مقاله پژوهشی

تاثیر نانوذرات نقره بر زیست‌پذیری رده سلولی فیبروبلاست ریه (*MRC-5*)

یاسمن دستگیر[۱]، زهراکشتمند[۱*]، کتایون برهانی [۲]

۱- گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- گروه مهندسی محیط زیست و صنایع غذایی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[*]مسئول مکاتبات: zkeshtmand2001@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۰٤

چکیده

نانوذرات نقره (AgNPs) با دارا بودن خواص ضدمیکروبی و ضدتکثیری بسیار قوی، کاربرد زیادی در علوم پزشکی دارند، با وجود این، اطلاعات اندکی در رابطه با تاثیر آن‌ها بر سلول‌های سالم وجود دارد و مواردی مبنی بر سمیت آن‌ها گزارش شده‌است. این تحقیق با هدف بررسی تاثیر نانوذرات نقره بر درصد زیست پذیری رده سلولی *MRC-5* انجام‌گرفت. در این مطالعه تجربی، در طی ٢٤، ٤٨ و ٧٢ساعت، غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (١/٥٦، ٣/١٢٥، ٦/٢٥، ١٢/٥، ٢٥، ٥٠ و ١٠٠ میکروگرم بر میلی-لیتر) بر رده سلولی *MRC-5* با روش MTT بررسی شد. داده‌های حاصل، با استفاده از نرم‌افزار SPSS، آزمون آماری ANOVA یک طرفه، تست توکی ارزیابی شد. تیمار سلول‌های نرمال *MRC-5* با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بعداز ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت با روش MTT، کاهش معنی‌دار بقاء سلول‌ها را در غلظت‌های ٢٥، ٥٠ و ١٠٠ میکروگرم برمیلی لیتر را نشان داد ($p < ٠/٠٥$) نتایج این بررسی نشان داد که نانوذرات نقره بر سلول‌های نرمال *MRC-5* به صورت وابسته به دوز اثر مهاری دارد.

کلمات کلیدی: نانوذرات نقره، زیست پذیری، MTT، *MRC-5*

مقدمه

امروزه با پیشرفت‌های صورت‌گرفته در علم نانوبیوتکنولوژی و روش‌های مختلف تهیه نانوذرات، استفاده از آن‌ها در زمینه‌های مختلف زیستی و پزشکی گسترش یافته است (١١). از کاربردهای ارزشمند نانوذرات در علوم پزشکی می‌توان به اثرات ضدسرطانی، ضدمیکروبی (١٨)، کاتالیست، نشان‌دار-کردن مولکول‌های زیستی، استفاده از آن‌ها در دستگاه-های مختلف پزشکی و حس‌گرهای‌زیستی اشاره کرد (١٠، ١٩). هم‌چنین از نانوذرات، در دارورسانی اختصاصی به سلول‌ها یا ارگان‌های خاص و درمان بسیاری از بیماری‌هایی که نیازمند غلظت ثابت دارو در خون هستند استفاده می‌شود (٧، ١٢).

اندازه کوچک نانوذرات (١ تا ١٠٠ نانومتر)، سطح تماس آن‌ها را افزایش داده و خاصیت ضدمیکروبی و تاثیرگذاری آن‌ها بر سلول‌ها را تا بیش از ٩٩ درصد در مقایسه با ذرات بزرگتر ارتقا می‌بخشد (٦، ٨).

به کارگیری نانوذرات به دلیل اندازه کوچک، برای رساندن، هدف‌گیری عوامل تشخیصی و دارویی در پروژه‌های پزشکی به خصوص در زمینه سرطان بسیار مورد توجه قرارگرفته است (١٥). از این رو، درحال حاضر، بسیاری از نانوذرات، در انتقال دارو به صورت

هدف‌مند به سلول‌های توموری بدخیم با کاهش سمیت سیستمیک ناشی از داروهای ضدسرطانی به خدمت گرفته‌شده‌اند (۷، ۱۱). بنابراین، بزرگترین چالش در گسترش و استفاده از داروهای سرطانی، رساندن آن‌ها به بافت‌های بیمار بدون مسموم نمودن کل بدن است.

از میان انواع متنوع نانوذرات، نقره، به دلیل دارا بودن ویژگی‌هایی‌مانند: پایداری، هدایت و خاصیت ضد-میکروبی و ضدسرطانی توجه بیشترمحققان را به خود جلب کرده است (۱۸، ۲۱).

برخی از مکانیسم‌های عملکردی نقره برسلول شامل: القا آپوپتوز، افزایش ترکیبات استرس اکسیداتیو، از بین بردن غشا اطراف سلول، افزایش نشت لاکتات-دهیدروژناز، فعال‌سازی گونه‌های‌اکسیژن واکنشی، تعدیل مولکول‌های مختلف سیگنالینگ، اختلال در شبکه ارتباطی سلولی و ایجاد آسیب در DNA است که، فعال شدن هر یک از این مسیرها در نهایت مانع از بقا سلول و تکثیر سیگنال مرگ در سلول می‌شود (۹، ۲۲).

امروزه نانوذرات نقره به عنوان محصولی مهم در نانوبیوتکنولوژی، کاندیدایی ویژه، برای رساندن بسیاری از مولکول‌های دارویی کوچک یا بیومولکول-های بزرگ از قبیل RNA، DNA و پروتیین‌ها به بافت و اندام هدف است (۸).

از آنجایی که، بسیاری از نانوذرات سنتز شده به روش شیمیایی از ترکیبات آلوده کننده‌ای که قدرت تجزیه-پذیری مناسب در شرایط زیستی ندارند تهیه می‌شوند و اثرات طولانی مدت آن‌ها مورد مطالعه قرارنگرفته است. بنابراین، توجه به تعیین غلظت موثر و مناسب ترکیبات درمانی واز سویی تحویل اختصاصی دارو با کمک نانوذرات به بافت‌سرطانی و کم‌نمودن عوارض جانبی آن بر سلول‌های سالم دارای اهمیت بوده و ضروری است (۱۵).

در تعدادی از پژوهش‌ها، تغییر در ساختار وعملکرد سلول‌سرطانی در مقایسه با سلول سالم گزارش شده است (۳، ۹). این درحالیست که پاسخ این دو سلول در برابر مواد مختلف از جمله نانوذرات می‌تواند متفاوت باشد.

یکی از رده‌های سلولی نرمال مورد استفاده در پژوهش های مرتبط با کشت سلولی *MRC-5* /ست که، اولین بار در سال ۱۹۷۰ با استفاده از فناوری هایفلیک، درمرکز تحقیقات پزشکی در انگلستان از سلول‌های جنینی ریه استخراج و شناسایی شد. این رده سلولی، سلول‌های دیپلوئیدی فیبروبلاست بافت نرمال ریه انسان است که جهت تحقیقات سلولی به ویژه بررسی تاثیر ترکیبات مختلف، کشت و نگهداری می‌شوند (۱۰) که در این مطالعه نیز استفاده شد.

با وجود نقش ارزشمند نانوذرات نقره در علوم پزشکی و دارویی، مطالعات اندکی در مورد اثرات سمی این ترکیبات بر سلول‌های سالم انجام شده، از این رو، در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف نانو-ذرات نقره بر زیست‌پذیری سلول‌های نرمال فیبروبلاست ریه (*MRC-5*) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه رده سلولی کشت: در این مطالعه تجربی، رده سلولی *MRC-5*از بانک‌سلولی انستیتوپاستورتهیه گردید. سلول‌های این رده سلولی در محیط کشت RPMI ۱٦٤۰ حاوی۱۰درصد سرم جنین گاوی(Fetal Bovine Serum: FBS)، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (Gibco, USA) کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای۳۷-درجه سانتی‌گراد و فشار۵ درصد CO_2 نگهداری شدند (۱٦).

تهیه نانو ذرات نقره و تیمار رده سلولی *MRC-5*: نانوذرات نقره با ابعاد زیر ۱۰۰ نانومتر، با خلوص ۹۹

درصد از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان خریداری شد. رده سلولی *MRC-5* به گروه کنترل وگروه‌های تحت تاثیرغلظت‌های مختلف نانوذرات نقره تقسیم بندی شدند.

بررسی تاثیر نانوذرات نقره بر قدرت زنده مانی رده سلولی *MRC-5* با روش MTT: برای انجام آزمایش، حجم ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سلول MRC-5 (حدود 10^4 سلول) به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۸ درصد و فشار دی اکسید کربن ۵٪) محیط کشت روئی تخلیه گردید. سپس،غلظت‌های‌مختلف۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵ ،۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات نقره تجاری، در طی مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در محیط‌کشت در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه، روی سلول‌ها اثر داده شد (۱۵).

به منظور بررسی اثر نانوذرات نقره تجاری بر قدرت زیست‌پذیری سلول‌های نرمال از کیت MTT (سیگما، آلمان) استفاده گردید. در ادامه، به هر خانه پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر رنگ MTT، با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم برمیلی-لیتراضافه و به مدت چهار ساعت در انکوباتور دارای CO_2 و در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد انکوبه‌شد. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر، محیط کشت حاوی MTT به دقت خارج شده و به هر خانه پلیت، جهت حل نمودن کریستال‌های فرمازان ارغوانی رنگ، حجم۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) (مرک، آلمان) اضافه گردید. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه انکوباسیون، جذب نوری هر چاهک با دستگاه الایزا (Awareness Technology, Inc., Palm USA City, FL,) در طول موج۵۷۰ نانومتر خوانده شد (۲).

تست MTT در این مطالعه سه بار تکرار و درصد قدرت بقای سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد میزان بقای سلول} = \frac{\text{میانگین نوری جذب تست}}{\text{جذب نوری کنترل}} \times 100$$

MTT (۳ (۴،۵ دی متیل تیازول) ۲،۵ دی فنیل بروماید تترازولیوم)،تست متابولیک رقابتی میتوکندریایی دقیق، با حساسیت بالا با امکان تکرارپذیری بدون از دست-دادن سلول می‌باشد. اساس این روش برمبنای شکستن نمک تترازولیوم توسط سوکسینات دهیدروژناز (آنزیم میتوکندریایی) است (۱۶).

آنالیز آماری داده‌ها: توزیع طبیعی داده‌ها توسط آزمون کولوموگروف-اسمیرنوف صورت‌گرفته است. تحلیل و تفسیر داده‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 19 و آزمون آماری واریانس یک طرفه صورت گرفت. نتایج بر اساس میانگین ± انحراف معیار و اختلاف معنادار بین گروه‌ها $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

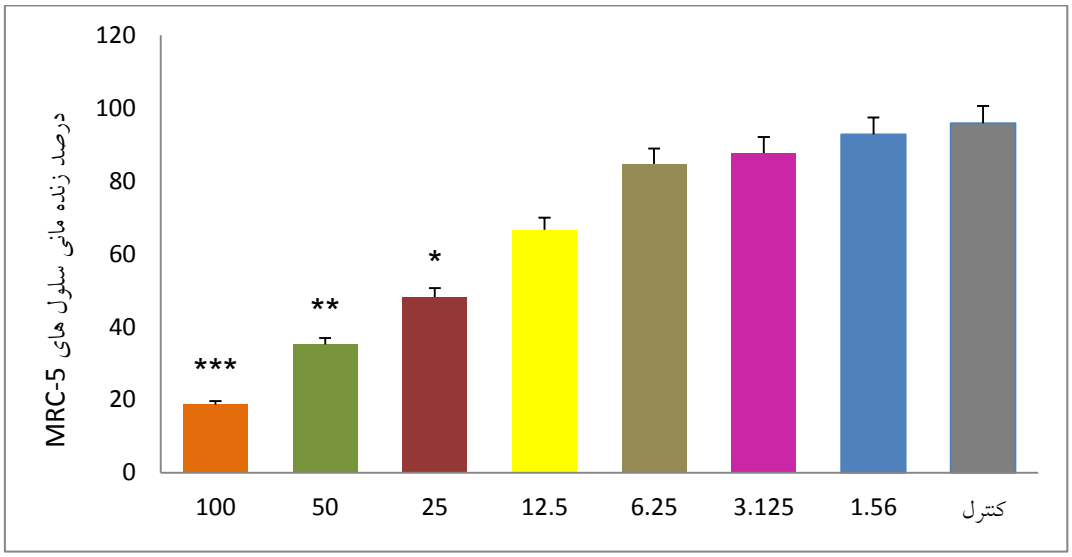
نتایج

تیمار سلول‌های نرمال فیبروبلاست ریه (*MRC-5*) با غلظت‌های مختلف ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۵/، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی-لیتر کاهش معنی‌دار بقای‌سلولی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. چنانچه در نمودار ۱ و جدول۱ نشان داده شده است، کاهش درصد زنده ماندن سلول‌های نرمال *MRC-5* وابسته به غلظت نانوذرات نقره، می-باشد. بر اساس نتایج حاصل در هر سه مدت زمان ۲۴، ۴۸ و۷۲ساعت، نانوذرات نقره با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمترین میزان بقای سلولی ($p < ۰/۰۵$) و غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیشترین مهار بقای سلولی را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p <۰/۰۰۱$).

جدول ۱- مقایسه درصد زنده مانی سلول‌های نرمال فیبروباست ریه (*MRC-5*) درگروه‌های کنترل و تیمارشده با غلظت‌های متفاوت نانوذرات نقره در مدت زمان‌های ۲٤، ٤۸ و۷۲ ساعت.

زمان	کنترل	۱/۵٦µg/ml	۳/۱۳۵ µg/ml	٦/۲۵ µg/ml	۱۲/۵ µg/ml	۲۵ µg/ml	۵۰µg/ml	۱۰۰ µg/ml
۲٤ساعت	۹۵/۸۱±۱/۷۸	۹۲/۷٤±۲/۲۱	۸۷/٦۵±۰/۹	۸٤/٦۵±۱/۱۲	٦٦/٦۱±۱/۰۱	٤۸/۱۹±۰/۱۲ *	۳۵/۱۲±۰/۰۷ **	۱۸/٦۷±۰/۰۳ ***
٤۸ساعت	۹۵/۷۸±۱/۰۹	۹۱/۸۷±۱/۹۸	۸٦/٤۹±۱/۱٤	۸۱/٤۷±۰/۹٦	٦٤/۵٦±۱/۲۳	٤٦/۲۱±۰/۱۱ *	۳۲/۳۱±۰/۰۳ **	۱۳/۲۰±۰/۱ ***
۷۲ساعت	۹٤/۸۳±۱/۳٤	۹۱/۰۳±۱/٦۵	۸٦/۳٤±۱/۰٦	۸۰/۸۳±۱/۰۱	٦۳/۵٦±۰/۷۸	٤۵/۱٦±۰/۰٤ *	۳۱/۳۲±۰/۰۹ **	۱۳/۲۲±۰/۱٤ ***

مقادیر براساس میانگین± خطای انحراف معیار بیان شد. علامت * p <۰/۰۵ در مقایسه با گروه با کنترل. علامت** p <۰/۰۱ در مقایسه با گروه با کنترل. علامت*** p <۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه با کنترل.



نمودار ۱- مقایسه‌ی غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر درصد زیست مانی رده سلولی *MRC-5* در مدت زمان ۲٤ ساعت. مقادیر براساس میانگین± خطای انحراف معیار بیان شد.علامت * p <۰/۰۵ در مقایسه با گروه با کنترل. علامت** p <۰/۰۱ در مقایسه با گروه با کنترل. علامت*** p <۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه با کنترل.

بحث

تیمار رده سلولی نرمال *MRC-5* با غلظت‌های مختلف ۳/۱۲۵، ٦/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیترنانوذرات نقره با استفاده از تست MTT طی مدت ٤۸،۲٤ و۷۲ ساعت انجام شد. در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش معنی‌دار بقای سلول‌های تیمارشده در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید. نتایج نشان‌داد که نانوذرات نقره در غلظت۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین تاثیررا بر درصد بقا سلول‌ها داشته و از لحاظ آماری نسبت به گروه کنترل نتایج معنی‌داری را نشان داد (p <۰/۰۰۱). در حالی‌که کمترین میزان کشندگی سلول‌های تیمار-شده با نانوذرات‌نقره در غلظت ۲۵میکروگرم بر میلی-لیتر مشاهده شد.

در بررسی *Saraniya* و همکارانش پس از سنتز نانوذرات نقره از گیاه *Lactuca Ulva* با اندازه بین ۲۰ تا ۵٦ نانومتر، اثرات ضدتکثیری و کاهش درصد زنده‌مانی آن روی رده‌های سلول سرطانی کبد (*HepG-2*)، پستان (*MCF -7*)، کلون (*HT29*) و

سلول نرمال (*Vero*) گزارش شد (۱۷). نتایج مطالعه حاضر نیز تاثیر سمیت نانوذرات نقره برسلول نرمال فیبروبلاست ریه را نشان داده شد که همسو با این مطالعه می‌باشد.

رشمه زاد و همکاران در سال ۱۳۹۳، سمیت نانوذرات نقره تجاری و نانوذرات‌نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره برگ گیاه اکالیپتوس برردههای سلولی سرطانی‌معده (*AGS*) و فیبروبلاست‌ریه (*MRC-5*) را مورد بررسی قراردادند. نتایج این پژوهش نشان‌داد که اثر کشندگی سلول‌ها، به غلظت نانوذرات وابسته بوده و مقـدار IC50 محاسبه شده و برای نانوذرات تجاری بیـشتر از نانوذرات سنتز شده به روش زیستی در رده‌سلولی سرطانی(*AGS*) می-باشد. همچنین مقـدار IC50 برای نانوذرات تجاری و زیستی در رده‌ی‌سلولی نرمال(*MRC-5*) بیشتر از رده‌ی سلولی سرطانی (*AGS*) در طی۷۲ ساعت محاسبه شد (۱٤) که در این مطالعه نیز وابسته بودن درصد زیست‌پذیری سلول نرمال قیبروبلاست ریه(*MRC–5*) با غلظت نانوذرات نقره تجاری نشان‌داده‌شد.

صالح‌زاده و همکاران، سمیت نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک قرمز (*L.caspica*) بر سلول‌های رده سرطانی پستان (T47D) و سلول نرمال (MRC–5) با انجام آنالیز MTT در طی ۲٤ و ٤۸ نشان‌دادند، همچنین یافته‌های آن‌ها نشان‌داد که، این نانوذرات می‌توانند اثرات کشندگی وابسته به زمان و غلظت داشته باشند (۱٦). نتایج حاصل از تاثیر نانوذرات نقره بر سلول نرمال (MRC–5) این مطالعه، با پژوهش حاضر نیز هم‌خوانی دارد.

همچنین در پژوهش دیگر، تاثیر نانوذرات نقره بر سلول نرمال فیبروبلاست (P4) توسط Vieira و همکاران، در سال ۲۰۱٦ گزارش داده شد (۲۰).

نقطه نظر مشابه مطالعه ما با مطالعات انجام شده، تاثیر معنادار سمیت‌سلولی نانوذرات نقره بر سلول نرمال می‌باشد که با افزایش غلظت نانوذرات‌نقره، سمیت سلولی نیز افزایش می‌یابد. در واقع نتایج تحقیقات، بیان‌کننده این است که اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره وابسته به دوز می‌باشد.

کیم و همکاران براساس داده‌های حاصل از کارخود درسال ۲۰۱۱ گزارش دادند که سمیت سلولی القا شده توسط نانوذرات نقره به دلیل استرس‌اکسیداتیو حاصل از این یون‌ها می‌باشد که با تجمع در سیتوپلاسم و هسته‌ی سلول‌ها منجر به تولید رادیکال-های آزاد می‌شود (٤).

احتمالا کاهش قدرت بقا سلول توسط نانوذرات نقره به دلیل اثر آن‌ها بـر چرخه‌تنفس‌سـلول در میتوکندری می‌باشد. به‌طور کلی القاء مرگ‌برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی یکی از مکانیسم‌های مورد توجه در حوزه‌ی نانو به شمار می‌رود. مسیر مرگ‌سلولی می‌تواند شامل فعال‌سازی رویدادهای پروآپوپتوتیـک اندامک میتوکندری درسلول باشد که با آزادسازی سـیتوکروم c از آن آغـاز می‌شود. علاوه بر این اثرات نانوذرات نقره در افـزایش بیان ژن پروتئاز کاسپاز ۳ در سلول-های سرطانی و القاء مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی در مطالعات مختلف نشان‌داده‌شده‌است (٤،۵).

نتایج پژوهش‌ها نشان‌داده‌است که، اثرات مهاری نانوذرات زیستی و تجاری در رده ی سلولی سرطانی و نرمال قابل مشاهده بوده اما درصد کاهش زنده مانی درسلول‌های سرطانی درمقایسه با نرمال بیشتر است (۵، ۱٤). با توجه به این‌که در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های‌طبیعی، فرایند تنفس سلولی میتوکندریایی دارای فعالیت بیشتراست، و نانوذرات-نقره از طریق تاثیر بر این مسیر نیز عمل می‌کنند. بنابراین، شرایط تاثیرگذاری بیشتر نانوذرات نقره بر سلول‌های غیرطبیعی، در مقایسه با سلول سالم فراهم می‌شود. همچنین، به لحاظ مورفولوژی، اندازه منافذ در غشای سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های

سالم افزایش یافته، که ورود نانوذرات به داخل سلول-های سرطانی را با سهولت بیشتری ممکن می‌سازد، این تغییرات، بستر مناسب برای تاثیرگذاری بیشتر نانو ذرات نقره بر سلول‌های ناسالم نسبت به سلول‌های سالم را فراهم‌می‌کند (۱، ۵).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل ازاین تحقیق نشان‌می‌دهد، تاثیر غلظت-های مختلف نانوذرات نقره مورد مطالعه بر زنده‌مانی رده سلول نرمال *MRC-5*، به صورت وابسته به دوز - می‌باشد. احتمالا بتوان از یافته‌های این تحقیق همراه با بررسی‌های دقیق‌تر، در مطالعات پیش‌کلینیکی و کلینیکی مانند تعیین دقیق غلظت نانوذرات نقره جهت دارورسانی به سلول و یا عضو خاص و یا تاثیرآن‌ها به صورت همزمان بر سلول‌های سالم و غیرسالم بافت‌های مورد نظر، بهره‌مند شد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۸ با کد پایان‌نامه ۱۰۱۳۰۵۶۰۹۷۲۰۱۰ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی اجرا شده است.

منابع

1. Basavaraja S., Balaji S.D., Lagashetty A., Rajasab A.H., Venkataraman A., 2008. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. *Materials Research Bulletin Journal*, 43(5):1164-1170.

2. Faraha M.A., Alib M.A., Chen S.M., Li Y., Hemaid F.M., Aboutarboush F.M., 2016. Silver nanoparticles synthesized from *Adenium obesum* leaf extract induced DNA damage apoptosis and autophagy via generation of reactive oxygen species. *Colloids and Surfacce B: Biointerfaces*, 141:158-169.

3. Fock K.M.,2014. Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 40(3):250-260.

4. Kim S., Choi J.E., Choi J,Chung K.H., Park K, Yij J., et al.,2009. Oxidative Stress-Dependent Toxicity of Silver NanoparticlesIn Human Hepatoma Cells. *Journal of Toxicology In vitro*, 23(6):1076-1084.

5. Koyyati R., Nagati V., Ramchander M., Manthurpafigya P. 2013. Biological synthesis of silver nanoparticles using Raphanus sativus var. *Longipinnatus* leaf extract and evalution of their antioxidant and antibacterial activity. I*nternational Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences*, 3(4): 89-100.

6. Liesje S., Bart D., Paul V., Benny F., Pyck G. 2011.The Antibacterial Activity of Biogenic Silver and Its Mode of Action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* ,31(2):113-189.

7. Iiizumi M., Liu W., Pai S.K., Furuta E., Watabe K., 2008.Drug development against metastasisrelated genes and their pathways: a rationale for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1786(2): 87-104.

8. Liu J., Sonshine D.A., Shervani S., Hurt R.H. 2010. Controlled release of biologically active silver from nanosilver *surfaces. Journal of ACS Nano,* 4(11): 6903-6913.

9. Mao B.H.,Tsai J.C., Chen C.W., Yan S.J., Wang Y.J., 2016.Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy. *Nanotoxicology*, 10(8): 1021-1040.

10. Mao HY., Laurent S., Chen W., Akhavan O., Imani M., Ashkarran AA., et al.,2013. promises, facts, opportunities, and challenges in nanomedicine. *Chemical Review*, 113(5): 3407-3424.

11. Narayanan K.B., Sakthivel N.,2011. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic

phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Journal of Colloid and Interface Science*, 169(2):59-79.

12. Patel V., Berthold D., Puranik, P., Gantar M., (2015). Screening of cyanobacteria and microalgae for their ability to synthesize silver nanoparticles with antibacterial activity. *Biotechnology Reports*, 5:112-119.

13. Rajeshkumar C., Malarkodi K., Paulkumar M., Vanaja G., Gnanajobitha G., Annadurai G. 2014. Algae mediated green fabrication of silver nanoparticles and examination of its ainst clinical pathogens. *International Journal of Metals*, 692643: 1-9.

14. Rashmezad M.A., Ali Asgary E., Tafvizi F., Shandiz S.A., Mirzaie A., 2015. Comparative study on cytotoxicity effect of biological and commercial synthesized nanosilver on human gastric carcinoma and normal lung fibroblast cell lines. *Journal of Tehran University of Medical Sciences,72* (12):799-807. [In Persian]

15. Ravindran A., Chandran P., Khan SS.,2013. Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 105:342-352.

16. Salehzadeh A**.**, Sadatshandiz A**.**, Sadatnaeemi A, 2018. Cytotoxicity Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticles Using Macro Algae *Laurencia caspica* Extract against Breast Cancer T47D Cell Line**.** *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 26(1):52-61. [In Persian]

17. Saraniya Devi J., Valentin Bhimba B.,2012. Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized by the seaweed Ulva lactuca in vitro. *Open Access Scientific Reports*,1(4):1-5.

18. Vankayala R., Hwang K.C.,2018. Near-Infrared-Light-Activatable Nanomaterial-Mediated Phototheranostic Nanomedicines: An Emerging Paradigm for Cancer Treatment. *Advance Material*, 30(23): e1706320.

19. Vijayaraghavan K., Kamala Nalini SP., Udaya Prakash N., Madhankumar D,2012. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Syzygium aromaticum*. *Material Letters*,75:33-35.

20. Vieira AP., Stein EM., Andreguetti DX., Colepicolo P., Ferreira AMC.,2016. Preparation of silver nanoparticles using aqueous extracts of the red algae *Laurencia oldingensis* and *Laurenciella sp*. and their cytotoxic activities. *Journal of Applied Phycology*, 28(4): 2615-2622

21. Zhang XF, Liu ZG, Shen W.,Gurunathan S. 2016. Silver anoparticle synthesis, characterization, properties, applications and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Science*, 17(9):1534.

22. Zhu B., Li Y., Lin Zh., Zhao M.,Xu T.,Wang Ch. 2016. Silver nanoparticle induce $HePG_2$ cells apoptosis through ROS-mediated signaling pathway. *Nanoscale Research Letters*, 11:198-206.