Reduction of cell growth and induction of apoptosis in osteosarcoma cells by silver nanoparticles

Toktam Rajabnia[1], Azadeh Meshkini[2],

Background and Aim: In the present studysynthesis of silver nanoparticles and the assessment of its toxicity against the proliferation of osteosarcoma cells were done.

Materials and Methods: To confirm the production of silver nanoparticles, UV-Visible spectroscopy, X-ray diffraction, and TEM analyses were performed. MTT assay was used to evaluate the toxicity of nanoparticles against cancer cells. The induction of apoptosis was indicated by acridine orange-ethidium bromide staining and flow cytometry (sub-G1).

Results: Based on surface plasmon absorbance, silver nanoparticles exhibited a specific peak at 408 nm, indicating the synthesis of silver nanoparticles. TEM showed that the nanoparticles had a cubic shape with the mean diameter of 65.5 nm. Furthermore, XRD analyses revealed the synthesized nanoparticles had high crystallinity with 55 nm crystalite size. According to the MTT assay, nanoparticles can decrease the viability of Saos-2 cells in a dose dependent manner. IC_{50} value corresponding to silver nanoparticles was estimated 21.1 µg/ml. Moreover, the effect of nanoparticles on tumor cells was accompanied by the cellular uptake of nanoparticle, cell cycle arrest at G2 phase, and induction of cell death with mode of apoptosis.

Conclusion: Since silver nanoparticles can reduce the proliferation of Saos-2 cells and to eradicate them by induction of apoptosis, these nanoparticles can be taken as a candidate for treating osteosarcoma cells.

Key Words: Silver nanoparticles, Osteosarcoma, Apoptosis.

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2017; 24 (Supplementary: Biochimistry & Metabolism): 50-61.

Received: February 13, 2017 ***Accepted: April 22, 2017***

[1] *Department of Chemistry, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.*
[2] ***Corresponding Author;*** *Department of Chemistry, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.*
Email: a.meshkini@um.ac.ir Tel: +9851-38805552 Fax:+9851-38796416

مقاله اصیل پژوهشی

کاهش رشد سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان استخوان توسط نانوذرّه نقره

تکتم رجب‌نیا[1]، آزاده مشکینی[2]

چکیده

زمینه و هدف: در این مطالعه، سنتز نانوذرّه نقره و بررسی اثر سمیّت آن بر کاهش رشد و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان استخوان انجام شد

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی آنالیزهای طیف‌سنجی UV-Visible، آزمون پراش پرتوی ایکس و نیز تهیه تصویر میکروسکوپ الکترونی، به‌منظور بررسی تولید نانوذرّات نقره انجام شدند. برای بررسی سمیّت نانوذرّات بر سلول‌های سرطانی، از آزمون رنگ‌سنجی با استفاده از رنگ 3-(4و5 دی متیل تیازول)-2-5-دی فنیل تترازولیوم برومید (MTT) استفاده شد. با استفاده از رنگ‌آمیزی اکریدین ارنج-اتیدیوم برماید و فلوسایتومتری (sub-G1)، مرگ سلولی القاشده در سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس پیک جذبی ناشی از پلاسمون سطحی، نانوذرّات پیک مشخصی را در طول موج 408 نانومتر نشان دادند که حاکی از سنتز نانوذرّات نقره بود. تصویر TEM نشان داد که شکل نانوذرّات مکعبی بوده و میانگین اندازه آنها در حدود 65/5 نانومتر تعیین شد. آزمون پراش پرتوی ایکس نشان داد که نانوذرّات تولیدشده، دارای تبلور مناسب بوده و اندازه نانوکریستال‌ها 55 نانومتر بود. همچنین نتایج MTT نشان داد که نانوذرّات نقره در یک روند وابسته به غلظت، باعث کاهش رشد سلول‌های سرطان استخوان شدند؛ به‌طوری که نانوذرّات در غلظت µg/ml 21/1، 50درصد سلول‌ها را از بین بردند. نانوذرّات نقره پس از ورود به درون سلول‌های سرطانی، باعث توقف سیکل سلولی سلول‌های تیمارشده در فاز G2 و القای مرگ آپوپتوز در سلول‌ها شدند.

نتیجه‌گیری: استفاده از نانوذرّات نقره می‌تواند باعث کاهش رشد سلولی و القای آپوپتوز در این رده سلولی شود؛ بنابراین نانوذرّات نقره می‌توانند به‌عنوان یک گزینه مناسب برای درمان سرطان استخوان مطرح باشند.

واژه‌های کلیدی: نانوذرّات نقره، سرطان استخوان، آپوپتوز

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1396؛ 24 (ویژه‌نامه: بیوشیمی و متابولیسم): 50-61.

دریافت: 1395/11/25 **پذیرش: 1396/02/02**

[1] گروه شیمی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[2] **نویسنده مسؤول؛** گروه شیمی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

آدرس: مشهد- دانشگاه فردوسی- گروه شیمی

تلفن: 05138805552 نمابر: 05138796416 پست الکترونیکی: a.meshkini@um.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر، تکامل نانوذرّه‌های جدید و کاربرد آنها در زیست‌پزشکی، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از میان نانوذرّات فلزی، نانوذرّه نقره خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی منحصر به فردی در مقایسه با مقیاس ماکرو دارد. این مسئله باعث شده است که نانوذرّه نقره پس از نانولوله‌های کربنی، به‌عنوان یکی از پرکاربردترین ذرّات در حوزه فناوری نانو باشد (1). یکی از کاربردهای وسیع نانوذرّات نقره، استفاده از خواص ضدّ باکتریایی این ذرّات می‌باشد که در پزشکی و صنعت کاربرد گسترده‌ای دارد؛ علاوه بر این، سازگاری با محیط زیست، غیر محرّک و غیر حساسیّت‌زا بودن، عدم ایجاد مقاومت در برابر میکروارگانیسم‌ها، مقاومت در برابر حرارت و پایداری زیاد، از دیگر ویژگی‌های این نانوذرّات می‌باشد (2).

یکی دیگر از کاربردهای وسیع نانوذرّات نقره در سال‌های اخیر، استفاده از این ذرّات در درمان سرطان می‌باشد (3). هم‌اکنون از مواد شیمیایی مبتنی بر فلزّات مانند پلاتین، برای درمان سرطان استفاده می‌شود. در این راستا می‌توان به سیس‌پلاتین اشاره کرد که با آزادسازی یون پلاتینیوم، باعث از بین رفتن سلول سرطانی می‌شود (4). در سال‌های اخیر محقّقان نشان دادند که با توجه به خواص منحصر به فرد نانوفلزّات مانند نانوذرّه نقره، می‌توان به‌طور ویژه برخی از تومورهای سرطانی را بهتر از روش‌های شیمی‌درمانی و با عوارض جانبی کمتر از بین برد (5). نانوذرّات نقره با اختلال در انتقال پیام سلولی، باعث ایجاد اختلال در شبکه ارتباطی سلولی می‌شوند؛ همچنین این نانوذرّات باعث ایجاد آسیب در DNA و افزایش فعالیت کاسپازها و به‌راه انداختن مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی می‌شوند که این امر در درمان سرطان حائز اهمیت می‌باشد (6).

تاکنون اثرات ضدّ سرطانی نانوذرّه نقره بر روی رده سلولی سرطان کبد، سرطان شش، سرطان خون، سرطان کولون، سرطان سینه و سرطان معده در شرایط *in vitro* مورد بررسی قرار گرفته است. در همه مطالعات انجام‌شده نشان داده شده است که نانوذرّات نقره باعث کاهش رشد سلول‌های سرطانی و توقف چرخه سلولی و به دنبال آن باعث مرگ آپوپتوز سلول‌ها می‌شوند (7-12). همچنین اثر نانوذرّات نقره در شرایط *in vivo* بر سرطان سینه در موش‌های زنوگرافت نیز مورد بررسی قرار گرفته و اثر قابل توجه این نانوذرّه در کاهش اندازه تومور نیز گزارش شده است (13).

با توجه به مطالعاتی که تاکنون انجام شده است، مشخص گردید که نانوذرّه نقره علاوه بر خاصیت ضدّ میکروبی، دارای خاصیت ضدّ سرطانی شدیدی می‌باشد. در این مطالعه، ابتدا نانوذرّات نقره به روش احیای شیمیایی سنتز شد؛ سپس اثرات نانوذرّات بر کاهش رشد و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان استخوان مورد بررسی قرار گرفت.

روش تحقیق

سنتز نانوذرّات نقره:

به‌منظور آماده‌سازی نانوذرّه نقره، از محلول نیترات نقره (0/034 مولار) استفاده شد؛ سپس محلول سدیم بروهیدرید (0/1 مولار) به‌عنوان عامل احیاکننده، به مخلوط اضافه شد. پس از اضافه‌کردن 2 میلی‌لیتر از عامل احیایی، تغییر رنگ به‌صورت زرد کمرنگ و شفاف مشاهده شد که نشان‌دهنده تشکیل نانوذرّه نقره بود؛ سپس رنگ به‌صورت خاکستری و کدر ظاهر شد. برای تکمیل واکنش احیایی، مخلوط به‌مدّت 2ساعت در دمای اتاق بر روی همزن مغناطیسی مخلوط گردید. پس از انجام واکنش، محلول سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل برای انجام مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

مشخصه‌یابی نانوذرّات سنتزشده:

تغییر رنگ مخلوط واکنش از حالت زرد شفاف به مشکی و کدر، نشان‌دهنده تشکیل نانوذرّات نقره بود (شکل 1). برای اثبات سنتز نانوذرّات نقره با روش ذکرشده، طیف جذبی UV-Visible از نمونه‌های سنتزشده تهیه شد. به‌منظور مطالعه فاز نهایی و تشکیل نانوذرّات نقره، از دستگاه پراش

اشعه ایکس (XRD[1])(Explorer GNA, Italy) استفاده شد. نرخ روبش معادل 1 درجه بر دقیقه، ولتاژ اعمالی برابر 30 کیلوولت، جریان معادل 30 میلی‌آمپر و زاویه پراش (2θ) از 10 تا 90 درجه انتخاب گردید. میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM[2]) مدل Leo 912 AB (زایس-آلمان) برای عکس‌برداری از نمونه سنتزشده، مورد استفاده قرار گرفت.

شکل 1- مخلوط واکنش نانوذرّه نقره

کشت سلول‌های Saos-2:

رده سلولی Saos-2، سلول‌های سرطان استخوان هستند که به‌صورت تک‌لایه و چسبیده به کف فلاسک، رشد می‌کنند. سلول‌ها از انستیتوپاستور ایران تهیه شد. این سلول‌ها در محیط RPMI-1640 حاوی 10درصد سرم، استرپتومایسین (100µg/ml) و پنی‌سیلین (100U/ml) کشت شدند. به‌منظور جداکردن سلول‌ها از کف فلاسک، از ترپسین-EDTA[3] استفاده گردید.

بررسی حیات سلول با استفاده از آزمون MTT:

ابتدا محلول 3-(4 و 5 دی‌متیل‌تیازول)-2-5-دی‌فنیل تترازولیوم بromید MTT[4] با غلظت 5 میلی‌گرم/میلی‌لیتر در بافر نمکی فسفات (PBS[5]) تهیه شد. سلول‌ها در ظروف کشت 96 خانه کشت شدند و با غلظت‌های مختلف نانوذرّه (0/05-31/25 µg/ml) به‌مدت 48 ساعت تیمار شدند. چهار ساعت قبل از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌ها با نانوذرّات، مقدار 10ماکرولیتر از MTT به سلول‌ها اضافه گردید. پس از چهار ساعت نگهداری در انکوباتور 37؟C، واکنش با اضافه‌کردن HCL 0/4 نرمال در DMSO[6] متوقف گردید. این محلول‌ها باعث حل‌شدن رسوب فورمازان بنفش‌رنگ در سلول‌های سالم نیز می‌شوند. میزان جذب این رنگ توسط دستگاه خوانشگر الایزا (ELx800- BIOTEC- USA) در طول موج 570 نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی سیکل سلولی با استفاده از ترکیب پروپیدیوم ایودید:

ابتدا سلول‌ها در ظروف 24تایی کشت داده شدند و پس از گذشت 24 ساعت، نانوذرّات نقره با غلظت 21/1 µg/ml، به سلول‌ها اضافه شدند. پس از گذشت 48 ساعت از تیمار سلول‌ها، آنها را جمع‌آوری کرده و سپس سانتریفیوژ (800g) شدند. در مرحله بعد سلول‌ها با PBS سرد شستشو و با اتانول 70درصد ثابت شدند. برای بررسی فازهای چرخه سلولی، نمونه‌های کنترل و تیمارشده، به‌مدّت 30دقیقه با 20ماکروگرم پروپیدیوم ایودید (PI[7]) و 20 ماکروگرم RNase (حل‌شده در یک میلی‌لیتر PBS) مخلوط شدند و توسط دستگاه فلوسایتومتری (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA ساخت امریکا) بررسی گردیدند. با استفاده از نرم‌افزار FlowJo ، درصد جمعیت سلولی در مراحل G2/M, S, G1 و sub-G1 مشخص شد.

آنالیزهای آماری

نتایج کمّی به‌دست‌آمده به‌صورت Mean±SEM مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌های کمّی پس از ورود به نرم‌افزار SPSS (ویرایش 22)، با استفاده از آزمون‌های ANOVA و Tukey در سطح معنی‌داری P<0/05 تجزیه و تحلیل شدند.

[1] *X-Ray Diffraction*
[2] *Transmission* electron microscope
[3] *Ethylenediaminetetraacetic acid*
[4] 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
[5] *Phosphate buffered saline*
[6] *Dimethyl sulfoxide*
[7] *Propidium iodide*

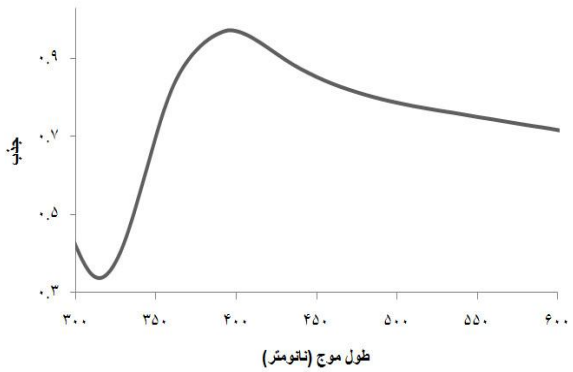
یافته‌ها

برای اثبات سنتز نانوذرّات نقره با روش احیای شیمیایی، طیف جذبی UV-Visible از نمونه سنتزشده تهیه شد. یکی از جالب‌ترین ویژگی نانوذرّات فلزی، خواص نوری آنها بوده که متناسب با شکل و اندازه نانوذرّات تغییر می‌کند. در نانوذرّات فلزی، تشدید پلاسمون سطحی (surface Plasmon resonance)، مسئول خواص نوری منحصر به فرد آنهاست که در اثر فاکتورهایی از قبیل: اندازه نانوذرّات، شکل نانوذرّات، فاصله آنها از یکدیگر و ضریب شکست پیرامون تغییر می‌کند (14).

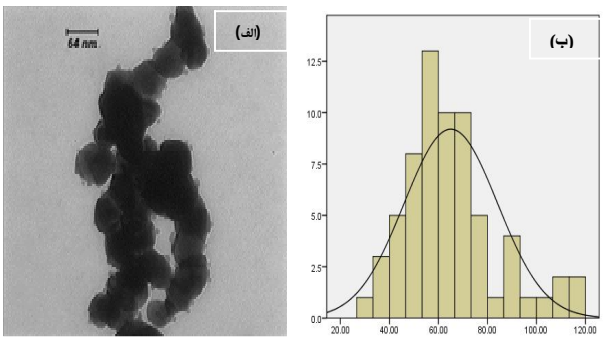
به‌منظور تهیه طیف جذبی، نمونه در اتانول پراکنده شد. همانطور که در نمودار 1 نشان داده شده است، نانوذرّه نقره سنتزشده، دارای پیک جذبی ناشی از پلاسمون سطحی در 408 نانومتر بود. به‌منظور بررسی اندازه و موفولوژی نانوذرّات سنتزشده، تصویر TEM تهیه شد. همانطور که در نمودار 2 نشان داده شده است، نانوذرّات به‌طور عمده مکعبی شکل بوده و بر اساس نمودار توزیع اندازه نانوذرّات، میانگین قطر آنها 65/5 نانومتر محاسبه گردید.

به‌منظور تأیید و بررسی ساختار کریستالی نانوذرّات سنتزشده، از آزمون پراش پرتو ایکس (XRD) استفاده شد. نتایج مربوط به پراش پرتو ایکس نمونه سنتزشده در نمودار 3 نشان داده شده است. الگوی پراش پرتوی ایکس بیانگر تشکیل نانوذرّات نقره بود که با نمونه استاندارد JCPDS 01-087-0598 قابل مقایسه می‌باشد. اندیس‌های میلر در سطوح 111، 200، 220 و 311 که به‌ترتیب مربوط به زاویه‌های 2θ در موقعیت‌های 38/099، 44/077، 64/44 و77/60 می‌باشند، وجود نانوکریستال های نقره را در مخلوط واکنش نشان می‌دهند. اندازه کریستال‌ها در نمونه سنتزشده، با استفاده از معادله شرر محاسبه شد. معادله شرر

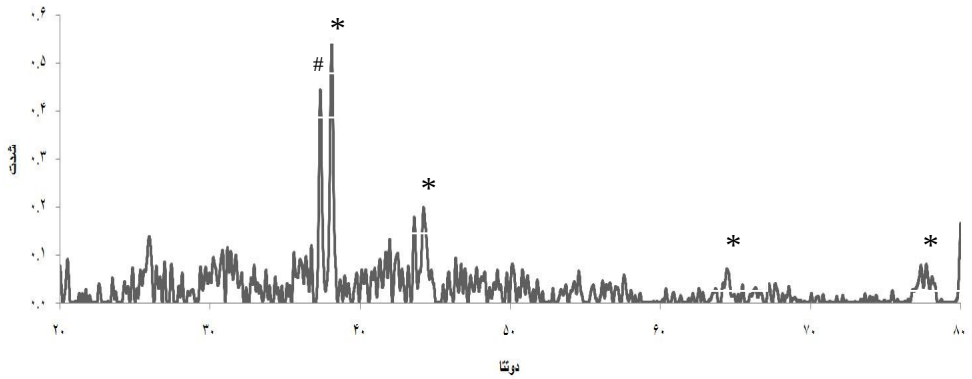
$d=k\lambda/\beta\cos\theta$ (رابطه 1)



نمودار 1- طیف جذب UV-Visible نانوذرّات نقره



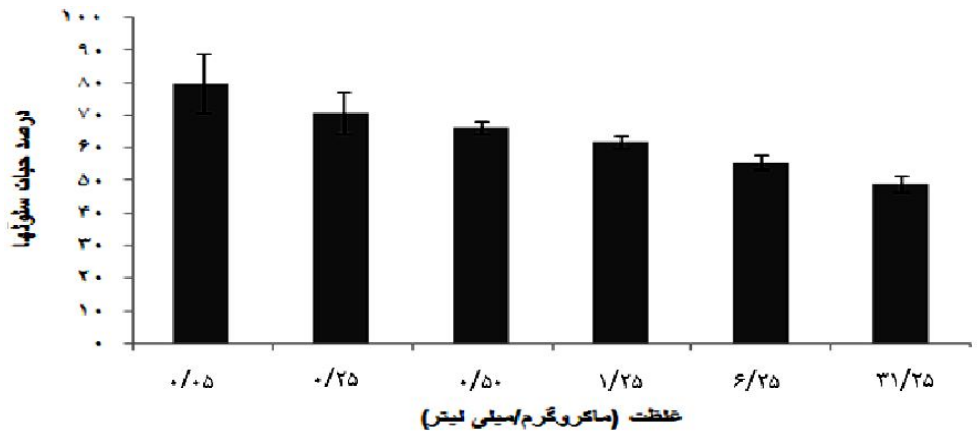
نمودار 2- (الف): تصویر TEM نانوذرّات نقره، (ب): نمودار توزیع اندازه ذرّات



نمودار 3- الگوی پراش پرتوی ایکس نانوذرّات. (*): پیک‌های مربوط به نانوذرّات نقره، (#): پیک ناشناخته

که وابستگی اندازه ذرّات به گستردگی و پهن‌شدن خطوط پراش را نشان می‌دهد، در رابطه یک نشان داده شده است. در این معادله، d سایز کریستالیت‌ها بر حسب نانومتر، λ طول موج بر حسب انگستروم، θ زاویه پراش، β پهنای پرتو در نصف شدت پرتوافکنی ماکزیمم (برحسب رادیان) است. بر این اساس اندازه کریستال‌ها در نمونه‌های سنتزشده، 55نانومتر برای نانوذرّه نقره بود.

به‌منظور بررسی اثرات سمّی نانوذرّه بر سلول‌های سرطان استخوان، از آزمون MTT استفاده شد. بدین منظور سلول‌ها با غلظت‌های مختلف (31/25-0/05 ماکروگرم/میلی‌لیتر) نانوذرّه تیمار شدند و پس از 48 ساعت حیات، سلول‌های تیمارشده مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج سنجش توان زیستی سلول‌ها بر اساس روش رنگ‌سنجی در نمودار 4 ارائه شده است. نتایج نشان داد که نانوذرّات نقره در یک روند وابسته به غلظت، باعث کاهش رشد سلول‌های سرطان استخوان شد؛ به‌طوری که در غلظت 21/1 ماکروگرم بر میلی‌لیتر، 50درصد سلول‌ها از بین رفت. تصاویر میکروسکوپ فازکنتراست سلول‌های تیمارشده با غلظت 21/1 ماکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرّه در شکل 2، حکایت از کاهش رشد سلول‌ها به‌همراه تغییر در شکل ظاهری آنها دارد؛ به‌طوری که برخی از سلول‌ها از کف ظرف کشت جدا شده و مورفولوژی سلول‌های مرده را نشان دادند.

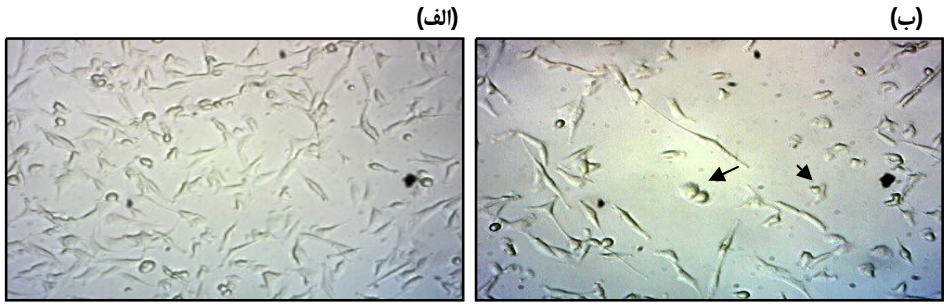


نمودار 4- سنجش توان زیستی سلول‌های تیمارشده با غلظت‌های مختلف نانوذرّه بر اساس آزمون MTT

جدول 1- محاسبه P-value برای داده‌های حاصل از آزمون MTT.

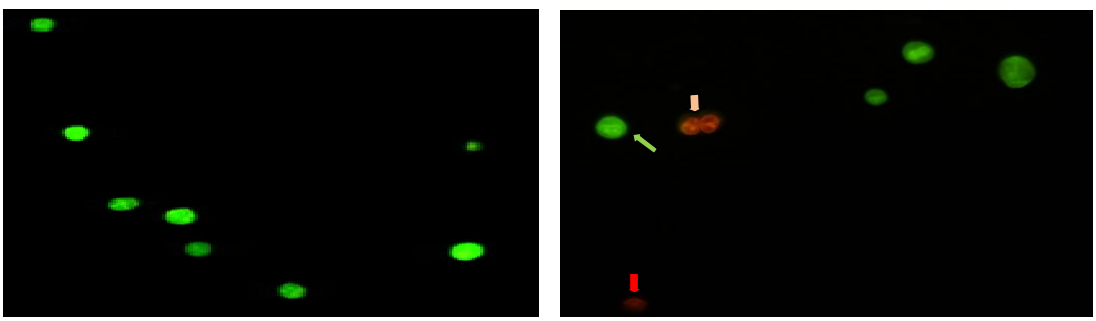
غلظت (ماکروگرم/میلی لیتر)	0/05	0/25	0/5	1/25	6/25	31/25
0/05		NS	NS	0/008	0/001	0/00
0/25			NS	NS	0/026	0/002
0/5				NS	NS	0/01
1/25						NS
6/25						NS
31/25						

P0/05> معنادار در نظر گرفته شده است. (NS: بدون معنا)

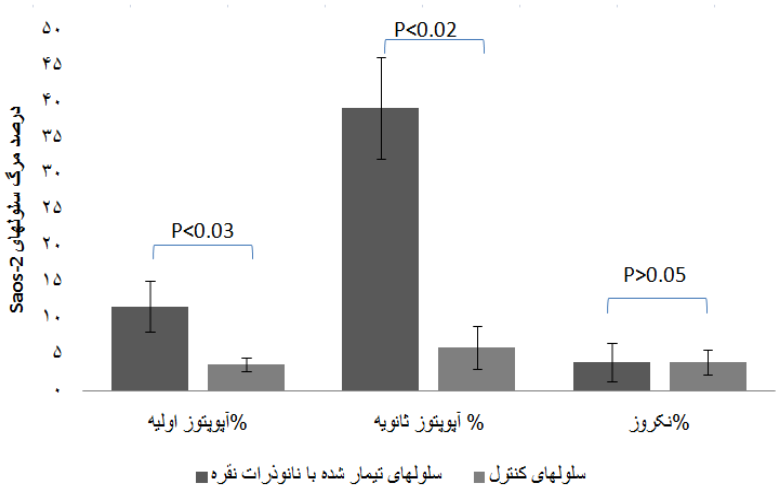


شکل 2- تصاویر میکروسکوپ فازکنتراست (الف) سلول‌های کنترل (ب) سلول‌های تیمارشده با نانوذرّات نقره. فلش‌های سیاه نشان‌دهنده سلول‌های مرده می‌باشد.

به‌منظور بررسی مرگ القاشده در سلول‌ها توسط نانوذرّات نقره، سلول‌های کنترل و تیمارشده، با استفاده از رنگ اتیدیوم برماید-اکریدین ارنج رنگ‌آمیزی شدند. لازم به ذکر است که آکریدین ارنج ((Acridine orange(AO)، یک رنگ حیاتی است که به DNA سلول‌ها و با تمایل کمتر به RNA متصل می‌شود. اتیدیوم بروماید ((Ethidium bromide (EtBr) فقط سلول‌هایی را رنگ می‌کند که تمام غشای خود را از دست داده باشند. سلول‌های زنده به‌دنبال رنگ‌آمیزی با AO، رنگ سبز یکنواخت می‌گیرند. همچنین سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپوپتوز هستند (early apoptotic)، رنگ سبز به خود می‌گیرند و دارای نقاط روشن سبز در هسته هستند که متراکم‌شدن کروماتین و قطعه‌قطعه‌شدن هسته را نشان می‌دهند. سلول‌هایی که در مراحل آخر آپوپتوز می‌باشند (late apoptotic) رنگ اتیدیوم بروماید را از خود عبور می‌دهند و بدین ترتیب رنگ نارنجی می‌گیرند. در مقایسه با سلول‌های آپوپتوز ثانویه که متراکم‌شدن کروماتین و قطعه‌قطعه‌شدن هسته را نشان می‌دهند، سلول‌های نکروزشده (necrotic) نیز به رنگ نارنجی در می‌آیند؛ با این تفاوت که کروماتین آنها متراکم و قطعه‌قطعه نمی‌شود (شکل 3). بر این اساس در سلول‌های تیمار شده، 10/7 درصد سلول‌ها دچار آپوپتوز اولیه و 39/3 درصد سلول‌ها دچار آپوپتوز ثانویه شدند. درصد سلول‌های نکروز شده 4درصد بود که نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود (نمودار 5).

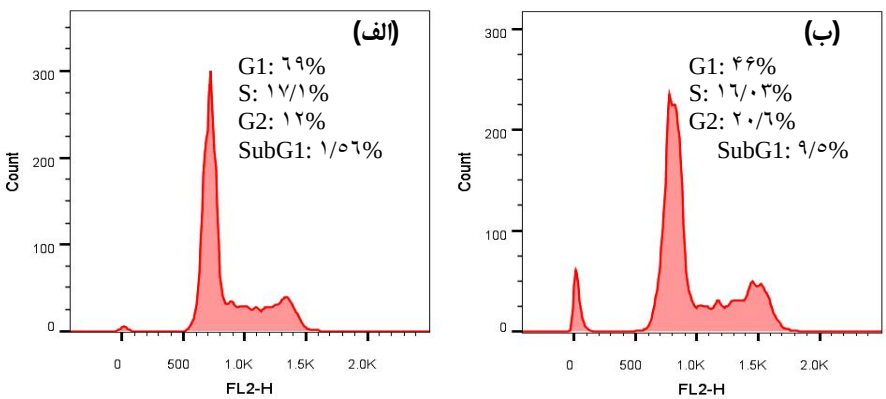


شکل 3- تصاویر میکروسکوپ فلورسانس سلول‌های رنگ‌شده با Ao/EtBr. (الف) سلول‌های کنترل (ب) سلول‌های تیمارشده با نانوذرّات نقره. فلش سبز نشان‌دهنده آپوپتوز اولیه، فلش نارنجی نشان‌دهنده آپوپتوز ثانویه و فلش قرمز نشان‌دهنده نکروز است.

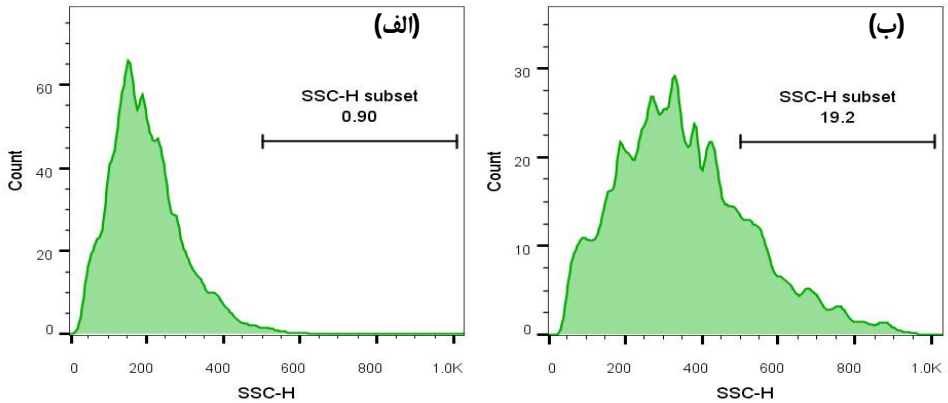


نمودار 5- درصد انواع مرگ سلولی در سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمارشده با نانوذرّات نقره براساس رنگ‌آمیزی Ao/EtBr

همچنین سیکل سلولی در سلول‌های تیمارشده با نانوذرّات، با استفاده از رنگ فلورسانس PI و دستگاه فلوسایتومتری، مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که هیستوگرام‌های مربوطه در نمودار 6 نشان می‌دهد، جمعیت سلولی در فاز G2 در نمونه تیمارشده بیشتر از نمونه کنترل می‌باشد که حاکی از توقف سیکل سلولی در فاز G2 است. همچنین به‌طور مشابه با نتایج رنگ‌آمیزی سلول‌ها با AO-EtBr، درصد سلول‌های Sub-G1 که معادل سلول‌های مرده با مرگ آپوپتوز می‌باشد، در سلول‌های تیمارشده با نانوذرّات نقره، افزایش یافت. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که اثرات بیولوژیکی نانوذرّات، ناشی از ورود آنها به درون سلول و تغییر و تنظیم مسیرهای سیگنالینگ درون سلول می‌باشد (15، 16، 17). بنابراین در پاسخ به این سؤال که آیا اثر نانوذرّه نقره در کاهش رشد و القای آپوپتوز به‌دنبال جذب نانوذرّات به درون سلول می‌باشد یا خیر؟ میزان گرانولولیتی سلول‌های تیمارشده با نانوذرّات، با بررسی پارامتر تفرق جانبی نور (Side-Scatter light (SSC)) با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در نمودار 7 مشاهده می‌شود، در سلول‌های تیمارشده با نانوذرّات نقره، میزان گرانولیتی سلول‌ها افزایش پیدا کرد که این ناشی از ورود نانوذرّات به درون سلول بود.



نمودار 6- بررسی سیکل سلولی در (الف) سلول‌های کنترل (ب) سلول‌های تیمارشده با نانوذرّات نقره با استفاده از رنگ فلورسانس PI.



نمودار 7- بررسی میزان ورود نانوذرّات نقره به درون سلول‌های Saos-2. میزان تفرق جانبی نور (SSC) در (الف) سلول‌های کنترل و (ب) سلول‌های تیمارشده با نانوذرّات نقره

بحث

استئوسارکوما یا سرطان استخوان، در سنین شیرخوارگی تا سالمندی می‌تواند در فرد ایجاد شود که سبب قطع عضو یا مرگ فرد مبتلا می‌شود. علاوه بر جراحی و استفاده از داروهای شیمی‌درمانی، امروزه یکی از روش‌های جدید و مطرح برای درمان سرطان، استفاده از نانوذرّات می‌باشد (18). در این مطالعه، کاهش رشد و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان استخوان توسط نانوذرّه نقره سنتزشده به روش احیای شیمیایی، مورد بررسی قرار گرفت.

تاکنون احیاکننده‌های مختلفی از جمله: آنیلین، گلوکز و غیره برای سنتز نانوذرّات نقره استفاده شده است. براساس پیک جذبی ناشی از پلاسمون سطحی، این‌طور به نظر می‌رسد که نانوذرّات نقره‌ای که از احیاکننده $NaBH_4$ برای سنتز آنها استفاده می‌شود، در طول موج‌های کوتاه‌تری در مقایسه با دیگر احیاکننده‌ها پیک می‌دهند که حاکی از کوچک‌تربودن اندازه نانوذرّات می‌باشد (19،20). به‌طور مشابه با گزارشات قبلی، نانوذرّات سنتزشده در این مطالعه مکعبی‌شکل بوده و با توجه به طیف حاصل از پراش پرتو ایکس، نمونه‌های سنتزشده از خلوص بالایی برخوردار بودند (7، 10). در طیف پراش پرتوی ایکس، یک پیک ناشناخته که مربوط به نانوذرّات نقره نبود مشاهده شد. با توجه به اینکه این طیف، از نانوذرّات پراکنده‌شده در محلول پروپانول تهیه شد، احتمالاً این پیک مربوط به حلال باشد.

در این مطالعه، همچنین اثرات نانوذرّات نقره بر حیات سلول‌ها، سیکل سلولی و مرگ سلول‌های سرطان استخوان Saos-2 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که نانوذرّات نقره در یک روند وابسته به غلظت، باعث مرگ سلول‌های سرطانی می‌شوند. به‌طور مشابه Jacob و همکاران در سال 2011 اثر سمیّت بسیارزیاد نانوذرّات نقره بر حیات رده سلولی HEP-2 (سلول‌های سرطان حنجره) را بررسی کردند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که نانوذرّات در غلظت 31/25 ماکروگرم/میلی‌لیتر باعث 50درصد مرگ سلولی می‌شوند (21). همچنین بررسی‌ها بر روی رده سلولی LoVo (سرطان کلون) نشان داد که نانوذرّه نقره قادر به مهار رشد این رده سلولی می‌باشد (22).

نتایج فلوسایتومتری نشان داد که مهار رشد سلول‌ها به‌دنبال توقف سیکل سلولی در فاز G2 چرخه سلولی اتفاق افتاد. گزارش‌های متفاوتی از اثرات نانوذرّات نقره بر سیکل سلولی وجود دارد. به‌عنوان مثال، در مطالعه Sanpui و همکاران نانوذرّات نقره پوشش‌یافته با چیتوزان، باعث توقف سیکل سلولی در فاز G2 شد (23)؛ در حالی که در مطالعه Liu و همکاران، اثر نانوذرّه نقره بر سلول‌های سرطان کبد و

سلول‌های نرمال فیبروبلاستی، باعث توقف سیکل سلولی در فاز S چرخه سلولی شد که احتمالاً به‌دلیل تفاوت در محتوای ملکول‌های سیگنالینگ در سلول‌های مختلف می‌باشد (7). براساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، این‌طور به‌نظر می‌رسد که پس از تیمار سلول‌ها با نانوذرّات نقره، این نانوذرّات وارد سلول سرطانی می‌شوند و احتمالاً به‌طور مستقیم بر ملکول‌های سیگنالینگ و یا DNA سلول اثر می‌گذارند.

همچنین داده‌های حاصل از رنگ‌آمیزی Ao/EtBr و فلوسایتومتری در مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌ها پس از مهار چرخه سلولی، در فاز G2 با مرگ آپوپتوز از بین می‌روند. القای آپوپتوز توسط نانوذرّات نقره تاکنون در سلول‌های مختلفی گزارش شده است؛ به‌عنوان مثال، تاکنون وقوع آپوپتوز در سلول‌های سرطان شش و موارد بسیار دیگری گزارش شده است (7، 9، 23). از آنجایی که اختلال در فرآیند آپوپتوز، عامل بسیار مهمی در ایجاد سرطان و گسترش آن به‌شمار می‌رود و مقاومت به آپوپتوز از دلایل اصلی مقاومت دارویی سلول‌های سرطانی در برابر شیمی‌درمانی است، اثر نانوذرّات نقره از این جنبه حائز اهمیت می‌باشد.

بر اساس مطالعاتی که تاکنون انجام شده است، یکی از دلایل ایجاد آپوپتوز در سلول‌های تیمارشده با نانوذرّات نقره، کاهش میزان ATP درون سلول به‌دنبال اختلال در سنتز و عملکرد کمپلکس‌های درگیر در فسفریلاسیون اکسیداتیو سلولی در غشای داخلی میتوکندری می‌باشد. این مسئله اثبات شده است که کاهش میزان ATP درون سلول از یک حدّ آستانه مشخص، منجر به مرگ آپوپتوز سلول می‌شود؛ درحالی که کاهش ناگهانی ATP درون سلول، منجر به مرگ نکروز می‌شود (24، 25). علاوه بر این، مطالعات ژنتیکی نشان داده است که میزان بیان پروتئین‌های مهم در مسیر آپوپتوز از جمله سیتوکروم c و نیز کاسپاز 3، تحت تأثیر نانوذرّه نقره افزایش بیان پیدا می‌کنند. به‌دنبال اختلالی که در غشای میتوکندری پس از تیمار با نانوذرّات نقره ایجاد می‌شود، سیتوکروم c از میتوکندری به‌داخل سیتوپلاسم رها شده که این مسئله خود باعث فعال‌شدن کاسپاز 3 و به‌دنبال آن القای آپوپتوز می‌شود (25).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد، سنتز نانوذرّه نقره به‌روش احیای شیمیایی با استفاده $NaBH_4$، می‌تواند روش مناسبی برای سنتز نانوذرّاتی با اندازه کوچک و خلوص بالا باشد. علاوه بر این، نانوذرّه نقره می‌تواند سبب مهار رشد و القای آپوپتوز پس از توقف سیکل سلولی در مرحله G2/M در سلول‌های سرطان استخوان شود. بنابراین این نانوذرّات می‌توانند به‌عنوان یک گزینه درمانی برای درمان این نوع سرطان مطرح باشند؛ هرچند که مطالعات بیشتری بر روی مکانسیم عمل این نانوذرّات در ارتباط با خواص ضدّ سرطانی آنها در شرایط *in vitro* و *in vivo* بایستی صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بر اساس طرح تحقیقاتی تصویب‌شده با کد 3/39916، با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا گردید.

منابع:

1- Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunthan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. Int J Mol Sci. 2016; 17(9): pii: E1534.

2- Chen J, Li S, Luo J, Wang R, Ding W. Enhancement of the antibacterial activity of silver nanoparticles against phytopathogenic bacterium Ralstonia Solanacearum by stabilization. J Nanomater. 2016; 2016: ID 7135852.

3- Tran QH, Nguyen VQ, Le AT. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol. 2013; 4(3):033001.

4- Hu XC, Zhang J, Xu BH, Cai L, Ragaz J, Wang ZH, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus paclitaxel plus gemcitabine as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (CBCSG006): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2015; 16(4): 436-46.

5- Ong C, Lim JZ, Ng CT, Li JJ, Yung LY, Bay BH. Silver nanoparticles in cancer: therapeutic efficacy and toxicity. Curr Med Chem. 2013; 20(6): 772-81.

6- Guo D, Zhang J, Huang Z, Jiang S, Gu N. Colloidal silver nanoparticles improve anti-leukemic drug efficacy via amplification of oxidative stress. Colloids Surf B Biointerfaces. 2015; 126:198-203.

7- Liu W, Wu Y, Wang C, Li HC, Wang T, Liao CY, et al. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. Nanotoxicology. 2010; 4(3): 319-30.

8- Prasad RY, McGee JK, Killius MG, Suarez DA, Blackman CF, DeMarini DM, et al. Investigating oxidative stress and in?ammatory responses elicited by silver nanoparticles using high-throughput reporter genes in HepG2 cells: Effect of size, surface coating, and intracellular uptake. Toxicol in Vitro. 2013; 27(6): 2013-21.

9- Foldbjerg R, Dang DA, Autrup H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. Arch Toxicol. 2011; 85(7):743-50.

10- Avalosa A, Hazaa AI, Mateoa D, Moralesa P. Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells. J Appl Toxicol. 2014; 34(4): 413-23.

11- Jannathul Firdhouse M, Lalitha P. Apoptotic efficacy of biogenic silver nanoparticles on human breast cancer MCF-7 cell lines. Prog Biomater. 2015; 4: 113-21.

12- Gurunathan S, Raman J, Abd Malek SN, John PA, Vikineswary S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: a potential cytotoxic agent against breast cancer cells. Int J Nanomedicine. 2013; 8: 4399-413.

13- Rutberg FG, Dubina MV, Kolikov VA, Moiseenko FV, Ignateva EV, Volkov NM, et al. Effect of silver oxide nanoparticles on tumor growth in vivo. Dokl Biochem Biophys. 2008; 421: 191-3.

14- Lee KC, Lin SJ, Lin CH, Tsai CS, Lu YJ. Size effect of Ag nanoparticles on surface plasmon resonance. Surf Coat Technol. 2008; 202 (22-23): 5339-42.

15- Kafshgari MH, Harding FJ, Voelcker NH. Insights into cellular uptake of nanoparticles. Curr Drug Deliv. 2015; 12(1): 63-77.

16- Slowing I, Trewyn BG, Lin VS. Effect of surface functionalization of MCM-41-Type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells. J Am Chem Soc. 2006; 128(46): 14792-3.

17- Li Y, Monteiro-Riviere NA. Mechanisms of cell uptake, inflammatory potential and protein corona effects with gold nanoparticles. Nanomedicine (lond). 2016; 11(24): 3185-3203.

18- Luetke A, Meyers PA, Lewis I, Juergens H. Osteosarcoma treatment – Where do we stand? A state of the art review. Cancer Treat Rev. 2014; 40(4): 523-32.

19- Dey J, Biswas K, Thapa U, Joshi S, Kharbangar SI, Sultana N, Ismail K. Facile synthesis of silver nanoparticles and their synergistic antibacterial activity in combination with commercial antibiotics. Bull Chem Soc Jpn. 2015; 88(2): 352-7.

20- Li X, Shen J, Du A, Zhang Z, Gao G, Yang H, et al. Facile synthesis of silver nanoparticles with high concentration via a CTAB-induced silver mirror reaction. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp. 2012; 400: 73-9.

21- 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 Surf B Biointerfaces. 2012; 91: 212-4.

22- Miethling-Graff R, Rumpker R, Richter M, Verano-Braga T, Kjeldsen F, Brewer J, et al. Exposure to silver nanoparticles induces size- and dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. Toxicol in Vitro. 2014; 28(7): 1280-9.

23- Sanpui P, Chattopadhyay A, Ghosh SS. Induction of apoptosis in cancer cells at low silver nanoparticle concentrations using chitosan nanocarrier. ACS Appl Mater Interfaces. 2011; 3(2): 218-28.

24- Tsujimoto Y. Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. Cell Death Differ. 1997; 4(6): 429-34.

25- Ma J, Lü, Huang Y. Genomic analysis of cytotoxicity response to nanosilver in human dermal fibroblasts. J Biomed Nanotechnol. 2011; 7(2): 263-75.