

## بررسی اثر آپوپتوزی نانوذرات نقره با پوشش عصاره بومادران بر سلول‌های سرطان تخمدان A2780

جواد بهارآرا<sup>۱</sup>، طیبه رمضانی<sup>۲</sup>، نگار صغیری<sup>۳</sup> و فرزانه سالک<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری و گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران؛ <sup>۲</sup>دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی،

تهران، ایران؛ <sup>۳</sup>گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

مسئول مکاتبات: جواد بهارآرا، baharara@mshdiau.ac.ir

**چکیده.** استفاده از نانوذرات نقره به علت ویژگی‌های منحصر به فرد آن در حال افزایش است. گیاه دارویی بومادران از ترکیبات فعال زیستی غنی است. هدف از این پژوهش بررسی اثر ضدسرطانی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره بومادران بر رده سلولی سرطان تخمدان A2780 است. اثر سمیت نانوذرات نقره با آزمون MTT در زمان ۴۸ ساعت و با غلظت ۳۲ و ۱۶، ۸، ۴، ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بررسی شد. برای مطالعه مسیر القای مرگ سلولی از رنگ آمیزی DAPI، اکریدین اورنج / پروپودیوم یدید، آزمون آنکسین ۵ / پروپودیوم یدید و ارزیابی فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ استفاده شد. یافته‌ها نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده از گیاه بومادران در غلظت ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به کاهش ۵۰ درصدی زیست‌پذیری سلول‌های سرطان تخمدان منتهی می‌شود. همچنین نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی DAPI، اکریدین اورنج / پروپودیوم یدید، آنکسین / پروپودیوم یدید نشان داد که درصد سلول‌های آپوپتوزی در گروه‌های تیمار در مقایسه با کنترل افزایش یافته است. به علاوه، در سلول‌های تیمار شده فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ افزایش یافت که نشان‌دهنده القای مرگ سلولی توسط نانوذرات نقره از طریق مسیر وابسته به کاسپاز است. با توجه به نتایج می‌توان گفت که نانوذرات سنتز شده با عصاره گیاه بومادران می‌تواند از طریق القای آپوپتوز اثر سیتوتوکسیک خود را بر سلول‌های A2780 اعمال کند.

**واژه‌های کلیدی.** تولید زیستی، سمیت سلولی، کاسپاز، گیاه دارویی، نانوذرات

## Investigating the apoptotic effects of silver nanoparticles coated with *Achillea biebersteinii* extract on A2780 ovarian cancer cells

Javad Baharara<sup>1</sup>, Tayebe Ramezani<sup>2</sup>, Negar Saghiri<sup>3</sup> & Farzaneh Salek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Center for Animal Development Applied Biology & Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran; <sup>2</sup>Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran; <sup>3</sup>Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Correspondent author: Javad Baharara, baharara@mshdiau.ac.ir

**Abstract.** In recent years using silver nanoparticles (AgNPs) has increased due to its unique properties. The medicinal plant *Achillea biebersteinii* is rich in anti-cancer compounds. The aim of this study was to investigate the cytotoxicity of AgNPs synthesized using *Achillea biebersteinii* extract on human ovarian cancer A2780 cells. Cytotoxic effects of AgNPs with MTT test was performed in a 48-hour period in concentrations of 2, 4, 8, 16 and 32 µg/ml. To study the cell death induced by AgNPs, the staining methods of DAPI and acridine orange (AO)/ Propidium iodide (PI) were executed, Annexin v/Propidium iodide assays were performed and the activation of caspase 3 and 9 was assessed. The results showed that the synthesized AgNPs decreased cell viability in a dose-dependent manner, inhibitory concentration of 50 % (IC<sub>50</sub>) was calculated as 4 µg/ml. The results of AO/PI, DAPI staining methods and Annexin V/PI showed that, in treated groups, the percentage of apoptotic cells increased as compared with the control group. In addition, the treated groups showed increased activation of caspase 3 and 9. Therefore, silver nanoparticles induced cell death through the caspase-dependent pathway. The results suggest that AgNPs synthesized by the use of *Achillea biebersteinii* extract exert their cytotoxic effect on A2780 cells by inducing apoptosis.

**Key words.** caspase, cytotoxicity, green synthesis, medicinal plant, nanoparticles

## مقدمه

گزارش شده است و تاکنون بسیاری از محققان تولید نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره‌های گیاهی گزارش کرده‌اند (Ahmed et al., 2016). با توجه به فلور گیاهی غنی ایران، استفاده از گیاهان بومی برای سنتز نانوذرات و بررسی اثر نانوذرات تولیدشده ضروری به نظر می‌رسد. گیاه بومادران با نام علمی *Achillea biebersteinii* Afan یکی از گیاهان دارویی بومی ایران است، بومادران گل‌زرد در اکثر نقاط استان های خراسان به صورت علف هرز گسترش دارد و استفاده دارویی وسیعی دارد (Mazandarani et al., 2015). در این مطالعه، از گیاه بومادران زرد برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شد و همچنین، اثر ضدسرطانی نانوذرات حاصل بر سلول‌های سرطان تخمدان انسانی A2780 بررسی شده است.

## مواد و روش‌ها

### تهیه نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران زرد و شناسایی آنها

در این مطالعه از نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران استفاده شده که در مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی دانشگاه آزاد واحد مشهد تهیه شده است. این نانوذرات با استفاده از عصاره آبی گیاه بومادران، به عنوان عامل کاهنده و پایدارکننده، تولید شده و با روش‌های طیف‌سنجی نور فرابنفش-نور مرئی، تعیین اندازه نانوذرات و طیف‌سنجی مادون قرمز شناسایی شده بودند.

### کشت سلول

سلول‌های سرطان تخمدان انسانی A2780 از مؤسسه انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI با سرم جنینی ۱۰ درصد کشت داده شدند. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با میزان  $CO_2$  ۵ درصد و رطوبت کافی انکوبه شدند.

تعیین سمیت سلولی: در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه  $10^4 \times 5$  سلول ریخته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های ۳۲ و ۱۶، ۸، ۴، ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، سمیت سلول با روش MTT تحت ارزیابی قرار گرفت. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر خانه پلیت اضافه شد و ۲ ساعت دور از نور انکوبه شد. در نهایت، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر خانه اضافه شد و پس از گذشت ۱۰ دقیقه جذب نوری آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (Bio Take, Us) بررسی شد. درصد زیست‌پذیری سلول‌ها با فرمول زیر محاسبه شد:

نانوتکنولوژی علم مطالعه و کاربرد ذرات در مقیاس نانو است. هدف اصلی اکثر تحقیقات نانوتکنولوژی تشکیل ترکیبات جدید یا ایجاد تغییراتی در مواد برای استفاده بهتر از آنها است (Hughes et al., 2000). نانوذرات نقره بسته به نوع کاربرد، خواص فیزیکی و سیستم زنده مربوط، در اندازه و شکل‌های مختلفی تهیه می‌شوند (Prabhu & Poulouse, 2012). شناخته‌شده‌ترین اثر نانوذرات نقره خواص آنتی‌باکتریال آنها است. نانوذرات نقره با اتصال به پروتئین‌های حاوی گوگرد در سطح غشای باکتری‌ها، وارد آنها می‌شوند و با ایجاد تغییر در مورفولوژی و نفوذپذیری غشاء و تأثیرگذاری در زنجیره تنفسی و تقسیم سلولی در نهایت باعث مرگ باکتری‌ها به صورت مؤثر می‌شوند (McShan et al., 2014). در سال‌های اخیر، اثر ضد رگ‌زایی و ضدسرطانی نانوذرات نقره علاوه بر خواص ضد میکروبی آن مورد توجه قرار گرفته است. برای مثال اثر ضد رگ‌زایی نانوذرات نقره بر سلول‌های اندوتلیال شبکیه گاو بررسی شده و گزارش شده است که نانوذرات نقره قادر به القای آپوپتوز در سلول‌های مذکور است. به علاوه، تحقیقات این گروه نشان داد که این نانوذرات باعث کاهش بیان فاکتورهای رگ‌زایی از جمله فاکتور رشد اندوتلیال در سلول‌های تحت تیمار می‌شوند (Kalishwaralal et al., 2009). همچنین، در مطالعات متعدد اثر ضد تکثیر و ضدسرطانی نانوذرات نقره در کانون توجه قرار گرفته است و پتانسیل بالای این ماده در جهت مبارزه با سرطان به اثبات رسیده است (Rao et al., 2016). اثر ضدسرطانی نانوذرات نقره بر سلول‌های سرطانی رده HepG2 و سلول‌های طبیعی بررسی شده است. مطالعات این پژوهشگران نشان داد که اثر سمیت و توانایی القای مرگ سلولی نانوذرات نقره در سلول‌های سرطانی ۴۴ برابر بیشتر از سلول‌های طبیعی است (Faedmaleki et al., 2014). روش‌های متعددی برای تولید نانوذرات وجود دارند که اغلب روش‌های شیمیایی و فیزیکی شامل استفاده از مواد سمی یا عواملی مانند استفاده از فشار بالا است که تولید نانوذرات را با محدودیت مواجه کرده است (Iravani, 2014). استفاده از موجودات زنده مانند میکروارگانیسم‌ها و ماکروارگانیسم‌ها (به‌منزله واسطی در سنتز نانوذرات از ترکیبات معدنی) می‌تواند روش دیگری در کنار روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای تولید نانوذرات باشد. تولید زیستی نانوذرات حافظ محیط زیست و طبیعت است و آسیب‌رسانی به انسان، هوا و در مجموع اکوسیستم را بسیار پایین می‌آورد برای مثال، تولید نانوذرات نقره با استفاده از گیاه زیتون و آلوورا

سپس، جذب هر نمونه در طول موج ۴۰۰ یا ۴۰۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Biotake, Us) اندازه‌گیری شد.

زیست‌پذیری سلول‌ها (%) = جذب سلول‌های تیمارشده/جذب سلول‌های کنترل  $\times 100$

### آزمون‌های ارزیابی آپوپتوز

برای بررسی آپوپتوز، سلول‌های سرطان تخمدان A2780 با غلظت مهارتی میانه (IC<sub>50</sub>) تیمار شدند.

آزمون آنکسین ۵/ پروپودیوم دیدید: برای انجام این آزمون سلول‌های سرطان تخمدان A2780 به مدت ۲۴ ساعت با غلظت مهارتی میانه تحت تیمار قرار گرفتند. سپس سلول‌ها جدا و سانتریفیوژ شدند. به هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر 1x Binding Buffer، ۵ میکرولیتر آنکسین ۵ و پروپودیوم دیدید اضافه شد و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند توسط دستگاه فلوسایتمتری (Bd, Us) تحلیل صورت گرفت.

رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/ پروپودیوم دیدید: برای انجام این روش سلول‌های سرطان تخمدان A2780 به مدت ۲۴ ساعت با غلظت مهارتی میانه تیمار شدند. سپس، سلول‌های گروه کنترل و تیمار تریپسینه شدند و به آنها ۱۰ میکرولیتر اکریدین اورنج و ۱۰ میکرولیتر پروپودیوم دیدید اضافه شد. پس از پیتاژ توسط میکروسکوپ فلورسنت (Olympus, Japan) تحت بررسی قرار گرفتند.

رنگ‌آمیزی DAPI: جهت انجام این رنگ‌آمیزی تعداد  $5 \times 10^5$  سلول در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت با غلظت مهارتی میانه تیمار شدند. سپس، سلول‌های گروه کنترل و تیمار با متانول تثبیت شدند و سپس در معرض رنگ DAPI به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus, Japan) عکس‌برداری انجام شد.

تست اندازه‌گیری فعالیت کاسپاز ۳ و ۹: تعداد  $10^6$  سلول در فلاسک‌های کشت قرار گرفتند و ۲۴ ساعت با نانوذرات نقره در غلظت میانه مهارتی تیمار شدند. سپس، سلول‌های گروه کنترل و تیماری از کف فلاسک جدا و سانتریفیوژ شدند. به هر نمونه ۵۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده اضافه شد و نمونه‌ها ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند، سپس در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند و از محیط رویی برای تعیین غلظت پروتئین استفاده شد. در این مرحله، ۵۰ میکرولیتر از DDT و بافر 2X و ۵ میکرولیتر از سوبسترای کاسپاز ۹ (LEHD-P-NA) و سوبسترای کاسپاز ۳ (DEVD-P-NA) به هر نمونه اضافه شد و به مدت ۲ ساعت درون انکوباتور انکوبه شدند.

### نتایج

#### تهیه نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران زرد و شناسایی آنها

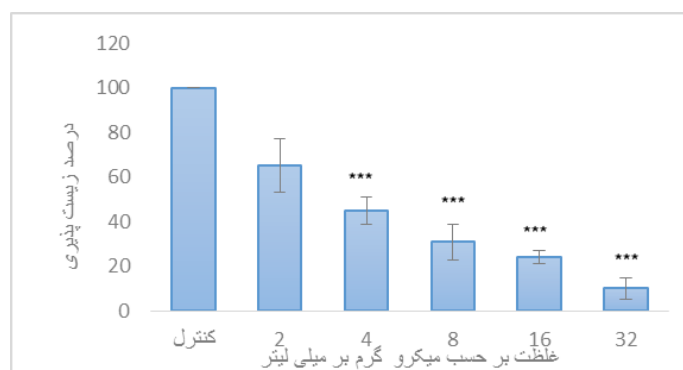
میانگین نانوذرات استفاده شده در این پژوهش ۱۲ نانومتر و ماکزیمم جذب آنها ۴۶۰ نانومتر ثبت شد. مطابق نتایج حاصل از طیف‌سنجی مادون قرمز، عصاره گیاه بومادران زرد سطح نانوذرات تولیدشده را پوشش داده بود (Baharara et al., 2014).

#### ارزیابی القاء آپوپتوز

نتایج آزمون سمیت سلولی: نتایج نشان داد که غلظت ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات نقره در بازه زمانی ۴۸ ساعت باعث مهارت زیست‌پذیری نیمی از سلول‌های A2780 شد. همچنین، افزایش غلظت نانوذرات نقره پوشش‌داده شده با عصاره گیاه بومادران موجب کاهش بقای سلول‌ها شد. غلظت‌های بیشتر از ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به لیز شدن سلول‌ها در ساعت‌های اولیه تیمار منجر شدند (شکل ۱).

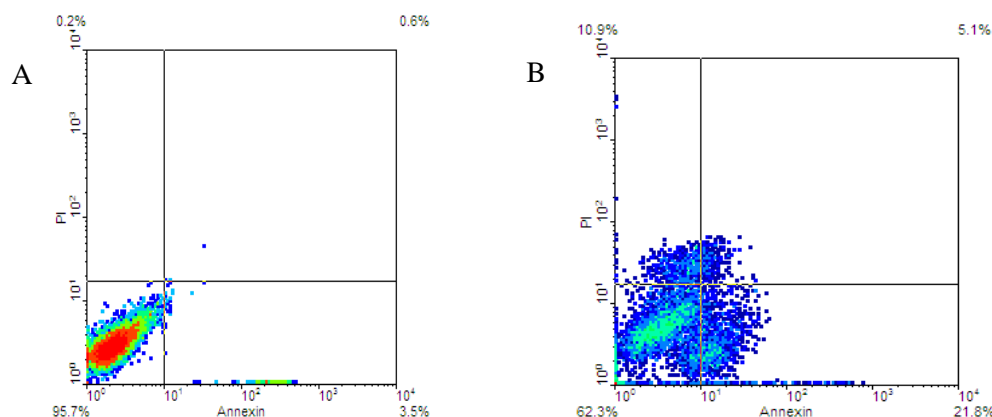
نتایج حاصل از آزمون آنکسین ۵/ پروپودیوم دیدید: نتایج حاصل از بررسی القای آپوپتوز در سلول‌های A2780 تیمارشده با غلظت ۴ میکروگرم/میلی‌لیتر نانوذرات نقره نشان داد که درصد سلول‌هایی که روند مرگ سلولی در آنها آغاز شده بود در نمونه‌های تیمار نسبت به کنترل افزایش یافته بدین ترتیب که درصد سلول‌هایی که در مرحله اولیه آپوپتوز قرار دارند، از ۳ درصد در نمونه کنترل به ۲۱ درصد در نمونه‌های تیمار افزایش یافت. همچنین درصد سلول‌هایی که در مرحله آپوپتوز انتهایی قرار دارند از صفر درصد در نمونه کنترل به ۵ درصد در نمونه تیماری افزایش نشان داد (شکل ۲).

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/ پروپودیوم دیدید: در رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/ پروپودیوم دیدید، سلول‌های زنده به رنگ سبز رویت می‌شوند در حالی که رنگ زرد مایل به نارنجی نشان‌دهنده آپوپتوز در سلول است. در نتیجه با بررسی سلول‌های رنگ‌شده می‌توان به نوع مرگ سلولی پی‌برد. نتایج حاصل از این روش نشان داد که در گروه کنترل همه سلول‌ها به رنگ سبز هستند (A) و در مقدار ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تقریباً نیمی از سلول‌ها سبز و نیمی زرد (B) رنگ بودند. نمودار حاصل از بررسی درصد زیست‌پذیری سلول‌ها نشان داد که درصد سلول‌های آپوپتوتیک در



**شکل ۱-** مقایسه اثر نانو ذره نقره سنتز شده با عصاره گیاه بومادران بر درصد بقای سلول های A2780 بعد از گذشت ۴۸ ساعت نسبت به گروه کنترل. غلظت ۴ میکروگرم بر میلی لیتر باعث مهار رشد سلولی تقریباً نیمی از سلول ها ( $IC_{50}$ ) شده است و غلظت های بالاتر آن باعث مرگ همه سلول ها شده است،  $P < 0/001$  \*\*\* Mean  $\pm$  SD.

**Fig. 1.** Comparative effects of silver nanoparticles synthesized using *Achillea biebersteinii* extract on the viability rate in A2780 cells after 48 hours. The Concentration of 4  $\mu$ g/ml inhibited almost half of the cells viability; however, higher concentrations led to death of all cells,  $*** P < 0/001$  Mean  $\pm$  SD.



**شکل ۲-** آزمون انکسین ۵/ پروپیدوم دیدید. **A:** نمونه کنترل نشان دهنده این است که بیشتر از ۹۵ درصد سلولهای رده سلولی A2780 زنده هستند و کمتر از ۴ درصد آنها دچار آپوپتوز شده اند. **B:** گروه تیمار با غلظت ۴ میکروگرم/میکرولیتر ۲۱ درصد سلول ها دچار آپوپتوز اولیه، ۵ درصد دچار آپوپتوز ثانویه و ۱۰ درصد باقیمانده دچار نکروز شده اند.

**Fig. 2.** Annexin V / PI. In the control sample, it was shown that more than 95% of the cells were alive and less than 4% of the cells were undergoing apoptosis but, in treated groups, with 4  $\mu$ g/ml of AgNPs, 21% of the cells showed early apoptosis signs, 5% and 10% of cells showed late apoptosis and necrosis, respectively.

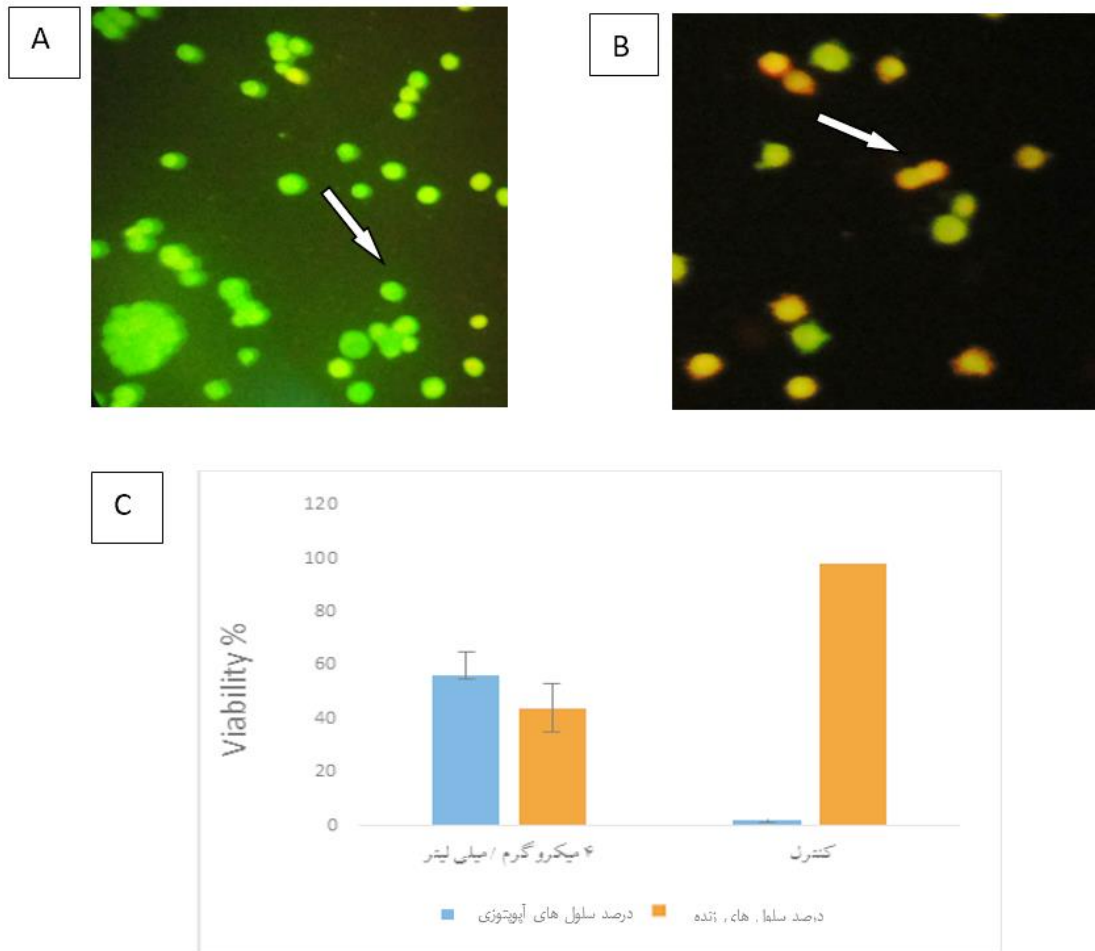
کاسپاز ۳ و ۹ در مقایسه با نمونه های بدون تیمار منجر شد. این نتایج نشان می دهد که مرگ سلولی القا شده در سلول های تیمار با نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران از مسیر وابسته به کاسپاز هدایت می شود (شکل ۵).

### بحث و نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، اثر نانوذرات نقره پوشش داده شده با عصاره گیاه بومادران بر روند القای مرگ سلولی برنامه ریزی شده در سلول های

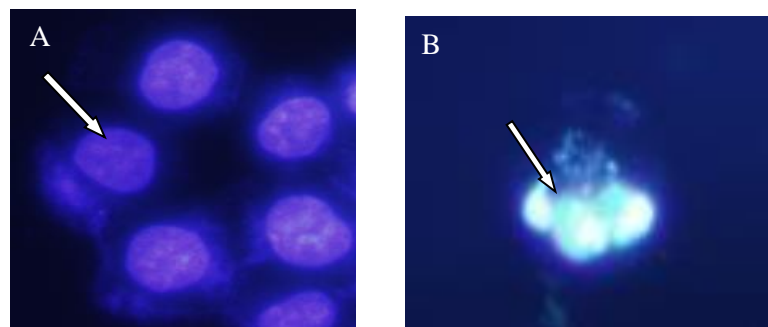
سلول های تحت تیمار افزایش یافته است (شکل ۳). نتایج حاصل از رنگ آمیزی DAPI: مطالعات نشان داد که در سلول های تیمار شده با نانوذرات نقره کروماتین ها شکسته، چندتکه و همچنین، سلول ها فشرده شده اند که این شواهد نشان دهنده آغاز مرگ سلولی برنامه ریزی شده در سلول های تحت تیمار هستند (شکل ۴).

نتایج حاصل از آزمون کاسپاز ۳ و ۹: این آزمون جهت تعیین مسیر آپوپتوزی القا شده توسط غلظت های مؤثر نانوذرات نقره استفاده شد. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره با پوشش گیاه بومادران به فعال شدن



شکل ۳- رنگ آمیزی اکریدین اورنج / پروپیدیوم یدید. **A**. در گروه کنترل، سلول‌ها به رنگ سبز مشاهده می‌شوند که نشان دهنده زنده بودن سلول‌ها است. **B**. در نمونه‌های تیمار با غلظت ۴ میکروگرم بر میلی لیتر نانو ذره نقره، تعدادی از سلول‌ها به رنگ زرد و نارنجی مشاهده می‌شوند که نشان می‌دهند این سلول‌ها دچار آپوپتوز شده‌اند. **C**: نمودار نشان می‌دهد که درصد زیست پذیری سلول‌ها تحت تیمار با غلظت ۴ میکروگرم / میلی لیتر نانو ذرات نقره کاهش یافته است (بزرگنمایی  $\times 200$ ).

**Fig. 3.** Ao/PI staining. **A.** In control groups, cells are green; this indicates that the cells are alive. **B.** In cells which were treated with 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of AgNPs, yellow and orange colors suggested the fact that these cells were undergoing apoptosis. **C:** The graph shows that the percentage of viable cells decreased in the group treated with 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of silver nanoparticles (magnification  $\times 200$ ).



شکل ۴- نتایج حاصل از رنگ آمیزی هسته ای DAPI. **A**. در گروه کنترل هسته سلول‌ها منسجم و یک دست هستند. **B**. در گروه تیمار با ۴ میکروگرم بر میلی لیتر از نانو ذرات نقره، هسته سلول‌ها چند تکه و سلول‌ها فشرده شده‌اند، پیکان‌ها هسته‌هایی را که دچار آپوپتوز شده‌اند نشان می‌دهد (بزرگنمایی  $\times 200$ ).

**Fig. 4.** The results of nuclear staining DAPI. **A.** In the control group, cells' nuclei are intact. **B.** In the group treated with 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AgNPs, cells' nuclei are fragmented and the cells are compressed. Apoptotic nuclei are shown by arrows (Magnification  $\times 200$ ).



**شکل ۵-** مقایسه فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ در گروه های تیمار و کنترل. همانطور که در نمودار فوق مشاهده می گردد فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ در نمونه های تیمار بصورت معنا دار نسبت به کنترل افزایش یافته است، \*\*\* $P < 0/001$  Mean  $\pm$  SD.

**Fig. 5.** Comparison of caspase 3 and 9 activity in treated and control groups. As it can be seen in the above graph, activation of caspase 3 and 9 in treated samples increased significantly as compared with the control, \*\*\* $P < 0/001$  Mean  $\pm$  SD.

نانوذره نقره درجات مختلفی از سمیت سلولی را در موقعیت برون-تبی نشان می دهند (Dos et al., 2014). در این تحقیق، برای بررسی اثر نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران بر زیست-پذیری سلول های سرطانی تخمدان A2780 از روش MTT استفاده شد که نوعی روش رنگ سنجی جهت بررسی اثر سمیت مواد است (Baharara et al., 2015). نتایج این آزمون نشان داد که نانوذرات نقره به صورت وابسته به مقدار و زمان به کاهش زیست پذیری در سلول های A2780 منجر می شوند، غلظتی از نانوذرات که به مرگ نیمی از سلول های منجر می شود ۴ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. اثر نانوذرات نقره با سنتز شیمیایی بر زیست پذیری سلول های HepG2 بررسی شده است (Brzóska et al., 2015). نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر موجب کاهش ۵۰ درصدی زیست پذیری سلول های HepG2 می شود این اختلاف ممکن است ناشی از روش متفاوت سنتز نانوذرات و پوشش سطحی نانوذرات در پژوهش حاضر باشد.

در پژوهش حاضر نشان داده شد که نانوذرات نقره به القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی در سلول های A2780 از طریق فعال کردن مسیر کاسپاز منجر می شوند. گزارش شده است که نانوذرات نقره به القای آپوپتوزیس در سلول های آستروسیت منجر می شوند. آنها نشان دادند که مرگ برنامه ریزی شده از طریق فعال شدن کاسپازها در سلول های تیمار شده آغاز می شود (Bexiga et al., 2011). نتایج مطالعات این گروه با داده های پژوهش حاضر هم سو است. اثر

سلول های سرطان تخمدان A2780 تحت بررسی قرار گرفت. نانوذرات نقره به علت ویژگی های خاص شیمیایی، فیزیکی، نور و کاتالیکی کانون توجه محققان و صنعت گران قرار گرفته است. نانوذرات نقره به علت ویژگی های خاص شیمیایی، فیزیکی، نور و کاتالیکی کانون توجه محققان و صنعت گران قرار گرفته است. این نانوذرات کاربردهای وسیعی در تولیداتی از جمله بانداژها و وسایل پزشکی دارد. به علاوه، اثر ضد رگ زایی، ضد قارچی، ضد باکتریایی و ضد التهابی نانوذرات نقره نیز گزارش شده است (McShan et al., 2014). اخیراً مطالعاتی در زمینه اثر ضد سرطانی نانوذرات انجام گرفته است. گروه های تحقیقاتی متعدد اثر سمی نانوذرات نقره را بر سلول های یوکاریوتی و پروکاریوتی و همچنین اثر آن را در استراتژی های درمانی شرح داده اند (Marambio-Jones & Hoek, 2010). محققین نشان دادند که سلول های سرطانی به یون نقره حساسیت بیشتری در مقایسه با سلول های طبیعی دارند. مطابق مطالعات پیشین، محیط سلول های توموری اسیدی است و آزاد شدن یون نقره از نانوذرات نقره به pH وابسته است. به عبارتی، در pH های بالاتر درصد بیشتری از یون های نقره آزاد می شوند. بنابراین، در محیط اسیدی سلول های سرطانی افزایش غلظت یون های نقره و سمیت روی می دهد (Jeong et al., 2016). نانوذرات نقره معمولاً در القای پاسخ های سلولی مختلف نتایج سمیت سلولی متفاوتی نشان می دهند. بسته به اندازه نانوذره، غلظت و مدت زمان تحت اثر،

## REFERENCES

- Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, SM., Schlager, J.J. and Hong Y. 2008. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. – *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233: 404-410.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, BL. and Ikram, S. 2016. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. – *J. Adv. Res.* 7: 17-28.
- Baharara, J., Namvar, F., Ramezani, T., Hosseini, N. and Mohamad, R. 2014. Green synthesis of silver nanoparticles using *Achillea biebersteinii* flower extract and its anti-angiogenic properties in the rat aortic ring model. – *Molecules* 19: 4624-34.
- Baharara, J., Namvar, F., Ramezani, T., Mousavi, M. and Mohamad, R. 2015. 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* 20: 2693-2706.
- Bexiga, M.G., Varela, J.A., Wang, F., Fenaroli, F., Salvati, A., Lynch, I., Simpson, J.C. and Dawson, K.A. 2011. Cationic nanoparticles induce caspase 3-, 7- and 9-mediated cytotoxicity in a human astrocytoma cell line. – *Nanotoxicology* 5: 557-567.
- Brzóska, K., Męczyńska-Wielgosz, S., Stępkowski, T.M. and Kruszewski, M. 2015. Adaptation of HepG2 cells to silver nanoparticles-induced stress is based on the pro-proliferative and anti-apoptotic changes in gene expression. – *Mutagenesis* 30: 431-439.
- Dos- Santos, C.A., Seckler, M.M., Ingle, A.P., Gupta, I., Galdiero, S., Galdiero, M., Gade, A. and Rai, M. 2014. Silver nanoparticles: Therapeutical uses, toxicity, and safety issues. – *J. Pharm. Sci.* 103: 1931-1944.
- Faedmaleki, F., Shirazi, F., Salarian, A., Ahmadi- Ashtiani, H. and Rastegar, H. 2014. Toxicity effect of silver nanoparticles on mice liver primary cell culture and hepg2 cell line. – *Iran. J. Pharm. Res.* 13: 235-242.
- Hughes, M.P., Alimova, A., Cnnbpiydp, N. and Awm, Z. 2000. AC electrokinetics: applications for nanotechnology. – *Nanotechnology* 11: 124-132.
- Iravani, A., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S.V. and Zolfaghari, S. 2014. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. – *Res. Pharm. Sci.* 9: 385-406.
- Jeong, J., Gurunathan, S. and Kang, M. 2016. Hypoxia-mediated autophagic flux inhibits silver nanoparticle-triggered apoptosis in human lung cancer cells. – *Sci. Rep.* 6: 21668.
- Kalishwaralal, K., Banumathia, E., Kumar, S.R., Pandiana, V., Deepaka, J., Muniyandia, S.H., Eomb, S. and Gurunathan, H. 2009. Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells. – *Colloids Surf B: Biointerfaces* 73: 51–57.
- Marambio-Jones, C. and Hoek, V. 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. – *J. Nanopart Res.* 12: 1531-1551.
- نانوذرات نقره بر القای آپوپتوز بر سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های فیبروبلاست بررسی شده است (Ahamed *et al.*, 2008). آنها نشان دادند که تیمار سلول‌های مذکور با نانوذرات نقره به آسیب دیدگی DNA در این سلول‌ها منجر می‌شود. همچنین، گزارش کردند که بیان P53 در هر دو نوع سلول بنیادی و فیبروبلاستی افزایش می‌یابد. در پژوهش حاضر نیز نشان داده شد که نانوذرات نقره تولیدشده با روش زیستی به تخریب DNA منجر می‌شود. اثر نانوذرات نقره بر سلول‌های سرطان کولون H116 تحت بررسی قرار گرفته است (Satapathy *et al.*, 2013). آنها نشان دادند که نانوذرات نقره به صورت وابسته به مقدار، به القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌های مذکور منجر می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد که این نانوذرات از طریق فعال کردن مسیر کاسپاز، فعال کردن P53، افزایش بیان BAX و کاهش بیان BCL-2 اثر آپوپتوزی خود را اعمال می‌کنند.
- این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره تولیدشده با عصاره گیاه بومادران باعث کاهش زیست‌پذیری در سلول‌های سرطانی تخمدان A2780 می‌شود. این نانوذرات به صورت وابسته به کاسپاز منجر به القای مرگ سلولی در سلول‌های مذکور می‌شود.

## سپاسگزاری

از همکاران مرکز تحقیقاتی بیولوژی کاربردی و تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد که در اجرای این پژوهش همکاری داشتند قدردانی می‌گردد.

**Mazandarani, M., Osia, N. and Ghafourian, M.** 2015. Antioxidant activity and ethno pharmacological survey of *Achillea biebersteinii* afan in the treatment of dysmenorrhoea in traditional medicine of Golestan province, Iran. – Int. J. Womens Health Reprod Sci. 3: 107-110.

**McShan, D., Ray, P.C. and Yu, H.** 2014. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. – J. Food Drug Anal. 22: 116-127.

**Prabhu, S. and Poulose, E.K.** 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical

applications, and toxicity effects. – Int. Nano Lett. 2: 32.

**Rao, P.V., Nallappan, D., Madhavi, K., Rahman, S., Jun-Wei, L. and Gan, S.H.** 2016. Phytochemicals and Biogenic Metallic Nanoparticles as Anticancer Agents. – Oxidative Med. Cell. Longev. 5: 1-15

**Satapathy, S., Mohapatra, P., Preet, R., Das, D., Sarkar, B., Choudhuri, T., Wyatt, M. and Kundu, C.** 2013. Silver-based nanoparticles induce apoptosis in human colon cancer cells mediated through p53. – Nanomedicine 8: 1307-1322.

\*\*\*\*\*

#### How to cite this article:

**Baharara, J., Ramezani, T., Saghiri, N. and Salek, F.** 2019. Investigation apoptotic effects of silver nanoparticles coated with *Achillea biebersteinii* extract on A2780 ovarian cancer cells. – Nova Biol. Reperta 6: 140-147.

بهارآرا، ج.، رمضانی، ط.، صغیری، ن. و سالک، ف. ۱۳۹۸. بررسی اثر آپوپتوزی نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران بر سلول‌های سرطان تخمدان A2780. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۱۴۷-۱۴۰.