



The effect of silver nanoparticles on the viability of normal skin cells (MHFB-1)

Mohamad Hemati¹, Zahra Keshtmand^{1*}, Katayoun Borhani².

1. Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Environment and Food industry Engineering, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Aim and Background: Silver nanoparticles (AgNPs) have been considered by researchers as a very strong inhibitor due to their biological properties and have many applications in prevention and treatment. However, there is little information about the effect of nanoparticles on healthy cells. The aim of this study was to investigate the effect of silver nanoparticles on the viability percentage of normal skin cell line MHFB-1.

Material and methods: In this study, during 24, 48 and 72 hours, different concentrations of silver nanoparticles (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on MHFB-1 cell line was evaluated by MTT method. Data obtained from the test were statistically analysed using SPSS software, one-way ANOVA, Tukey test and significance level of $P < 0.05$.

Results: Treatment of normal *MHFB-1* cells with different concentrations of silver nanoparticles after 24, 48 and 72 hours by MTT method showed a significant reduction in the viability of cells at concentrations of 25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Conclusion: Conclusion: The results of this study showed a dose-dependent inhibitory effect of silver nanoparticles on normal skin cell line (MHFB-1).

Keywords: Silver nanoparticles, Viability, assay, Normal skin cells line, Iau Science.

Corresponding author:

Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Email: Zkeshtmand2001@gmail.com



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

تأثیر نانوذرات نقره بر زنده مانی سلول‌های

نرمال پوست (MHFB-1)

محمد همتی^۱، زهرا کشتمند*^۱، کنایون 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.

چکیده

سابقه و هدف: نانوذرات نقره (AgNPs) به واسطه اندازه کوانتومی خود خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی دارند که منجر به طیف گسترده‌ای از کاربردهای زیست پزشکی قابل توجه می‌گردد. با این وجود اطلاعات اندکی در رابطه با تأثیر نانوذرات بر سلول‌های سالم وجود دارد. این تحقیق با هدف بررسی تأثیر نانوذرات نقره بر درصد زنده مانی رده سلول نرمال پوست MHFB-1 انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، در طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر رده سلولی MHFB-1 با روش MTT بررسی شد. داده‌های حاصل از تست مذکور با استفاده از نرم‌افزار SPSS، آزمون واریانس یک‌طرفه، تست توکی و سطح معنی‌داری $P < 0.05$ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج: تیمار سلول‌های نرمال MHFB-1 با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT، کاهش معنی‌دار بقاء سلول‌ها را در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی تأثیر مهباری وابسته به دوز نانوذرات نقره بر رده سلول نرمال پوست (MHFB-1) را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات نقره، زنده‌مانی، روش رنگ‌سنجی سمیت سلولی (MTT)، رده سلول نرمال پوست، Iau .
Science

مقدمه

منحصر به فرد بودن خواص فیزیکی نانوذرات فلزی، آن‌ها را به‌عنوان کاندیدای مورد توجه برای رساندن بسیاری از بیومولکول‌های بزرگ و کوچک دارویی معرفی کرده است (۱). این نانوذرات طی سالیان گذشته به‌دلیل ویژگی‌های خاص از قبیل رسانایی مناسب (۲) خواص ضد میکروبی (۳)، درمان بیماری‌های مختلف، زخم‌ها و التیام سوختگی‌های شدید (۴) به‌عنوان محصولی مهم در

نویسنده مسئول:

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

پست الکترونیکی: Zkeshmand2001@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۲

نانوتکنولوژی مورد استفاده قرار داده است، از این رو سنتز نانوذرات نقره با روش‌های مختلفی از جمله فیزیکی، شیمیایی انجام می‌شود (۳). امروزه یکی از اهداف علوم پزشکی در استفاده از نانوذرات، ترمیم زخم در زمان کوتاه بدون عوارض جانبی است (۵) و از میان نانوذرات مختلف نقره سال‌ها است که برای پیشگیری و درمان انواع بیماری‌ها استفاده می‌شود (۶). علاوه بر خواص ضد میکروبی شناخته‌شده آن‌ها، برخی مطالعه‌های خواص ترمیمی نقره را گزارش کرده‌اند (۷). از سویی نقره به‌عنوان قوی‌ترین ماده ضد عفونی‌کننده در دسترس دارای سمیت کمی نسبت به بافت پستانداران بوده و تحت شرایط سیستم فیزیولوژی بدن به یون نقره تغییر پیدا می‌کند (۸).

در قرن نوزدهم استفاده از نیترات نقره برای درمان سوختگی رواج داشت اما با معرفی آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده

سانتی‌گراد با فشار ۵ درصد دی‌اکسید کربن و میزان رطوبت ۸۰ درصد در انکوباتور (ممرت، آلمان) کشت داده شدند (۱۳).

تهیه نانوذرات نقره و تیمار رده سلولی *MHFB-1*

نانو ذرات نقره با ابعاد زیر ۱۰۰ نانومتر، با خلوص ۹۹ درصد از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد) خریداری شد. رده سلولی *MHFB-1* به گروه‌های کنترل و گروه‌های تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره تقسیم‌بندی شدند.

اثر نانوذرات نقره بر قدرت زنده‌مانی رده سلولی *MHFB-1*

برای انجام آزمایش، حجم ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سلول *MHFB-1* (حدود ۱۰۰۰۰ سلول) به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای (SPL، کره) اضافه‌شده و انکوباسیون با غلظت‌های مختلف ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات نقره تجاری طی ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۸ درصد و فشار دی‌اکسیدکربن ۵٪ در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه، روی سلول‌ها انجام شد (۱۴).

بعد از ۲۴ ساعت، به‌منظور بررسی اثر نانوذرات نقره تجاری بر قدرت زنده‌ماندن سلول‌های نرمال از کیت MTT (سیگما، آلمان) استفاده‌گردید. در ادامه، به هر خانه پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر رنگ MTT، با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه و به‌مدت چهار ساعت در انکوباتور دارای CO₂ و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. 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، حجم ۲۰۰ میکرولیتر دی متیل‌سولفوکساید (DMSO) (مرک، آلمان) اضافه‌گردید. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه انکوباسیون، جذب نوری هر چاهک با دستگاه الایزا (cetoib، آمریکا) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد (۱۵).

تست MTT در این مطالعه در سه تکرار انجام و در نهایت درصد زنده‌مانی سلول‌ها از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد میزان بقای سلول} = \frac{\text{میزان جذب نوری حاصل تیمار از هر غلظت جذب نوری کنترل}}{\text{MTT}} \times 100$$

MTT (۴،۵،۳) دی متیل تیاژول) ۲، ۵ دی فنیل بروماید تترازولیوم)، یکی از روش‌های رنگ سنجی و

از آن کاهش یافت (۷). امروزه با توجه به مقاومت باکتری-های مختلف به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و پیشرفت نانو-بیوتکنولوژی استفاده مجدد از نانوذرات نقره مورد توجه قرار گرفته است، ورود پانسمان‌های حاوی نقره به بازار، عرضه باندازه‌های آغشته به نقره با فعالیت ضدباکتریایی گرم مثبت و منفی و یا کرم حاوی سولفادایزین نقره از جمله مثال‌های استفاده مجدد از نقره در دنیای پزشکی است (۹).

از جمله مکانیسم‌های پیشنهادی اثر ضدباکتریایی نقره، توقف فعالیت آنزیم‌های زنجیره تنفسی و درنهایت تولید ATP، جلوگیری از همانندسازی DNA، آسیب به غشاء و تولید گونه‌های اکسیژن آزاد است (۱۰، ۱۱).

از آنجا که در حال حاضر نقره و ترکیب‌های آن به‌عنوان یک راه حل مناسب برای درمان عفونت در سوختگی‌ها، زخم‌های باز و زخم‌های مزمن کاربرد دارد و هم‌چنین بعد از جذب، در بافت‌های مختلف توزیع می‌شوند از این‌رو بررسی سمیت آن بعد از جذب در بافت‌ها و سلول‌های مختلف نیاز به مطالعه بیش‌تر دارد.

با پیشرفت و گسترش فناوری نانو، نانوذرات نقره به‌دلیل کاربردهای فراوان در زمینه‌های مختلف جهت تولید و استفاده مورد استقبال قرار گرفته‌اند اما، علیرغم کاربردهای درمانی نانوذرات نقره، ممکن است خطرات و عوارض جانبی پیش‌بینی نشده‌ای برای سلامتی انسان داشته باشند؛ لذا با افزایش توجه به سمیت بالقوه آن‌ها و با توجه به این‌که مطالعه‌ها نشان داده‌اند که تأثیر نانوذرات نقره با افزایش وقوع استرس اکسیداتیو در سلول‌های در معرض قرار گرفته همراه است (۱۲) اما از آنجا که اطلاعات کمی درباره سمیت این مواد بر سلول‌های نرمال وجود دارد، در این مطالعه برای اولین بار اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر قدرت زنده‌مانی سلول‌های نرمال پوست *MHFB-1* بررسی‌گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه رده سلولی کشت:

در این مطالعه تجربی، رده سلولی *MHFB-1* از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه‌گردید. سلول‌های این رده سلولی در محیط کشت RPMI (Roswell Park Memorial Institute) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS: Fetal Bovine Serum)، پنی-سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (گیبکو، آمریکا) در دمای ۳۷ درجه

آزمایش متداول برای بررسی میزان سمیت مواد بر حیات سلول است، که با سنجش قدرت احیاء رنگ تترازولیوم توسط آنزیم‌های سلولی و تبدیل آن به بلورهای فورمازان با رنگ بنفش مورد بررسی قرار می‌گیرد. در نتیجه فرآیند احیا، بلورهای بنفش رنگ فورمازون تشکیل می‌شود، سپس این بلورها در حلال مناسب حل شده و به وسیله روش‌های اسپکتروفوتومتری مقدار سنجی می‌شود. مقدار بلور فورمازون ایجاد شده می‌تواند نشان‌دهنده درصد سلول‌های زنده باشد (۱۶).

آنالیز آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده، با استفاده از نرم-افزار SPSS با ورژن ۱۹ (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) و آزمون آماری واریانس یک طرفه صورت گرفت. نتایج براساس انحراف معیار \pm میانگین و اختلاف معنادار بین گروه‌ها $P < 0/05$ در نظر گرفته شد. هم‌چنین توزیع طبیعی داده‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف صورت گرفته است ($P > 0/05$).

یافته‌ها

غلظت‌های مختلف ۵۰، ۲۵، ۱۲/۶، ۵/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶ و ۱۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر نانوذرات نقره با استفاده از تست MTT طی مدت ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت بر سلول‌های نرمال رده سلول MHFB-1 انجام شد.

در غلظت‌های ۵۰، ۲۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش معنی‌دار بقای سلولی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. چنانچه در نمودار ۱ نشان داده شده است، کاهش درصد زنده ماندن سلول‌های نرمال سلول MHFB-1 وابسته به غلظت نانوذرات نقره، است. براساس نتایج حاصل در هر سه مدت زمان ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت، نانوذرات نقره با غلظت ۲۵ میکروگرم برمیلی‌لیتر کم‌ترین ($P < 0/05$) و غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیش‌ترین مهار بقای سلولی را در مقایسه با گروه کنترل را به صورت معنادار نشان داد ($P < 0/001$).

بحث

در این مطالعه برای اولین بار تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره تجاری بر قدرت زنده‌مانی رده سلولی MHFB-1 مورد بررسی قرار گرفت. تیمار رده سلولی نرمال MHFB-1 با غلظت‌های مختلف ۳/۱۲۵، ۱/۵۶، ۵/۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره با استفاده از تست MTT طی مدت ۴۸، ۲۴

و ۷۲ ساعت انجام شد. در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شد. نانوذرات نقره در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیش‌ترین تأثیر را بر درصد بقا سلول‌ها داشته و نسبت به گروه کنترل نتایج معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/001$). کم‌ترین میزان کشندگی معنادار سلول‌های تیمار شده با نانوذرات نقره، در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داده شد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد نانوذرات نقره به صورت وابسته به غلظت، درصد زنده‌مانی را در سلول‌های نرمال پوست MHFB-1 کاهش می‌دهند.

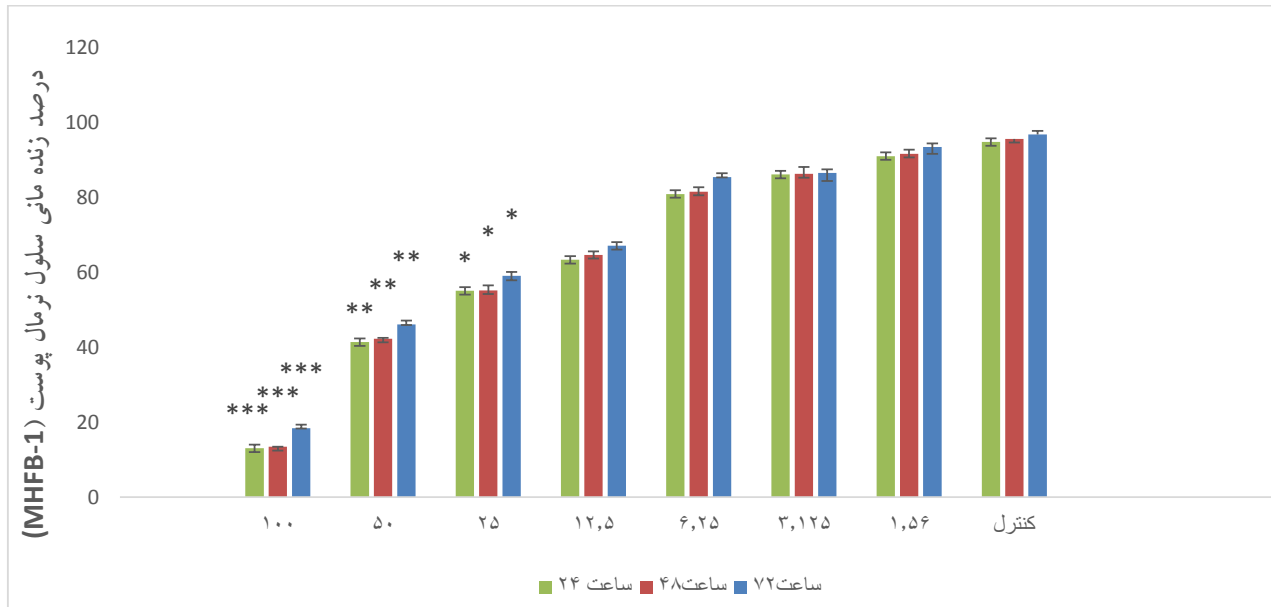
گسترش و پیشرفت‌های حاصل از علم نانو تکنولوژی، بستر مناسبی را برای کشف اثر درمانی نانوذرات فلزی فراهم کرده است. اعتقاد بر این است که نانوذرات فلزی به دلیل اندازه کوچک، نسبت سطح به حجم بالایی دارد که باعث تماس بیش‌تر با محیط و در نتیجه تأثیر ضد میکروبی و درمانی بیش‌تر خواهد داشت (۱۷، ۱۸).

هم‌چنین گزارش شده است که نانوذرات نقره می‌تواند در اندام‌های مختلف در شرایط آزمایشگاهی و هم‌چنین در مدل‌های جانوری پستانداران در محیط زنده سمیت ایجاد نمایند (۱۹) و سبب ایجاد آسیب در اندام‌ها و سلول‌ها گردد (۲۰) که نتایج حاصل از این مطالعه نیز تأثیر نانوذرات نقره بر کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های نرمال پوست (MHFB-1) را نشان داد که همسو با نتایج قبلی بود.

بر اساس مطالعه‌های صورت گرفته، نانوذرات نقره می‌تواند سبب آسیب غشاء سلولی (۲۱)، نکروز سلولی (۲۲)، کاهش عملکرد میتوکندری (۲۳) و کاهش بقای سلول (۲۴) گردد. نانوذرات با وارد شدن به میتوکندری (۲۵) و با تولید گونه‌های اکسیژنی فعال (ROS) هم در محیط زنده و هم در شرایط آزمایشگاهی و نیز تولید رادیکال‌های آزاد می‌توانند سبب آسیب درون سلولی شوند (۲۶، ۲۷).

Kim و همکاران براساس نتایج حاصل از کار خود در سال ۲۰۱۱ گزارش دادند که سمیت سلولی القاء شده توسط نانوذرات نقره به دلیل استرس اکسیداتیو حاصل از این یون‌ها است که با تجمع در سیتوپلاسم و هسته سلول‌ها منجر به تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (۲۸).

پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهد، اثرات مهاری نانوذرات زیستی و تجاری در رده سلول سرطانی و نرمال قابل



نمودار ۱. مقایسه غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر درصد زیست مانی رده سلولی نرمال پوست (MHFB-1) در مدت زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

مقادیر براساس خطای انحراف \pm میانگین معیار بیان شد.

علامت * $P < 0.05$ در مقایسه با گروه با کنترل.

علامت ** $P < 0.01$ در مقایسه با گروه با کنترل.

علامت *** $P < 0.001$ در مقایسه با گروه با کنترل.

مقایسه با سلول‌های سالم، ورود نانوذرات به داخل سلول-های سرطانی با سهولت بیش‌تری انجام گرفته، این تغییرها، بستر مناسب برای تأثیرگذاری بیش‌تر نانوذرات نقره بر سلول‌های ناسالم نسبت به سلول‌های سالم را فراهم می‌کند (۳۲).

هم‌چنین، با توجه به این‌که در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی، فرآیند تنفس سلولی میتوکندریایی دارای فعالیت بیش‌تر است، و از سوی دیگر، نانوذرات نقره از طریق تأثیر بر این مسیر نیز عمل می‌کنند؛ بنابراین، شرایط تأثیرگذاری بیش‌تر نانوذرات نقره بر سلول‌های غیرطبیعی، در مقایسه با سلول سالم فراهم می‌شود. به‌طور کلی القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یکی از مکانیسم‌های مورد توجه در حوزه نانو به‌شمار می‌رود. مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل فعال‌سازی رویدادهای پروآپتوتیک اندامک میتوکندری در سلول باشد که با آزادسازی سیتوکروم c آغاز می‌شود. علاوه بر این اثرات نانوذرات نقره در افزایش بیان ژن پروتئاز کاسپاز ۳ در سلول‌های سرطانی و القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در مطالعه‌های مختلف نشان داده شده است (۳۳).

در سال ۲۰۱۶ تأثیر نانوذرات نقره بر رده سلول نرمال فیبروبلاست (P4) توسط *Vieria* و همکاران گزارش داده شد (۲۹).

هم‌چنین نتایج پژوهش‌های Salehzadeh و همکاران تأثیر وابسته به غلظت نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک قرمز *L. caspica* بر رده‌های سلول سرطانی MRC-5 و نرمال TD47 را نشان داد (۱۶).

در مطالعه Devi و همکارانش پس از سنتز نانوذرات نقره از طریق احیای گیاهی *Lactuca Ulva* با اندازه بین ۲۰ تا ۵۶ نانومتر، اثرات ضدسرطانی آن روی رده‌های سلولی سرطانی کبد (HepG-2)، پستان (MCF-7)، کولون (HT29) و سلول نرمال Vero گزارش داده شد (۳۰) که در این پژوهش نیز، تأثیر نانوذرات نقره بر رده سلول نرمال پوست (MHFB-1) همسو با مطالعه‌های پیشین بود.

نتایج بررسی‌ها نشان داده است که تأثیر نانوذرات بر سلول‌های ناسالم در مقایسه با سلول سالم بیش‌تر بوده که به احتمال به دلیل تغییرات ایجاد شده در ظاهر سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول سالم است (۳۱). به دلیل افزایش، اندازه منافذ در غشای سلول‌های سرطانی، در

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد، تاثیر غلظت های مختلف نانوذرات نقره مورد مطالعه بر زنده ماندن رده سلول نرمال پوست (MHFB-1) وابسته به غلظت است. از این رو به نظر می رسد توجه به غلظت های نانوذرات، به خصوص در حوزه درمان، تحویل دارو، تأثیرگذاری بر سلول بیمار و سمی نبودن آن بر سلول های نرمال در معرض، دارای اهمیت است. اگرچه نتایج این پژوهش نیازمند بررسی های دقیق تر، تست های تکمیلی بیش تر و مطالعه های *In vivo* و *in vitro* است.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد با کد پایان نامه ۱۰۱۳۰۵۶۰۹۷۲۰۰۳ است که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی اجرا شده است

1. Abbai R, Mathiyalagan R, Markus J, Kim YJ, Wang C, Singh P, Ahn S, El-Agmy Farh M, Yang DC, Green synthesis of multifunctional silver and gold nanoparticles from the oriental herbal adaptogen: Siberian ginseng. *Int J Nanomed* 2016; 11: 3131–143.
2. Wan G, Ruan I, Yin Y, Yang T, Ge M, Cheng X, Effects of silver nanoparticles in combination with antibiotics on the resistant bacteria *Acinetobacter baumannii*, *Int J Nanomedicine* 2016; 11: 3789–3800.
3. Faraha MA, Alib MA, Chen SM, Li Y, Al-Hemaid FM, Abou-Tarboush FM, et al. Silver nanoparticles synthesized from *Adenium obesum* leaf extract induced DNA damage, apoptosis and autophagy via generation of reactive oxygen species. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016; 141:158–69.
4. Huang L, Dai T, Xuan Y, Tegos GP, Hamblin MR. Synergistic combination of chitosan acetate with nanoparticle silver as a topical antimicrobial: efficacy against bacterial burn infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(7): 3432–38.
5. Mohammed AE, Al-Qahtani A, Al-Mutairi A, Al-Shamri B, Aabed KF. Antibacterial and cytotoxic potential of biosynthesized silver nanoparticles by some plant extracts. *Nanomaterials (Basel)*; 2018; 8(6):36-42.
6. Rojas K, Stuckey A. Breast cancer epidemiology and risk factors. *Clin Obstet Gynecol*. 2016; 59(4):651-72.
7. Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, et al. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *Chem Med Chem*. 2007; 2(1): 129-36.
8. Wright JB, Lam K, Buret AG, Olson ME, Burrell RE. Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metallo proteinases, cell apoptosis, and healing. *Wound Repair Regen*. 2002; 10(3): 141-51
9. Sundaramoorthi C, Devarasu S. Antimicrobial and wound healing activity of silver nanoparticles. *international journal of pharmaceutical research and development*. *Int J Pharm Res Develop*. 2011; 2(12): 69-75.
10. Ge L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing MM. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int J Nanomed*; 2014; 9(1):2399-407.
11. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(9).
12. Jeng HA, Swanson J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2006; 41(12): 2699-711.
13. Salehzadeh A, Sadatshandiz A, Sadatnaemi A. Cytotoxicity Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticles Using Macro Algae *Laurencia caspica* Extract against Breast Cancer T47D Cell Line. *SJIMU*. 2018; 26(1): 52-61. [In Persian]
14. Dastgir Y, Keshmand Z, Borhan K. The Effect of Silver Nanoparticles on the Viability of Lung Fibroblast Cell Line (MRC-5). *ASCIJ*. 2020; 13(2): 21-27.
15. Faraha MA, Alib MA, Chen SM, Li Y, Hemaid FM, Aboutarboush FM., et al., 2016. Silver nanoparticles synthesized from *Adenium obesum* leaf extract induced DNA damage apoptosis and

- autophagy via generation of reactive oxygen species. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* . 141;158-69.
16. Salehzadeh A, Sadat Shandiz A, Naeemi AS. Cytotoxicity effectiveness of biosynthesized silver nanoparticles on breast cancer T47D cell line, using macro algae *Laurencia caspica* extract. *Sci J Ilam Uni Med Sci*. 2018;26(1):52-61.
17. Liu JJ, Lin M, Yu JY, Liu B, Bao JK. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Lett*. 2011;300(2):105-14.
18. Sánchez-Moreno P, de Vicente J, Nardecchia S, Marchal JA, Boulaiz H. Thermo-Sensitive Nanomaterials: recent advance in synthesis and biomedical applications. *Nanomaterials (Basel)*. 2018; 8(11):10-16.
19. Pronk MEJ, Wijnhoven SWP, Bleeker EAJ, Heugens EHW, Peijnenburg WJGM, Luttik R, et al. Nanomaterials under REACH. Nanosilver as a case study. RIVM report. 2009.
20. Patra JK, Baek KH. Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of silky hairs of corn and investigation of its antibacterial and anticandidal synergistic activity and antioxidant potential. *IET Nanobiotechnol*. 2016;10(5):326-33.
21. Song XL, Li B, Xu K, Lu J, Ju W, Wang J, Liu X D, et al. Cytotoxicity of water-soluble mPEG-SH-coated silver nanoparticles in HL-7702 cells. *Cell Biol Toxicol* .2012; 28: 225-37.
22. Ahmadi F, Branch S. Impact of different levels of silver nanoparticles (Ag-NPs) on performance, oxidative enzymes, and blood parameters in broiler chicks. *Pak Vet J*. 2012;32: 325-28.
23. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol in Vitro* .2005; 19: 975-83.
24. Korani M, Rezayat SM, Gilan K, Arbabi Bidgoli S, Adeli S. Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6:855-62.
25. Li N, Sioutas C, Cho A, Debra S, Chandan M, Joan S, et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* .2003; 111: 455-60.
26. Oberdörster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ Health Perspect* .2004; 112: 1058-062.
27. Rastogi ID. Nanotechnology: safety paradigms. *J Toxicol Environ Health* 2012; 4:1-12
28. Kim S, Choi JE, Choi J, Chung KH, Park K, Yij J, et al. Oxidative Stress-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles In Human Hepatoma Cells. *Toxicol In Vitro*.2009; 23(6):1076-084.
29. Vieira AP, Stein EM, Andregueti DX, Colepicolo P, Ferreira AMC. Preparation of silver nanoparticles using aqueous extracts of the red algae *Laurencia oldingensis* and *Laurenciella* sp. and their cytotoxic activities. *J. Appl. Phycol*. 2016;28(4): 2615-622.
30. Devi JS, Bhimba BV. Anticancer Activity of Silver Nanoparticles Synthesized by the Seaweed *Ulva lactuca* In vitro. *Sci Rep* 2012;1(4)242-47.
31. Rashmezd MA, Ali-Asgary E, Tafvizi F, Shandiz SA, Mirzaie A. Comparative study on cytotoxicity effect of biological and commercial synthesized nanosilver on human gastric carcinoma and normal lung fibroblast cell lines. *TUMS*.2015;72 (12):799-07. [In Persian]

32. Koyyati R, Nagati V, Ramchander M, Manthurpafigya P. Biological synthesis of silver nanoparticles using *Raphanus sativus* var. *Longipinnatus* leaf extract and evaluation of their antioxidant and antibacterial activity. *IJPSM*. 2013; 3(4): 89-100.

33. Zhu B, Li Y, Lin Zh, Zhao M, Xu T, Wang Ch, et al. Silver nanoparticles induce HePG-2 cells apoptosis through ROS-mediated signaling pathways. *Nanoscale Res Lett*. 2016; 11:198-206.

