی مانند پوشش باندهای مورد استفاده در زخم سوختگی استفاده می‌شود [۴]. روش‌های متفاوتی جهت تولید نانوذرات وجود دارد که از رایج‌ترین آنها می‌توان به روش فیزیکی و شیمیایی اشاره کرد اما استفاده از این روش‌ها به دلایلی مانند استفاده از مواد سمی، تولید پسماندهای خطرناک، مصرف بالای انرژی و راندمان پایین با محدودیت‌هایی مواجه است. به تازگی روش بیوستنتز به علت مصرف کم انرژی، سازگاری با طبیعت و عدم نیاز به استفاده از مواد سمی و خطرناک مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است [۵].

به علت ویژگی‌های مطلوب نانوذرات مانند ارزان بودن، سختی و کاربرد زیاد آنها در صنعت گرایش به استفاده از آنها رو به افزایش است و در نتیجه انتظار می‌رود که تماس با این

نانومواد نیز افزایش یابد. در نتیجه چنین تماسی این خطر وجود دارد که خصوصیات نانوذرات باعث شود که آنها اثرات جانبی بیولوژیکی مانند سمیت سلولی و ژنی از خود بروز دهند که متفاوت با حالت توده‌ای آنها باشد. به عنوان مثال در حالی که برخی مواد در حالت توده‌ای اثری خاصی از خود نشان نمی‌دهند اما در مقیاس نانو سطح آنها می‌تواند منجر به تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال شوند و این ترکیبات به نوبه خود می‌توانند سبب آسیب سلولی، آسیب DNA و بروز جهش‌های ژنی شوند [۶]. اطلاعات محدودی در رابطه با سمیت و آسیب ژنی نانوذرات موجود است و در برخی موارد داده‌ها بی‌معنی و کاملاً متناقض هستند. همچنین از دیدگاه قانونی تعیین سمیت نانوذراتی که اکنون در ساخت محصولات جدید به کار می‌روند بسیار مهم است. آزمون بررسی جهش معکوس سالمونلا (آزمون ایمز) به صورت گسترده‌ای جهت سنجش خاصیت جهش‌زایی مواد به کار می‌رود [۷]. در آزمون ایمز با بهره‌گیری از سویه‌های مختلف سالمونلا تیفی موریوم، دو کلاس جهش نقطه‌ای و تغییر قالب مورد بررسی قرار می‌گیرد [۸، ۹].

پژوهش کنونی با هدف بررسی بیوستنتز نانوذرات نقره به وسیله عصاره آبی میوه گیاه فلوس (*Cassia fistula*) انجام شد. در ادامه پتانسیل جهش‌زایی نانوذرات نقره بیوستنتز شده به وسیله آزمون ایمز بر روی چهار سویه سالمونلا تیفی بررسی شد و در آخر نیز اثر سمیت سلولی نانوذرات تولید شده بر روی رده سلولی سرطان سینه موش (4T1) به وسیله آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

میوه گیاه فلوس از محل رویشگاه طبیعی آن در دزفول، خوزستان، ایران در فصل میوه‌دهی جمع‌آوری و جنس و گونه آن توسط متخصص گیاه‌شناس در دانشگاه آزاد اسلامی واحد دزفول، دانشکده کشاورزی، دپارتمان گیاه پزشکی تأیید شد. ۵۰ گرم پالپ میوه گیاه فلوس جداسازی شده و خرد شد. پالپ خرد شده در یک بشر ریخته و به آن ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار

به منظور بررسی پتانسیل جهش‌زایی نانوذرات تولید شده، سوبه‌های باکتری با نانوذرات تولیدی به روش شرح داده شده در مطالعه مارون و ایمز مجاور شدند. به طور خلاصه ۱۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه چهار سوبه باکتری (TA98، TA100، TA102 و TA1537) به طور جداگانه با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر) در محلول تاپ آگار (۰/۶٪ آگار، ۰/۵٪ NaCl، ۱۰۰ میکرولیتر هیستیدین ۰/۵ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر بیوتین ۰/۵ میلی مولار) مجاور شدند. سپس محلول تاپ آگار بر روی پلیت‌های آگار حداقل [آگار ۱/۵٪، نمک و گِل-بُر^۴ (محلول سولفات سدیم ۰/۲ gr/L، محلول سیتریک اسید مونوهیدرات ۲ g/L، محلول دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۱۰ g/L، و محلول سدیم آمونیوم فسفات ۳/۵ g/L) و گلوکز ۲٪] ریخته شد. به منظور شاهد مثبت در غیاب نانوذرات، برای سوبه TA98 از ۲-نیتروفلورن، سوبه TA100 از سدیم آزید، TA102 از میتومایسین C و برای TA1537 از ICR-191 استفاده شد. پلیت‌ها برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه و پس از آن کلنی‌های برگشتی شمارش شد. تمامی آزمایشات برای سه بار تکرار شدند [۱۳]. نرخ جهش‌زایی به وسیله فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{نرخ جهش‌زایی} = \frac{\text{تعداد کلنی برگشتی‌های نمونه}}{\text{تعداد کلنی کنترل‌های منفی}}$$

در صورتی که این نسبت بیش از عدد ۲ باشد، نشان دهنده جهش‌زا بودن نمونه است.

فعالیت سیتوتوکسیک نانوذرات نقره تولیدی بر رده سلولی 4T1 (سرطان پستان موش) به روشی که توسط سوآمی^۵ و همکارانش شرح داده شده مورد بررسی قرار گرفت [۱۴]. به طور خلاصه، سلول‌ها در محیط DMEM^۶ که به آن

تقطیر اضافه شد و به مدت ۳ دقیقه جوشانده و توسط کاغذ واتمن صاف شد. در آخر عصاره تهیه شده جهت نگهداری در یخچال و دمای ۴ درجه قرار گرفت.

به منظور تولید نانوذرات نقره، ۱۰ میلی لیتر از عصاره به ۹۰ میلی لیتر نیترات نقره ۱ میلی مولار اضافه شد. مخلوط در دمای اتاق و شرایط تاریکی قرار گرفت. تغییر رنگ محلول نشان دهنده تولید نانوذرات نقره است [۱۰].

پس از مشاهده تغییر رنگ محلول واکنش، آزمون اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۰۰ الی ۵۰۰ نانومتر و با تون تفکیکی ۱ نانومتر جهت بررسی تولید نانوذرات نقره انجام گرفت. پس از آن تولید نانوذرات نقره به وسیله آزمون‌های پراش اشعه ایکس (XRD)^۱ و عکسبرداری به وسیله میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)^۲ بررسی شد. به منظور تهیه میکروگراف به وسیله میکروسکوپ الکترونی عبوری، ۲۵ میکرولیتر از محلول بر روی یک گرید مسی چکانده شد و پس از خشک شدن توسط لامپ مادون قرمز، عکسبرداری در بزرگنمایی‌های مختلف به وسیله میکروسکوپ الکترونی عبوری (مدل Philips, EM-280) انجام شد. جهت انجام آزمون XRD، نانوذرات بر روی گرید مخصوص آزمون XRD ثابت شدند و آزمون به وسیله دستگاه X'Pert Pro MPD با زاویه اسکن 2θ و محدوده اسکن ۱۰ تا ۸۰ درجه انجام شد. همچنین ولتاژ استفاده شده ۴۰KV و جریان 30 mA و جنس آند از مس بود. نرخ اسکن بر روی $2^\circ/\text{min}^{-1}$ تنظیم شد [۱۱، ۱۲]. جهت بررسی توزیع اندازه نانوذرات از آزمون تفرق دینامیک نور (DLS)^۳ استفاده و جهت انجام این آزمون دستگاه Zetasizer Nano ZS ZEN3600, Malvern, UK مورد استفاده قرار گرفت. در این روش میانگین اندازه نانوذرات در نمونه با توجه به تعداد و حجمشان مورد بررسی قرار می‌گیرند.

4. Vogel Bonner

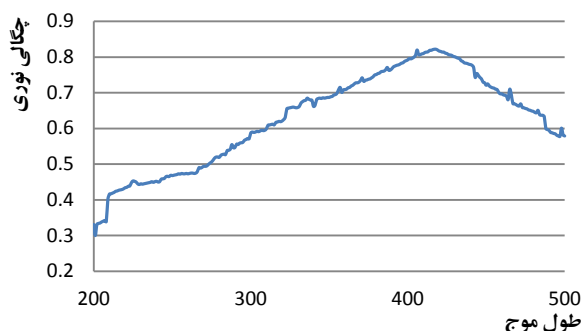
5. Swamy

6. Dulbecco's Modified Eagle's Medium

1. X-Ray Diffraction

2. Transmission electron microscopy

3. Dynamic light scattering



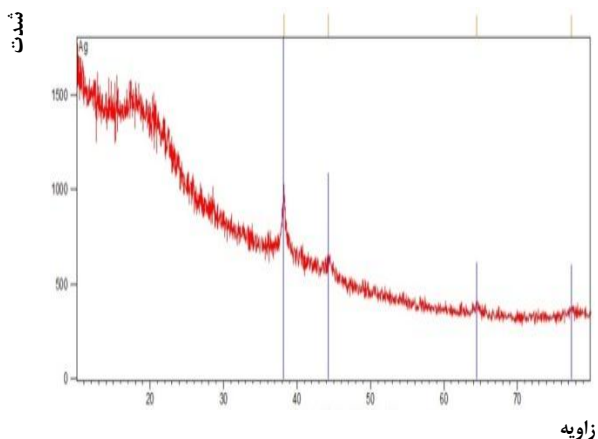
نمودار ۱- میزان چگالی نوری نانوذرات تولید شده در طول موج ۲۰۰-۵۰۰ نانومتر

(تصویر ۱). تغییر رنگ محلول یکی از نشانه‌های تولید نانوذرات نقره است.

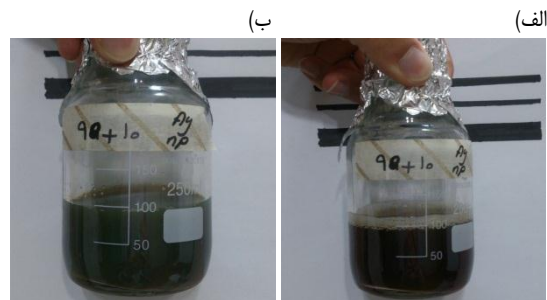
پس از تغییر رنگ محلول، میزان چگالی نوری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون اسپکتروفوتومتری نشان داد که حداکثر جذب محلول واکنش در طول موج ۴۲۰ نانومتر است که نشان دهنده تولید و حضور نانوذرات نقره در محلول واکنش است. نمودار ۱ چگالی نوری محلول واکنش را در طول موج ۲۰۰ الی ۵۰۰ نانومتر نشان می‌دهد.

بررسی نتایج به وسیله روش XRD پنج پیک را در زوایای ۳۸/۱۲۶، ۴۴/۳۱۳، ۶۴/۴۶۴، ۷۷/۴۲۴ و ۸۱/۵۶۹ در ۲θ نشان داد. زاویه پیک‌های به دست آمده، شدت آنها و بررسی نمودار توسط نرم افزار X'Pert Highscore plus وجود نانوذرات نقره را در محلول تأیید کرد. همچنین نتایج پس از انطباق با پایگاه داده ICSD تأیید گردید. (نمودار ۲)

تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری مشخص نمود که نانوذرات تولید شده هرمی، شش وجهی، بی شکل و با اندازه‌ای در حدود ۵۰ الی ۱۵۰ نانومتر هستند (تصویر ۲).



نمودار ۲- الگوی پراکنش اشعه ایکس در آزمون XRD



تصویر ۱- تصویر محلول قبل (الف) و پس از تولید نانوذرات نقره (ب)

L-گلوتامین (۲ mM)، پنی سیلین (۱۰۰ U/mL)، استرپتومایسین (۱۰۰ mg/mL) و سرم جنین گاوی ۱۰٪ اضافه شده بود، کشت داده شدند. در حدود 5×10^4 سلول در هر خانه پلیت کشت سلول ۹۶ خانه تلقیح شد و پلیت در انکوباتور CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای ۴۸ ساعت انکوبه شدند. جهت بررسی فعالیت سایتوتوکسیک، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره تولید شده، مجاور شد و برای مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. در پایان هر زمان انکوباسیون درصد زنده ماندن سلولی^۲ به وسیله آزمون MTT و با استفاده از ماده ۳ دی متیل ۲ تیازولیل ۵و۲ دی فنیل تترازولیم بوروماید^۳ بررسی شد. جهت این آزمون ۱۰ mL از محلول MTT (۵ mg/mL) به هرخانه پلیت اضافه و پلیت برای ۴ ساعت در شرایط قبلی انکوبه شد. در نهایت میزان جذب توسط دستگاه الیزا در طول موج ۵۷۰ nm مورد بررسی قرار گرفت. درصد زنده ماندن سلول به وسیله فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{میزان جذب در نمونه مورد آزمایش} = \frac{\text{درصد زیست پذیری سلولی}}{\text{میزان جذب در نمونه کنترل}}$$

یافته‌ها

پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون تغییر رنگ در محلول واکنش مشاهده شد. به علت رنگ عصاره، رنگ محلول اولیه قهوه‌ای بود که پس از ۲۴ ساعت به سبز تیره تغییر یافت

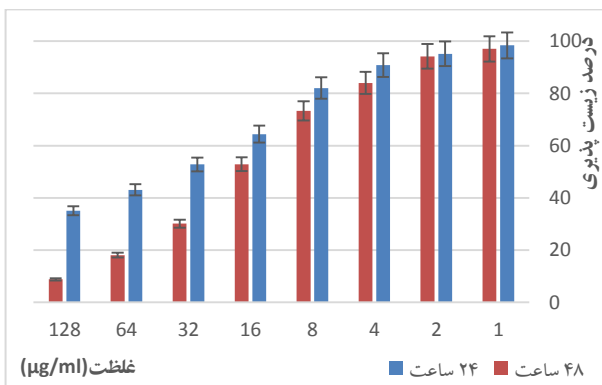
1. fetal bovine serum
2. cell viability
3. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

جدول ۱- میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی هر پلیت در آزمون ایمرز

دوز (μl/plate)	TA1537	TA98	TA100	TA102
۱	۹±۱	۱۵±۲	۲۸±۳	۷۶±۸
۲	۷±۲	۱۸±۱	۲۷±۴	۷۹±۳
۴	۸±۱	۱۹±۲	۳۱±۲	۸۵±۶
۸	۸±۲	۱۸±۴	۳۴±۱	۸۹±۹
۱۶	۱۰±۱	۲۳±۱	۳۷±۲	۹۳±۵
۳۲	۱۱±۰	۲۴±۲	۴۱±۳	۱۰۷±۱۳
۶۴	T	۲۷±۳	T	۱۲۵±۱۱
۱۲۸	T	T	T	T
کنترل منفی	۹±۳	۲۱±۲	۳۱±۵	۹۸±۱۰
کنترل مثبت	۹۳±۸	۱۴۲±۱۲	۱۸۶±۱۹	۵۲۳±۳۸

خود نشان نمی‌دهند. نتایج آزمون ایمرز در جدول ۱ نشان داده شده است.

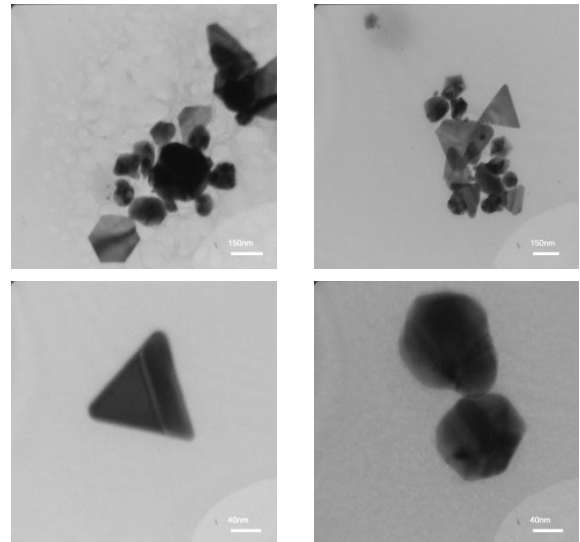
بررسی نتایج آزمون MTT مشخص کرد که تأثیر نانوذرات تولیدی بر روی رده سلولی 4T1 وابسته به دوز است. در حالی که نانوذرات تولیدی در غلظت‌های پایین اثر سیتوتوکسیک از خود نشان نمی‌دادند اما با افزایش غلظت نانوذرات در محلول به صورت معنی‌داری باعث کاهش جمعیت سلولی می‌شدند. نتایج آزمون MTT و درصد زیست‌پذیری سلول‌ها در دو زمان مورد آزمایش در نمودار ۵ مشاهده می‌شود.



نمودار ۵- درصد زیست‌پذیری سلولی در غلظت‌های مختلف نانوذرات در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت

بحث و نتیجه‌گیری

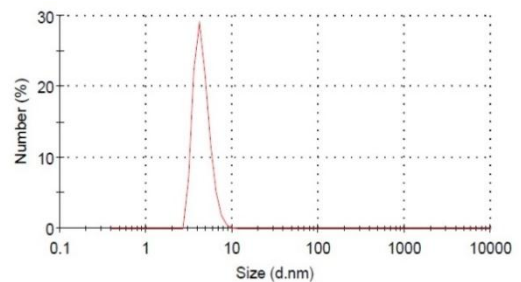
احیای شیمیایی محلول آبی نیترات نقره یکی از راه‌هایی است که به صورت گسترده به منظور تولید نانوذرات نقره مورد استفاده قرار می‌گیرد و تغییر رنگ محلول به قهوه‌ای تیره نشان‌دهنده تولید نانوذرات نقره است [۱۵]. با این حال در مطالعه حاضر یک تفاوت اساسی با سایر مطالعات وجود داشت.



تصویر ۲- تصاویر میکروسکوپ TEM در بزرگنمایی‌های متفاوت

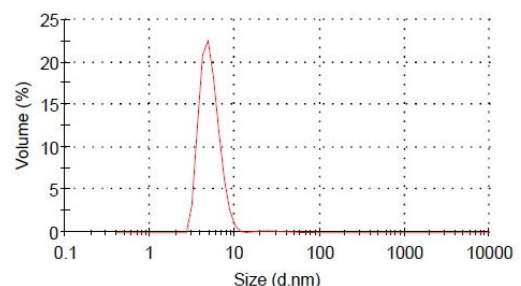
نتایج آزمون DLS نشان داد که اندازه نانوذرات در محدوده ۱/۸ الی ۱۰ نانومتر است. همچنین مشخص شد بیش از ۷۰٪ نانوذرات تولید شده اندازه‌ای در محدوده ۳/۶ الی ۴/۵ نانومتر داشتند. نمودار ۳ و ۴ به ترتیب اندازه نانوذرات بر حسب تعداد و حجم نشان می‌دهند.

آزمون ایمرز بر روی رقت‌های مختلف نانوذرات نشان داد که نانوذرات تولیدی در هیچ یک از رقت‌ها خاصیت جهش‌زایی از



Record 654: 95090315001001 1

نمودار ۳- تعداد نانوذرات بر حسب اندازه



Record 654: 95090315001001 1

نمودار ۴- اندازه نانوذرات بر حسب حجم

و مطالعه بیشتر در زمینه مکانیسم تولید نانوذرات چند وجهی توسط این عصاره ضروری به نظر می‌رسد.

نتایج آزمون DLS نشان داد که اندازه اکثر نانوذرات در حدود ۳/۶ الی ۴/۵ نانومتر است. در رابطه با اندازه به دست آمده در این آزمون یک نکته قابل تأمل است. در بسیاری از مطالعات مانند مطالعات کریشناراج، چاندران، فیلیپ و سانگ اندازه نانوذرات با توجه به عکس‌های میکروسکوپ الکترونی و مقایسه اندازه نانوذرات با مقیاس درون عکس‌ها گزارش شده است [۱۹-۲۲]. در مطالعه حاضر تصاویر میکروسکوپ الکترونی اندازه نانوذرات را در حدود ۵۰ الی ۱۵۰ نانومتر نشان می‌دهند در صورتی که در آزمون DLS مشخص شد که غالب نانوذرات در حدود ۳/۵ الی ۴/۵ نانومتر هستند. با توجه به نتایج فوق به نظر می‌رسد که تصاویر میکروسکوپ الکترونی معیار مناسبی جهت گزارش اندازه نانوذرات نیست و جهت تعیین اندازه نانوذرات به آزمون‌های دقیق‌تری مانند DLS نیاز است.

در مطالعه حاضر، بررسی پتانسیل جهش‌زایی نانوذرات بیوستتر شده به وسیله آزمون ایمز هیچگونه اثر جهش‌زایی از نانوذرات تولید شده مشاهده نشد. لی و همکارانش در مطالعه‌ای اثر جهش‌زایی نانوذرات نقره را بر روی سویه‌های سالمونلا TA98، TA100، TA102، TA1537 و TA1535 مورد بررسی قرار دادند. این گروه اثر نانوذرات نقره را همراه و بدون محلول میکروزوم کبد موش بر روی باکتری‌های فوق بررسی نمودند. نتایج این گروه به نتایج مطالعه حاضر شبیه بود. نانوذرات نقره در هیچ رقتی اثر جهش‌زایی از خود نشان ندادند [۴].

کیم و همکارانش در مطالعه‌ای دیگر اثر جهش‌زایی نانوذرات نقره با اندازه ۴۰ الی ۵۹ نانومتر را بر روی سویه‌های سالمونلا TA98، TA100، TA1537 و TA1535 بررسی نمودند. این گروه نیز در مشاهدات خود بیان نمودند که نانوذرات نقره هیچ گونه اثر جهش‌زایی بر روی سویه‌های مورد آزمایش ندارند که این نتایج به نتایج مطالعه حاضر شبیه است [۱۳]. همچنین کیم و همکارانش در مطالعه‌ای دیگر بیان

رنگ محلول واکنش در ابتدا به علت رنگ عصاره قهوه‌ای تیره بود که پس از تولید نانوذرات محلول به رنگ سبز تیره تغییر رنگ یافت.

پس از تغییر رنگ، محلول به وسیله آزمون اسپکتروفوتومتری مورد بررسی قرار گرفت. اسپکتروفوتومتری روشی است که به وسیله آن می‌توان با استفاده از خاصیت رزونانس پلاسمون سطحی ذرات، حضور آنها را در محلول تشخیص داد [۱۶، ۱۷]. نتایج اسپکتروفوتومتری نشان داد که حداکثر چگالی نوری محلول واکنش در طول موج ۴۲۰ نانومتر بود که دلیل دیگری بر تولید نانوذرات نقره است. در مطالعه احمد و همکارانش مشخص شد که با گذشت زمان و پیشرفت واکنش، چگالی نوری محلول افزایش می‌یابد تا زمانی که واکنش دهنده‌ها تمام شوند و تولید نانوذرات نقره متوقف شود [۱۱].

تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد نانوذرات تولید شده به اشکال هرمی، شش وجهی و بی شکل هستند و اندازه آنها در حدود ۵۰ الی ۱۵۰ نانومتر است. اندازه نانوذرات تولید شده در مطالعات شانکار و همکارانش ۱۶ الی ۴۰ نانومتر [۱۸]، کریشناراج و همکارانش ۲۰ الی ۳۰ نانومتر [۱۹]، چاندران و همکارانش در حدود ۱۵ نانومتر [۲۰]، یونی و فیلیپ ۱۰ الی ۲۰ نانومتر [۲۱] و سانگ و کیم ۱۵ الی ۵۰۰ نانومتر اعلام شد [۲۲]. نظریه بار و همکارانش در رابطه با علت شکل‌گیری اندازه نانوذرات توسط مولکول‌های کورکاسایکلین بدین گونه بود که به دام افتادن یون‌های نقره در حفره‌های مولکول کورکاسایکلین و احیاء آنها، موجب تشکیل نانوذرات نقره با اندازه‌ای مشابه با حفره‌های کورکاسایکلین می‌شود [۲۳]. به هر صورت پر واضح است که در عصاره آبی میوه گیاه فلوس مولکول‌های زیادی وجود دارند که پتانسیل این را دارند که موجب کاهش یون‌های نقره شوند و نظریه فوق نمی‌تواند به صورت عمومی روش و علتی برای اندازه نانوذرات تولید شده را ارائه دهد. همچنین در عصاره آبی میوه فلوس مولکول‌هایی وجود دارند که پتانسیل تولید نانوذرات چند وجهی را دارا هستند

نمودند که نانوذرات نقره در آزمون ایمز هیچ گونه اثر جهش‌زایی در هیچ یک از رقت‌ها از خود نشان نمی‌دهند که این نتایج نیز با نتایج آزمون حاضر مشابهت دارد [۲۴].

نتایج پژوهش حاضر مشخص کرد که نانوذرات بیوسنتز شده اثرات سیتوتوکسیک خوبی بر روی رده سلولی 4T1 داشتند. نانوذرات تولیدی در رقت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشتر تأثیر معنی‌داری بر کاهش سلول‌های سرطانی داشتند. نانوذرات تولیدی در غلظت ۳۲ میکرولیتر بر میلی‌لیتر در مدت ۲۴ ساعت توانستند در حدود ۵۰٪ از سلول‌های سرطانی را از بین ببرند در صورتی که غلظت مورد نیاز برای مهار همین تعداد سلول در ۴۸ ساعت ۱۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود. نتایج پژوهش صفایی پور و همکارانش بر روی تأثیر نانوذرات بیوسنتز شده با ژانپول با اندازه ۱ الی ۱۰ نانومتر بر روی رده سلولی فیروسارکوما WEHI-164 نشان داد که این نانوذرات در رقت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر قادر به مهار رشد ۳۰٪ از سلول‌ها بودند و در رقت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر رشد ۶۰٪ از سلول‌ها را مهار می‌نمودند [۲۵]. در همین راستا ویوک و همکارانش رقت مورد نیاز برای مهار رشد سلول‌های رده MCF-7 را در ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۵۰ و ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیان نمودند که از مطالعه حاضر بیشتر بود [۲۶]. همچنین سوکرتا و همکارانش دوز کشتنده نانوذرات بیوسنتز شده به وسیله گیاه *Melia azedarach* را بر روی رده سلولی HeLa ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اعلام نمودند. علاوه بر

این پژوهش‌ها، مطالعات جاکوب و همکارانش بر روی رده سلولی Hep-2 [۱۰] و فولدبرگ و همکارانش بر روی رده سلولی A549 [۲۷] اثر وابسته به دوز نانوذرات نقره را تأیید نمود. مطالعات نشان داده است که نانوذرات نقره با تأثیر بر فعالیت میتوکندریایی و نیز القای آپوپتوز منجر به مرگ سلولی شوند [۲۶، ۲۸].

همچنین پژوهش‌ها مشخص نموده که اختلاف در نتایج بدست آمده در مورد غلظت اثر نانوذرات در القای آپوپتوز می‌تواند با اندازه و شکل نانوذرات مرتبط باشد [۲۷]. نکته مهم دیگر در تفاوت رقت سیتوتوکسیک، تفاوت در میزان نانوذرات در واحد حجم است. به علت اینکه در مطالعات متفاوت پس از بیوسنتز نانوذرات، غلظت نانوذرات در واحد حجم اندازه‌گیری نمی‌شود، در نتیجه امکان مقایسه دقیق میزان اثر نانوذرات بیوسنتزی بر اساس مطالعات حاضر وجود ندارد.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد نانوذرات بیوسنتزی پتانسیل بالقوه‌ای جهت استفاده‌های دارویی خصوصاً در زمینه درمان سرطان دارند و عدم مشاهده پتانسیل جهش‌زایی در غلظت‌های مختلف نانوذرات تولید شده نیز احتمال این موضوع را تقویت می‌کند. با این وجود کاملاً روشن است که با توجه به ماهیت ناشناخته نانوذرات، مطالعات بیشتری جهت استفاده گسترده از نانوذرات نقره در صنایع دارویی و غذایی مورد نیاز است.

References

1. Curtis A, Wilkinson C. Nanotechnology and approaches in biotechnology. *Trends in biotechnology*. 2001; 19(3):97-101.
2. Singh M, Singh S, Prasad S, Gambhir IS. Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. *Digest journal of nanomaterials and biostructures*. 2008; 3(3):115-122.
3. Silver S, Phung le T, Silver G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2006; 33(7):627-634.
4. Li Y, Chen DH, Yan J, Chen Y, Mittelstaedt RA, Zhang Y, et al. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. *Mutation research*. 2012; 745(1-2):4-10.
5. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010; 6(2):257-262.
6. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The journal of physical chemistry B*. 2008; 112(43):13608-13619.
7. Cimino MC. Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2006; 47(5):362-390.

8. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation research*. 2000; 455(1-2):29-60.
9. Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1973; 70(3):782-786.
10. Jacob SJ, Finub JS, Narayanan A. Synthesis of silver nanoparticles using Piper longum leaf extracts and its cytotoxic activity against Hep-2 cell line. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*. 2012; 91:212-214.
11. Ahmad N, Sharma S, Alam MK, Singh VN, Shamsi SF, Mehta BR, et al. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*. 2010; 81(1):81-86.
12. Jha AK, Prasad K, Prasad K, Kulkarni AR. Plant system: nature's nanofactory. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*. 2009; 73(2):219-223.
13. Kim HR, Park YJ, Shin DY, Oh SM, Chung KH. Appropriate in vitro methods for genotoxicity testing of silver nanoparticles. *Environmental health and toxicology*. 2013; 28:1-8.
14. Swamy MK, Akhtar MS, Mohanty SK, Sinniah UR. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using fruit extract of *Momordica cymbalaria* and assessment of their in vitro antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity activities. *Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy*. 2015; 151:939-944.
15. Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Khan MI, Kumar R, et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*. 2003; 28(4):313-318.
16. Kittel C. *Introduction to solid state physics*. 8th ed. Michigan: John Wiley & Sons; 2005.
17. Zeng S, Yu X, Law W-C, Zhang Y, Hu R, Dinh X-Q, et al. Size dependence of Au NP-enhanced surface plasmon resonance based on differential phase measurement. *Sensors and actuators B: chemical*. 2013; 176:1128-1133.
18. 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. *Journal of colloid and interface science*. 2004; 275(2):496-502.
19. Krishnaraj C, Jagan EG, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan PT, Mohan N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*. 2010; 76(1):50-56.
20. Chandran SP, Chaudhary M, Pasricha R, Ahmad A, Sastry M. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract. *Biotechnology progress*. 2006; 22(2):577-583.
21. Philip D, Unni C. Extracellular biosynthesis of gold and silver nanoparticles using *Krishna tulsi (Ocimum sanctum)* leaf. *Physica E: low-dimensional systems and nanostructures*. 2011; 43(7):1318-1322.
22. Song JY, Kim BS. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2009; 32(1):79-84.
23. Bar H, Bhui DK, Sahoo GP, Sarkar P, De SP, Misra A. Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. *Colloids and surfaces A*. 2009; 339(1-3):134-139.
24. Kim JS, Song KS, Sung JH, Ryu HR, Choi BG, Cho HS, et al. Genotoxicity, acute oral and dermal toxicity, eye and dermal irritation and corrosion and skin sensitisation evaluation of silver nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2013; 7(5):953-960.
25. Safaepour M, Shahverdi AR, Shahverdi HR, Khorramizadeh MR, Gohari AR. Green synthesis of small silver nanoparticles using geraniol and its cytotoxicity against fibrosarcoma-Wehi 164. *Avicenna journal of medical biotechnology*. 2009; 1(2):111-115.
26. Vivek R, Thangam R, Muthuchelian K, Gunasekaran P, Kaveri K, Kannan S. Green biosynthesis of silver nanoparticles from *Annona squamosa* leaf extract and its in vitro cytotoxic effect on MCF-7 cells. *Process biochemistry*. 2012; 47(12):2405-2410.
27. Foldbjerg R, Dang DA, Autrup H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of toxicology*. 2011; 85(7):743-750.
28. Sukirtha R, Priyanka KM, Antony JJ, Kamalakkannan S, Thangam R, Gunasekaran P, et al. Cytotoxic effect of green synthesized silver nanoparticles using *Melia azedarach* against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model. *Process biochemistry*. 2012; 47(2):273-279.

Evaluation of mutagenicity and cytotoxic activity of biosynthetic silver nanoparticles

Ghafoori SM¹, Bakhshi Khaniki Gh², *Hashemi M³

Abstract

Background: There are limited information on the toxicity and gene damage of nanoparticles. The aim of this study was to evaluate the effect of silver nanoparticles (AgNPs) biosynthesis using *Cassia fistula* aqueous extract.

Materials and methods: For this purpose, silver nitrate solution and aqueous extract of *C. fistula* fruit were mixed at a ratio of 9:1, respectively. After color changing, the formation of AgNPs was assessed by spectrophotometer, X-Ray diffraction (XRD) assay, transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS) analysis. Then, mutagenic potential of nanoparticles was studied by Ames test. Finally, the cytotoxic effects of silver nanoparticles on 4T1 cell line were assessed at 24 and 48 hours.

Results: The color changing of solution was observed after 16 hours that indicated the production of AgNPs. The presence of silver nanoparticles confirmed by spectrophotometer, XRD and TEM micrographs. DLS test revealed that the size of most nanoparticles ranges from 3.6 to 4.5 nm. Ames test showed that AgNPs did not show mutagenic activity at none of the tested dilutions. Also, MTT test results confirmed the dose-dependent cytotoxic effect of biosynthesized nanoparticles on 4T1 cell line.

Conclusion: The results indicated that the silver nanoparticles could be considered as a suitable option in various industries. Although, the side effects of silver nanoparticles should be studied more accurate.

Keywords: Silver, Nanoparticles, Biosynthesis, Mutagenicity test, Cytotoxic Agents

1. MSc Student, Department of Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran

2. Professor, Department of Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran

3. Associate professor, Department of Medical Biotechnology, Medical Sciences Branch Islamic Azad University of Tehran, Tehran, Iran (*Corresponding Author)
mhashemi@iautmu.ac.ir