

Selective cytotoxicity and apoptosis induction by biosynthesized silver nanoparticles using (*Serenoa repens*) extract in breast and prostate cancer cell lines

Behzad Amraei¹

1- Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran;

Abstract

Aim and Background: Silver nanoparticles (AgNPs) are known for their anticancer properties, while *Serenoa repens* (Saw Palmetto) extract has demonstrated inhibitory effects on cancer cell growth. This study investigates the selective cytotoxicity of AgNPs synthesized with *S. repens* extract on breast (MCF-7) and prostate (PC-3) cancer cell lines, compared to normal cells (MCF-10A and RWPE-1).

Materials and Methods: AgNPs were synthesized using an aqueous extract of *S. repens*. Cell viability was assessed at 24, 48, and 72 hours using the MTT assay. Apoptosis and cell death were analyzed through Annexin V/PI staining. Cells were treated with 10–80 µg/mL of AgNPs, and IC₅₀ values were calculated. Statistical analyses were used to compare group differences.

Results: The synthesized AgNPs exhibited dose-dependent cytotoxic effects on MCF-7 and PC-3 cells, with IC₅₀ values of 25 and 50 µM, respectively. Linear regression analysis confirmed a significant decrease in cancer cell viability with increasing nanoparticle concentrations, while minimal effects were observed on normal cell lines ($p < 0.05$).

Conclusion: AgNPs synthesized with *S. repens* extract selectively target cancer cells while sparing normal cells, indicating high therapeutic potential against breast and prostate cancers. Further studies are needed to determine optimal dosing and clarify apoptotic mechanisms.

Keywords: Silver Nanoparticles, *Serenoa Repens*, Breast Cancer, Prostate Cancer, Apoptosis, Selective Cytotoxicity

Corresponding Author:

Behzad Amraei, Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

Email: b.amraei@pnu.ac.ir

سمیت انتخابی و القای آپوپتوز توسط نانوذرات نقره زیستی سنتز شده با عصاره نخلک /ره/ی در رده های سلولی سرطان پستان و پروستات

بهزاد امرایی^۱

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران؛

چکیده

سابقه و هدف: نانوذرات نقره (AgNPs) به دلیل خواص ضدسرطانی شناخته شده اند و عصاره گیاه نخل /ره/ی (*Serenoa repens*) نیز اثرهای مهاری بر رشد سلول های سرطانی دارد. این مطالعه به بررسی سمیت انتخابی نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره نخل /ره/ی بر سلول های سرطانی پستان (MCF-7) و پروستات (PC-3) در مقایسه با سلول های نرمال MCF-10A و RWPE-1 می پردازد.

مواد و روش ها: نانوذرات نقره با عصاره آبی نخل /ره/ی تهیه شد. اثر آن ها بر بقای سلولی در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با آزمون MTT بررسی گردید. مرگ سلولی و آپوپتوز با استفاده از آنالیز Annexin V/PI ارزیابی شد. سلول ها با غلظت های ۱۰ تا ۸۰ µg/mL تیمار شده و مقدار IC₅₀ تعیین شد. داده ها با آزمون های آماری تحلیل شدند.

یافته ها: نانوذرات سنتز شده اثرهای سمی وابسته به دوز بر سلول های MCF-7 و PC-3 داشتند و مقادیر IC₅₀ به ترتیب ۲۵ و ۵۰ میکرومول تعیین شد. تحلیل رگرسیون خطی کاهش معنی دار بقای سلول های سرطانی در مقایسه با سلول های نرمال را تأیید کرد ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: نانوذرات نقره حاصل از عصاره نخل /ره/ی قابلیت هدف گیری انتخابی سلول های سرطانی را دارند و آسیب کمتری به سلول های طبیعی وارد می کنند، که نشان دهنده پتانسیل درمانی بالای آن ها در سرطان های پستان و پروستات است. تحقیق های بیشتری برای تعیین دوز بهینه و بررسی دقیق تر مکانیسم های آپوپتوز مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، نخل /ره/ی، سرطان پستان، سرطان پروستات، آپوپتوز، سمیت انتخابی

نویسنده مسئول: بهزاد امرایی، استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

پست الکترونیکی: b.amraei@pnu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۰۵

۱- مقدمه

سرطان پستان، یکی از شایع ترین انواع سرطان در زنان است و به عنوان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در سطح جهانی شناخته می شود [۱]. طبق گزارش های جهانی، سرطان پستان به ویژه در کشورهای پیشرفته، به دلیل عوامل ژنتیکی، هورمونی و سبک زندگی شیوع بالایی دارد [۲]. در سال ۲۰۱۸، تعداد ۲/۱ میلیون مورد جدید سرطان پستان در سراسر جهان گزارش شده که این بیماری مسئول تقریباً ۲۵ درصد از موارد سرطان در زنان است [۱]. درمان های رایج سرطان پستان شامل جراحی، شیمی درمانی، پرتودرمانی و درمان های هورمونی هستند. با این حال، مشکلاتی نظیر مقاومت به درمان، عوارض جانبی شدید و محدودیت های درمان های موجود، لزوم جست و جو برای روش های درمانی نوین و کم عارضه تر را بیشتر کرده است [۳].

در سال های اخیر، نانوذرات به عنوان یک روش درمانی نوین در درمان سرطان ها شناخته شده اند. نانوذرات به دلیل اندازه کوچک، سطح بالای تماس با سلول ها، قابلیت حمل مواد فعال و توانایی هدف گیری خاص، پتانسیل بالایی برای درمان سرطان ها دارند [۴]. نانوذرات نقره (AgNPs) به دلیل خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد باکتریایی خود در مطالعه های مختلف برای درمان سرطان به کار گرفته شده اند. این نانوذرات می توانند از طریق تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) موجب آسیب به DNA و تخریب سلول های سرطانی شوند [۵]. علاوه بر این، نانوذرات نقره به دلیل اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم بالا، به راحتی می توانند به سلول های سرطانی وارد شده و اثرهای درمانی خود را اعمال کنند [۶].

یکی از منابع گیاهی با پتانسیل ضد سرطانی، عصاره نخل /ره ای است که عمدتاً برای درمان بیماری های پروستات مورد استفاده قرار می گیرد. این گیاه دارای ترکیب های فعال بیولوژیکی مانند اسیدهای چرب و فیتوسترول ها است که خواص ضد التهابی و ضد سرطانی آن را تقویت می کنند [۷]. مطالعه های متعدد نشان داده اند که عصاره نخل /ره ای می تواند رشد سلول های سرطانی را مهار کند و اثرهای منفی شیمی درمانی را کاهش دهد [۸].

در این راستا، استفاده از عصاره نخل /ره ای برای سنتز نانوذرات نقره به عنوان یک راهبردی نوین در درمان سرطان پستان و پروستات مورد توجه قرار گرفته است. نانوذرات نقره

سنتز شده با عصاره نخل /ره ای می توانند اثرهای ضد سرطانی قوی تری نسبت به نانوذرات نقره سنتز شده به روش های سنتی داشته باشند. این نانوذرات علاوه بر داشتن اثرهای ضد سرطانی مستقیم، می توانند به عنوان حمل کننده های دارویی برای انتقال داروهای ضد سرطان به محل تومور استفاده شوند و با کمترین عوارض جانبی، اثرهای درمانی بیشتری را به همراه داشته باشند [۹].

رده های سلولی MCF-7 و PC-3 از جمله مدل های پُر کاربرد برای مطالعه سرطان هستند. سلول های MCF-7 یک رده سلولی سرطان پستان انسانی هستند که به هورمون استروژن حساس بوده و برای بررسی تأثیرهای درمان های هورمونی و ضد سرطان استفاده می شوند [۱۰]. همچنین، رده سلولی PC-3 مدل سرطان پروستات مقاوم به هورمون است که در بسیاری از آزمایش ها برای بررسی درمان های جدید در سرطان پروستات استفاده می شود [۱۱].

در پژوهش حاضر، به بررسی اثرهای نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره نخل /ره ای بر روی رده های سلولی سرطان پستان انسانی (MCF-7) و پروستات (PC-3) و همچنین سلول های طبیعی MCF-10A و RWPE-1 پرداخته شده است. این مطالعه با هدف ارزیابی اثرهای نانوذرات نقره بر القای آپوپتوز، سمیت سلولی و تأثیرهای انتخابی این نانوذرات در سلول های سرطانی و طبیعی طراحی شده است. ارزیابی اثرهای نانوذرات نقره در مقایسه با داروهای شیمیایی مرسوم، می تواند راهگشای درمان های جدید و بهبود یافته در درمان سرطان پستان و پروستات باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد شیمیایی و گیاهی

عصاره نخل /ره ای از فروشگاه های معتبر گیاهی تهیه شد. نانوذرات نقره (AgNPs) به طور سنتی از طریق کاهش یون های نقره (Ag^+) با استفاده از عصاره نخل /ره ای سنتز شدند. این فرایند مشابه روش های گزارش شده توسط Liu و همکاران (۲۰۱۹) [۱۲] انجام گرفت. به طور خلاصه، عصاره گیاهی به عنوان عامل کاهنده برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شد و نانوذرات تولید شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و طیف سنجی UV-Vis مورد شناسایی و تأیید قرار گرفتند.

۲-۲- سلول های مورد استفاده

سلول های سرطانی پستان انسانی MCF-7 و پروستات انسانی PC-3 از بانک سلولی ATCC (American Type Culture Collection) خریداری شدند. سلول های طبیعی پستان MCF-10A و پروستات RWPE-1 نیز برای مقایسه اثرهای نانوذرات نقره به عنوان سلول های کنترل استفاده شدند. تمامی سلول ها در محیط کشت RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific) حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی (FBS) (Thermo Fisher Scientific) و ۱ درصد آنتی بیوتیک-آنتی مور پی سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر و استرپتومایسین (۱۰۰ µg/mL) (Thermo Fisher Scientific) در شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ نگهداری شدند.

۲-۳- سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره نخل / ارامی

برای سنتز نانوذرات نقره، عصاره نخل / ارامی به میزان ۱۰ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق توسط هواساز هم زده شد تا عصاره حاصل شود. سپس محلول ۱ میلی مولار نیتрат نقره (AgNO₃) به عصاره اضافه شد و در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد تا نانوذرات نقره سنتز شوند. بعد از این مدت، نانوذرات با استفاده از سانتریفوژ (۱۰۰۰۰ گرم)، ۱۰ دقیقه از محلول جدا شده و در آب مقطر شست و شو داده شدند. ویژگی های نانوذرات نقره از جمله اندازه ذرات و شکل آن ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و طیف سنجی UV-Vis اندازه گیری شدند [۱۳].

۲-۴- تحلیل ترکیب های عصاره نخل / ارامی با کروماتوگرافی

گازی (GC)

برای شناسایی و تحلیل ترکیب های فعال موجود در عصاره نخل / ارامی که به عنوان عامل کاهنده برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شده است، از کروماتوگرافی گازی (GC) همراه با طیف سنجی جرمی (MS) استفاده شد. ابتدا، عصاره نخل / ارامی به طور دقیق آماده سازی شد و ترکیب های آن با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent B7890 و طیف سنجی جرمی Agilent A5977 شناسایی شدند. شرایط عملکرد دستگاه به صورت زیر بود:

ستون GC از نوع HP-5MS با ابعاد ۳۰ متر × ۲۵/۰ میلی متر × ۲۵/۰ میکرومتر استفاده شد و گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه به کار گرفته شد. برنامه دمایی کوره با دمای اولیه ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه آغاز شد و سپس با نرخ ۱۰ درجه سانتی گراد در دقیقه تا دمای ۳۰۰ درجه سانتی گراد افزایش یافت. دمای اسپکترومتر جرمی در ۲۳۰ درجه سانتی گراد تنظیم و محدوده تشخیص جرمی از ۴۰ تا ۶۰۰ m/z انتخاب شد. زمان ماند ترکیب ها نیز متناسب با ماهیت شیمیایی آن ها متغیر بود. ترکیب های شناسایی شده با استفاده از پایگاه داده NIST MS Library و مقایسه طیف های به دست آمده با طیف های استاندارد، مورد تأیید قرار گرفتند. اطلاعات حاصل از این آنالیز برای تعیین ترکیب های فعال موجود در عصاره نخل / ارامی و ارزیابی نقش آن ها در سنتز نانوذرات نقره مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۵- ارزیابی سمیت سلولی با استفاده از آزمون MTT

سمیت نانوذرات نقره بر روی سلول های MCF-7، PC-3، MCF- A10 و RWPE-1 با استفاده از آزمون MTT (۳-۴، ۵-dimethylthiazol-۲-yl)-۲-diphenyltetrazolium bromide) ارزیابی شد [۱۴]. سلول ها در صفحات ۹۶ خانه ای کشت داده شدند و پس از رسیدن به ۷۰ تا ۸۰ درصد هم پوشانی، به مدت (۲۴، ۴۸ و ۷۲) ساعت تحت تیمار با دوزهای مختلف نانوذرات نقره (۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر) قرار گرفتند. بعد از تیمار، محلول MTT به مدت ۴ ساعت به محیط اضافه شد و پس از آن، DMSO برای حل کردن بلورهای فورمازان به کشت اضافه شد. جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA Reader اندازه گیری شد. میزان زنده ماندی سلول ها به صورت درصدی نسبت به گروه کنترل محاسبه شد و از معادله IC₅₀ برای محاسبه دوز کشندگی نانوذرات استفاده شد.

۲-۶- ارزیابی آپوپتوز با استفاده از فلوئوسایتومتری

Annexin V/PI

برای ارزیابی اثرهای آپوپتوزی نانوذرات نقره، آنالیز Annexin V-FITC/PI (Propidium Iodide) برای تشخیص سلول های آپوپتوتیک و نکروتیک انجام شد [۱۵]. پس از تیمار سلول ها با دوزهای مختلف نانوذرات نقره (۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، سلول ها با محلول Annexin V-FITC و PI طبق دستورالعمل تولید کننده (BD Biosciences) رنگ آمیزی شدند و سپس با

استفاده از فلوسیتومتری تعداد سلول های زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک شناسایی شدند.

۷-۲- محاسبه IC₅₀

برای محاسبه مقدار IC₅₀ نانوذرات نقره، داده های به دست آمده از آزمون MTT با استفاده از مدل لجستیک برای برازش منحنی دوز-پاسخ تحلیل شدند. مقدار IC₅₀ به عنوان دوز نانوذرات نقره ای که ۵۰ درصد از سلول ها را کشته است، محاسبه شد [۱۶].

۸-۲- تجزیه و تحلیل آماری

برای تحلیل آماری داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ و آزمون ANOVA یک طرفه استفاده شد. اختلافات آماری معنی دار با مقدار p کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. همچنین، داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) ارائه شدند.

۳- نتایج

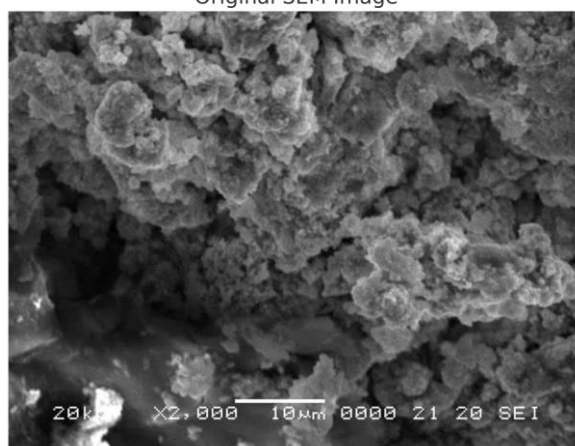
۱-۳- بررسی مورفولوژی نانوذرات نقره با استفاده از

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

بررسی مورفولوژی سطح و اندازه تقریبی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

رویشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود، ذرات دارای ساختار کلی مجتمع شده با مورفولوژی تقریباً کروی هستند. بیشتر نانوذرات در محدوده زیر میکرونی قرار دارند و توزیع اندازه آنها نسبتاً گسترده است. تحلیل تصویر نشان داد که میانگین قطر ذرات حدود ۱/۲۰ میکرومتر با انحراف معیار ۴/۱۹ میکرومتر است؛ این محاسبه ها بر اساس بررسی ۸۴ ذره منفرد انجام شده است. نمودار توزیع اندازه ذرات شکل ۱ بیانگر وجود دامنه وسیعی از اندازه ها است که نشان دهنده سنتز ذرات با درجه های مختلفی از تجمع و احتمالاً هم جوشی سطحی است. اگرچه معمولاً انتظار می رود نانوذرات نقره در ابعادی کمتر از ۱۰۰ نانومتر باشند، ابعاد مشاهده شده می توانند ناشی از تجمع ذرات (agglomeration)، وجود مولکول های زیستی سطحی حاصل از عصاره گیاهی در روش سنتز سبز، یا عدم پایداری کامل سطحی در حین تشکیل ذرات باشند. حضور تعداد اندکی ذرات با اندازه های بسیار بزرگ تر از میانگین، بیانگر رشد غیر یکنواخت بوده و ممکن است با بهینه سازی شرایط سنتز، مانند غلظت عوامل کاهنده یا زمان واکنش، قابل کنترل باشد.

Original SEM Image



شکل ۱- مورفولوژیکی نانوذرات نقره (AgNPs). ریزنگار میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از سطح نمونه، که ریخت شناسی (مورفولوژی) آن را با وضوح بالا نشان می دهد. این تصویر با بزرگنمایی ۲۰۰۰ برابر ثبت شده است. نوار مقیاس سفید رنگ در پایین تصویر، معادل ۱۰ میکرومتر است.

۲-۳- توزیع اندازه ذرات

نمودار توزیع اندازه ذرات (نمودار ۱) نشان می دهد که بیشترین فراوانی ذرات در بازه کمتر از ۵ میکرومتر قرار دارد، که مؤید موفقیت آمیز بودن سنتز نانوذرات نقره به روش زیستی با استفاده از عصاره نخل زینتی است. حضور

چند ذره با اندازه بزرگ تر از ۳۰ میکرومتر، به عنوان ذرات پرت (outliers)، احتمالاً ناشی از تجمع موضعی (agglomeration) یا جذب ترکیب های زیستی سنگین تر موجود در عصاره گیاهی است که در سنتزهای سبز، امری رایج محسوب می شود. این توزیع نشان می دهد

برای این رده ۷/۴۱ میکرومولار محاسبه شد که نشان دهنده حساسیت بالای سلول های MCF-7 به نانوذرات می باشد (شکل ۲-ا).

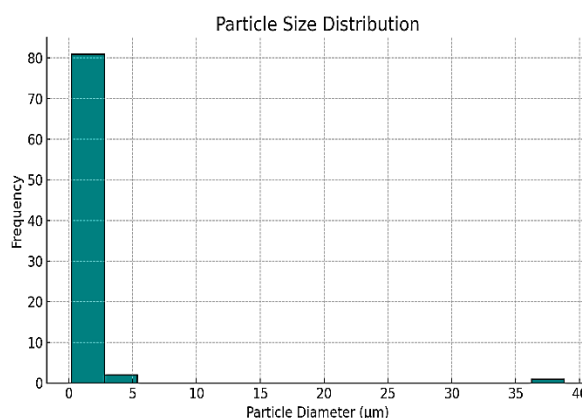
همچنین رده سلولی MCF-10A (سلول های نرمال پستان) در همان دوز (۵۰ میکرومولار) و زمان، درصد سلول های زنده همچنان بالا باقی ماند ($viability > 0.85$). در این رده، تغییرهای مورفولوژیکی خاصی نظیر نکروز یا آپوپتوز مشاهده نشد و ساختار طبیعی سلول ها حفظ شد. IC_{50} برای این رده بیش از ۱۰۰ میکرومولار تخمین زده شد، که نمایانگر سمیت پایین نانوذرات بر سلول های طبیعی و انتخاب گری زیستی آنهاست (شکل ۲-ب).

به علاوه رده سلولی PC-3 (سلول های سرطانی پروستات) پس از تیمار با دوز ۵۰ میکرومولار، سلول های PC-3 نیز پاسخ قابل توجهی به نانوذرات نشان دادند. ویژگی های بارز آپوپتوز شامل گرد شدن سلول ها، اتساع غشای پلاسمایی و تکه تکه شدن هسته به وضوح قابل مشاهده بود. درصد سلول های آپوپتوتیک به حدود $1.58 \pm 0.46\%$ درصد رسید و IC_{50} برای این رده ۵/۴۶ میکرومولار محاسبه شد. این داده ها نشان می دهند که رده PC-3 نیز به طور معناداری به نانوذرات پاسخ داده و مستعد القای آپوپتوز می باشد (شکل ۲-ج).

رده سلولی RWPE-1 (سلول های طبیعی پروستات) در این رده نرمال، پس از ۴۸ ساعت تیمار با دوز ۵۰ میکرومولار، تغییرهای سلولی حداقلی و درصد بقای بالا ($viability > 88\%$) مشاهده شد. ساختار سلول ها نسبتاً دست نخورده باقی مانده و فاقد ویژگی های مرگ سلولی یا تخریب غشایی بودند. IC_{50} در این رده نیز بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار برآورد شد (شکل ۲-د).

نتایج تصویری و کمی به وضوح نشان دادند که نانوذرات نقره حاصل از عصاره آبی نخل اره ای دارای خاصیت انتخابی ضد سرطانی بوده و اثرهای سایتوتوکسیک و القاکننده آپوپتوز را به طور معنی دار بر رده های بدخیم (MCF-7) و PC-3 نشان می دهند، در حالی که بر رده های نرمال MCF-10A و RWPE-1 تأثیر سمی حداقلی داشته اند.

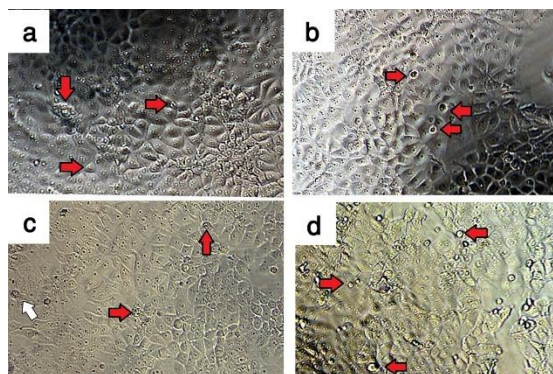
که بخش عمده ای از نانوذرات در ابعاد مطلوب و زیر میکرونی قرار دارند، در حالی که تعداد بسیار محدودی از ذرات دارای اندازه غیرمعمول اند. این پدیده به ساختار طبیعی و ترکیب های متنوع موجود در عصاره نخل زینتی نسبت داده می شود و لزوماً بیانگر ضعف در روش سنتز نیست. بنابراین، می توان نتیجه گرفت که سنتز انجام شده در تولید ذرات نقره با اندازه های مناسب موفق بوده است و تنها با بهینه سازی پارامترهایی مانند نسبت عصاره به نمک نقره یا زمان واکنش، امکان کاهش پراکندگی اندازه و حذف ذرات پرت وجود دارد.



نمودار ۱- هیستوگرام توزیع اندازه ذرات نانوذرات نقره زیست سنتز شده. این آنالیز بر روی ۸۴ ذره مجزا انجام شد. میانگین قطر ذرات 1.20 ± 0.19 میکرومتر است که نشان دهنده دامنه اندازه نسبتاً گسترده و عمدتاً در مقیاس زیر میکرون می باشد.

۳-۳- بررسی میکروسکوپی سلول ها پس از تیمار با نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره آبی نخل اره ای

رده سلولی MCF-7 (سلول های سرطانی پستان) پس از ۴۸ ساعت تیمار با نانوذرات نقره در دوز ۵۰ میکرومولار، کاهش قابل توجهی در تراکم سلولی مشاهده گردید. تحلیل تصویری نشان دهنده افزایش سلول های دارای مورفولوژی آپوپتوتیک شامل انقباض سلولی (cell shrinkage)، تراکم کروماتین، و تشکیل بادی های آپوپتوتیک بود. آزمون Annexin V/PI بیانگر افزایش معنی دار سلول ها در فاز (early apoptosis) $3/42 \pm 1/3$ درصد و (late apoptosis) $6/24 \pm 7/2$ درصد در مقایسه با کنترل بود. مقدار IC_{50}



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپی سلول‌ها پس از تیمار با نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره آبی نخل اره‌ای (Saw Palmetto).

۳-۴- شناسایی ترکیب‌های موجود در عصاره نخل اره‌ای با کروماتوگرافی گازی (GC)

همچنین نتایج حاصل از تحلیل کروماتوگرافی گازی
نشان‌دهنده وجود چندین ترکیب فعال در عصاره نخل
اره‌ای است. در اینجا جدول مربوط به ترکیب‌های

جدول ۱- شناسایی ترکیب‌های موجود در عصاره نخل اره‌ای با کروماتوگرافی گازی (GC)

ترکیب شیمیایی	زمان ماند (دقیقه)	وزن مولکولی (گرم بر مول)	بیشترین شدت پیک (درصد)	پیک (m/z)
β -Sitosterol	۴۵/۱۱	۷/۴۱۴	۶/۳۵	۴۱۳
Campesterol	۲۸/۱۳	۷/۴۰۰	۳/۲۸	۳۹۹
Linalool	۸۹/۱۷	۳/۱۵۴	۱/۲۲	۱۵۵
Palmitic acid	۰۲/۲۱	۴/۲۵۶	۷/۱۵	۲۵۵
Oleic acid	۴۶/۲۳	۵/۲۸۲	۳/۱۸	۲۸۱
Eicosanoic acid	۱۲/۲۵	۶/۳۲۴	۴/۱۰	۳۲۳

سبک‌تر و فرآرتی مانند Linalool با وزن مولکولی ۳/۱۵۴ گرم بر مول در زمان ماند بالاتری (۸۹/۱۷ دقیقه) ظاهر شده‌اند. این تأخیر در خروج می‌تواند ناشی از قطبیت کمتر این ترکیب و در نتیجه تعامل بیشتر آن با فاز ساکن غیرقطبی ستون‌مانند HP-5MS باشد که منجر به تأخیر در شویش آن می‌شود. دسته دیگر ترکیب‌های شناسایی شده شامل اسیدهای چرب با زنجیره متوسط تا بلند مانند Palmitic acid، Oleic acid و Eicosanoic acid هستند. این ترکیب‌ها با وزن‌های مولکولی ۴/۲۵۶، ۵/۲۸۲ و ۶/۳۲۴ گرم بر مول در زمان‌های ماند نسبتاً بالایی (به ترتیب ۰۲/۲۱، ۴۶/۲۳ و ۱۲/۲۵ دقیقه) شناسایی شده‌اند که نشان‌دهنده تعامل مؤثرتر گروه‌های عاملی آن‌ها (مانند کربوکسیل) با فاز ساکن ستون و در نتیجه تأخیر در خروج است. نکته حائز اهمیت

براساس داده‌های حاصل از کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) ترسیم شده است (نمودار ۲)، الگوی جداسازی ترکیب‌های شیمیایی عصاره نخل اره‌ای را براساس زمان ماند و ویژگی‌های مولکولی آن‌ها نشان می‌دهد. همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود، ترکیب‌های استروئیدی نظیر β -Sitosterol و Campesterol علی‌رغم داشتن وزن مولکولی بالا (به ترتیب ۷/۴۱۴ و ۷/۴۰۰ گرم بر مول)، در زمان‌های ماند نسبتاً کوتاه‌تری (۴۵/۱۱ و ۲۸/۱۳ دقیقه) از ستون خارج شده‌اند. این پدیده می‌تواند ناشی از ساختار نسبتاً غیرقطبی این ترکیب‌ها و تمایل کمتر آن‌ها به فاز ساکن ستون GC باشد. شدت پیک بالای این دو ترکیب، به‌ویژه β -Sitosterol با بیشترین شدت ۶/۳۵ درصد، بیانگر فراوانی قابل توجه آن‌ها در عصاره است. در مقابل، ترکیب‌های

داده‌های طیف‌سنجی جرمی و ساختار مولکولی، صحت‌شناسایی ترکیب‌ها را تأیید کرده و اعتبار آنالیز GC-MS را در تفکیک و شناسایی اجزای فعال زیستی عصاره نشان می‌دهد.

دیگر در این نمودار، همبستگی مقادیر m/z با وزن مولکولی ترکیب‌ها است. همان‌طور که انتظار می‌رود، رنگ نقاط که بیانگر مقدار m/z پیک پایه یا یون مولکولی است، با افزایش وزن مولکولی ترکیب‌ها از Linalool تا β -Sitosterol به صورت تدریجی افزایش یافته است. این تطابق خوب بین



نمودار ۲- الگوی جداسازی ترکیب‌های شیمیایی عصاره نخل ارده‌ای را براساس زمان ماند و ویژگی‌های مولکولی آن‌ها

متناسب با شدت پیک (Peak Intensity) و رنگ آن‌ها براساس مقدار m/z تنظیم شده است.

در نمودار ۲، محور افقی نشان‌دهنده (Retention Time) زمان ماند و محور عمودی نمایانگر (Molecular Weight) (وزن مولکولی) ترکیب‌های مختلف است. اندازه دایره‌ها

۳-۵- ارزیابی سمیت سلولی با آزمون MTT

در این بخش، نتایج آزمون MTT برای ارزیابی سمیت نانوذرات نقره بر روی سلول‌های MCF-7، PC-3، MCF-10A و

RWPE-1 ارائه می‌شود. در ادامه جدول میزان زنده‌مانی سلول‌ها پس از تیمار با نانوذرات نقره در دوزهای مختلف را نشان می‌دهد (جدول ۲).

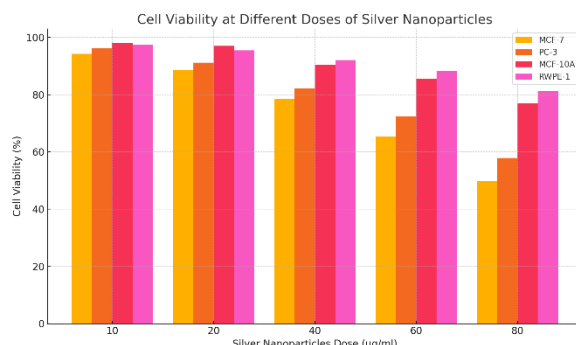
جدول ۲- ارزیابی سمیت نانوذرات نقره بر روی سلول‌های MCF-7، PC-3، MCF-10A و RWPE-1 با آزمون MTT

دوز نانوذرات نقره (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	RWPE-1 درصد	MCF-10A درصد	PC-3 درصد	MCF-7 درصد
۱۰	$2/3 \pm 4/97$	$6/2 \pm 1/98$	$8/2 \pm 3/96$	$1/3 \pm 2/94$
۲۰	$7/2 \pm 5/95$	$2/3 \pm 0/97$	$1/3 \pm 2/91$	$9/2 \pm 6/88$
۴۰	$3/3 \pm 1/92$	$5/3 \pm 3/90$	$7/2 \pm 1/82$	$2/3 \pm 4/78$
۶۰	$9/2 \pm 4/88$	$0/3 \pm 6/85$	$1/3 \pm 4/72$	$5/3 \pm 3/65$

به دوز در درصد زنده‌مانی سلول‌ها گردید. میزان کاهش زنده‌مانی در سلول‌های سرطانی به‌طور معناداری بیشتر از سلول‌های نرمال بود. در غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 به $4/2 \pm 49/7$ درصد و سلول‌های PC-3 به $3/9 \pm 57/6$ درصد رسید، درحالی‌که سلول‌های نرمال MCF-10A و RWPE-1 به ترتیب زنده‌مانی $3/9 \pm 76/8$ درصد و $3/6 \pm 81/2$ درصد را نشان دادند

همچنین سمیت سلولی نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره نخل ارده‌ای بر رده‌های سلولی سرطانی پستان (MCF-7) و پروستات (PC-3) و رده‌های سلولی نرمال پستان (MCF-10A) و پروستات (RWPE-1) با استفاده از آزمون MTT ارزیابی شد (نمودار ۳). سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره تیمار شدند. نانوذرات نقره در تمامی رده‌های سلولی باعث کاهش وابسته

(جدول ۲، نمودار ۳). بیشترین حساسیت به نانوذرات نقره در رده سلولی MCF-7 مشاهده شد.



نمودار ۳- ارزیابی سمیت سلولی نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره نخل ارغوانی بر رده های سلولی سرطانی پستان (MCF-7) و پروستات (PC-3) و رده های سلولی نرمال پستان (MCF-10A) و پروستات (RWPE-1) با استفاده از آزمون MTT.

نکروتیک در دوزهای مختلف نانوذرات نقره را نشان می دهد (جدول ۳).

۳-۶- ارزیابی آپوپتوز و نکروز با آنالیز Annexin V/PI
برای بررسی آپوپتوز و نکروز، از آنالیز Annexin V/PI استفاده شد. در ادامه جدول درصد سلول های آپوپتوتیک و

جدول ۳- ارزیابی آپوپتوز در رده های سلولی مختلف پس از تیمار با نانوذرات نقره با استفاده از رنگ آمیزی Annexin V-FITC/PI و فلوسایتومتری

MCF-7 (درصد آپوپتوز)	PC-3 (درصد آپوپتوز)	MCF-10A (درصد آپوپتوز)	RWPE-1 (درصد آپوپتوز)	دوز نانوذرات نقره (میکروگرم بر میلی لیتر)
۲/۴ ± ۳/۱	۳/۱ ± ۱/۵	۲/۸ ± ۱/۱	۳/۲ ± ۱/۴	(کنترل) ۰
۵/۱ ± ۵/۱۲***++	۲/۱ ± ۳/۹***	۰/۸ ± ۲/۳	۱/۱ ± ۱/۴	۱۰
۲/۱ ± ۷/۱۸***++	۱/۶ ± ۴/۱۴***	۲/۱ ± ۶/۵*	۱/۳ ± ۶/۸*	۲۰
۲/۴ ± ۳/۲۷***++	۲/۲ ± ۵/۲۲***++	۱/۵ ± ۱/۸**	۱/۶ ± ۹/۹**	۴۰
۳/۲ ± ۹/۳۸***++	۲/۹ ± ۱/۳۳***++	۲/۳ ± ۵/۱۲***	۲/۱ ± ۴/۱۴***	۶۰
۳/۵ ± ۴/۵۲***++	۳/۰ ± ۲/۴۵***++	۲/۴ ± ۷/۱۸***	۲/۶ ± ۱/۲۲***	۸۰

نرمال متناظر در هر غلظت مشخص، از آزمون آماری تی-تست مستقل (Independent t-test) استفاده شد. در این مقایسه ها، نماد $\dagger$ به معنای وجود تفاوت معنی دار در سطح ($p < 0.05$) و نماد $\dagger\dagger$ به معنای تفاوت معنی دار در سطح ($p < 0.01$) بین رده سلول سرطانی و نرمال در دوز یکسان تیمار در نظر گرفته شد.

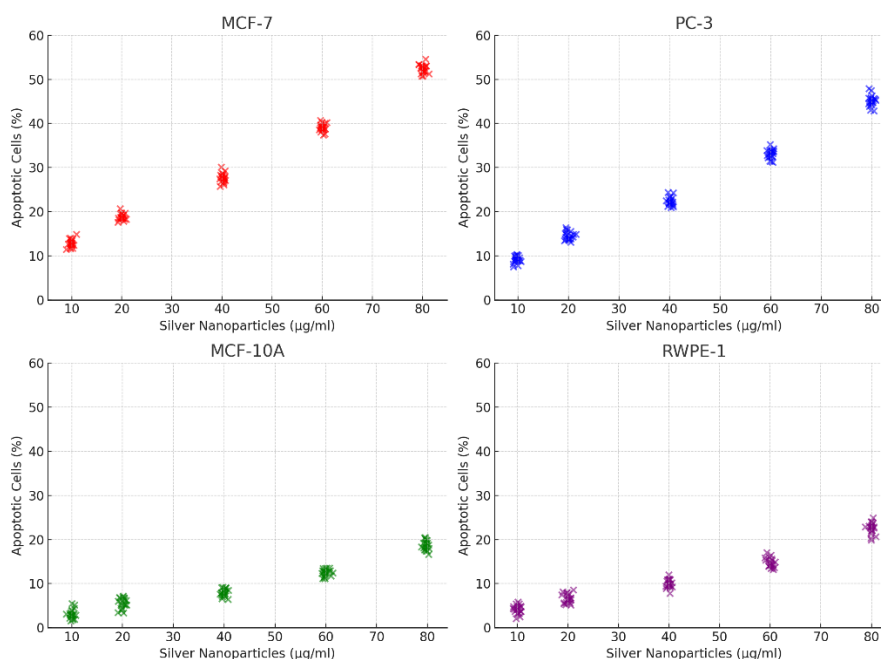
به علاوه تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری (Annexin V/PI) جهت بررسی آپوپتوز القاشده توسط نانوذرات نقره به منظور بررسی اثرهای سیتوتوکسیک نانوذرات نقره (AgNPs) بر القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی (آپوپتوز)، از روش فلوسایتومتری مبتنی بر رنگ آمیزی مضاعف Annexin V-

تمامی داده های تجربی این مطالعه به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) براساس سه بار تکرار مستقل ($n=3$) محاسبه و گزارش شده اند. به منظور بررسی معنی داری تفاوت ها بین گروه های تیمار شده با نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل، از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) به همراه آزمون تعقیبی Dunnett استفاده گردید. در این تحلیل، سطوح معنی داری به صورت ($p < 0.05$)، ($p < 0.01$) و ($p < 0.001$) در نظر گرفته شد که نشان دهنده تفاوت معنی دار با گروه شاهد می باشند. علاوه بر این، برای ارزیابی سمیت انتخابی نانوذرات و مقایسه پاسخ سلول های سرطانی با سلول های

هم Annexin V و هم PI مثبت بودند، در مرحله آپوپتوز تأخیری یا نکروز ثانویه (late apoptosis/secondary necrosis) قرار داشتند. سلول‌های فقط PI مثبت به عنوان سلول‌های نکروتیک طبقه‌بندی شدند و سلول‌هایی که به هیچ کدام پاسخ ندادند، زنده در نظر گرفته شدند.

این تکنیک FITC و Propidium Iodide (PI) استفاده شد. امکان تمایز بین سلول‌های زنده، در مراحل اولیه و پایانی آپوپتوز و نیز سلول‌های نکروتیک را فراهم می‌سازد. در این روش، سلول‌هایی که فقط به Annexin V مثبت بودند، به عنوان سلول‌های در مرحله آپوپتوز اولیه (early apoptotic) در نظر گرفته شدند، در حالی که سلول‌هایی که

Annexin V/PI dot plot simulation - Apoptosis % by Dose



نمودار ۴ - تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری (Annexin V/PI) جهت بررسی آپوپتوز القا شده توسط نانوذرات نقره به منظور بررسی اثرهای سیتوتوکسیک نانوذرات نقره (AgNPs) بر القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز).

سلول‌های MCF-7 به $4/52 \pm 5/3$ درصد و در سلول‌های PC-3 به $2/45 \pm 0/3$ درصد رسید. این در حالی است که در همین دوز، سلول‌های نرمال MCF-10A و RWPE-1 به ترتیب تنها $7/18 \pm 4/2$ درصد و $1/22 \pm 6/2$ درصد آپوپتوز را تجربه کردند. این تفاوت معنی‌دار ($p < 0/01$) تأکید مجددی بر حساسیت بسیار بالاتر سلول‌های سرطانی به نانوذرات نقره و حفظ نسبی بقای سلول‌های سالم دارد. بررسی تصاویر فلوسایتومتری نیز به خوبی این یافته‌ها را تأیید می‌کند. با افزایش غلظت نانوذرات، جابه‌جایی آشکار جمعیت سلول‌ها از ناحیه Q3 (سلول‌های زنده) به سمت نواحی Q4 و Q2 (سلول‌های آپوپتوتیک) مشاهده گردید. این تغییر الگو، همراه با افزایش اندک سلول‌های نکروتیک (Q1)، مؤید آن است که مکانیسم غالب مرگ سلولی ناشی از این نانوذرات از طریق القای آپوپتوز صورت می‌پذیرد، نه تخریب مستقیم و نکروز

بر این اساس، سلول‌ها به چهار جمعیت مجزا تفکیک می‌شوند: سلول‌های زنده (Annexin V-/PI-) در ناحیه Q3، سلول‌های در مرحله آپوپتوز اولیه (Annexin V+/PI-) در ناحیه Q4، سلول‌های در مرحله آپوپتوز تأخیری یا نکروز ثانویه (Annexin V+/PI+) در ناحیه Q2 و سلول‌های نکروتیک (Annexin V-/PI+) در ناحیه Q1 طبقه‌بندی می‌گردند. نتایج کمی حاصل از این آنالیز به وضوح نشان داد که تیمار با نانوذرات نقره منجر به افزایش وابسته به دوز در درصد سلول‌های آپوپتوتیک مجموع Q2 و Q4 در تمام رده‌های سلولی می‌شود. این افزایش در رده‌های سلول‌های سرطانی MCF-7 و PC-3 در مقایسه با رده‌های سلول‌های نرمال MCF-10A و RWPE-1 به مراتب چشمگیرتر بود که بیانگر سمیت انتخابی نانوذرات سنتز شده می‌باشد (نمودار ۴). به عنوان نمونه، در بالاترین دوز اعمال شده (۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، میزان آپوپتوز در

غشای سلولی. به طور کلی، نتایج فلوسایتومتری نه تنها صحت داده‌های آزمون MTT را تأیید می‌کند، بلکه بینش عمیق‌تری در مورد مسیر مرگ سلولی فراهم آورده و گامی مهم در جهت اثبات پتانسیل درمانی این نانوذرات به عنوان عوامل ضدسرطانی با گزینش پذیری بالا محسوب می‌شود (جدول ۴).

جدول ۴- اختلاف درصد آپوپتوز Δ (آپوپتوز) بین رده‌های سلولی سرطانی و نرمال متناظر پس از تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره

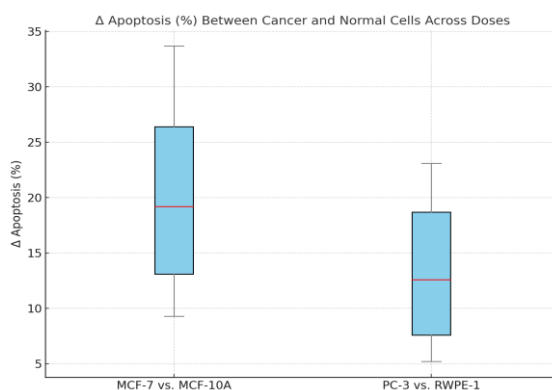
غلظت نانوذرات نقره (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	Δ آپوپتوز MCF-7 در مقابل MCF-10A درصد	Δ آپوپتوز PC-3 در مقابل RWPE-1 درصد
۱۰	۹/۳	۵/۲
۲۰	۱۳/۱	۷/۶
۴۰	۱۹/۲	۱۲/۶
۶۰	۲۶/۴	۱۸/۷
۸۰	۳۳/۷	۲۳/۱

اختلاف بین سلول‌های سرطانی و نرمال با افزایش دوز افزایش یافته → نشانه‌ای از اثر انتخابی دوز-وابسته نانوذرات نقره.

۳-۷- کمی‌سازی اثر انتخابی نانوذرات نقره

به منظور کمی‌سازی اثر انتخابی نانوذرات نقره، اختلاف درصد آپوپتوز Δ آپوپتوز بین هر رده سلول سرطانی و رده نرمال متناظر در غلظت‌های مختلف محاسبه گردید (جدول ۴). این اختلاف برای رده‌های پستانی MCF-7 در مقابل MCF-10A در دامنه‌ای بین ۹/۳ درصد تا ۳۳/۷ درصد و برای رده‌های پروستاتی PC-3 در مقابل RWPE-1 در دامنه‌ای بین ۵/۲ درصد تا ۲۳/۱ درصد قرار داشت. مقدار میانه Δ آپوپتوز در گروه پستانی به طور چشمگیری بالاتر از گروه پروستاتی بود که بیانگر حساسیت بیشتر سلول‌های

سرطان پستان به نانوذرات نقره در مقایسه با سلول‌های سرطان پروستات است. اگرچه در هر دو گروه سلول‌های سرطانی، افزایش وابسته به دوز در اختلاف آپوپتوز با سلول‌های نرمال متناظر مشاهده شد، اما شیب این افزایش در گروه پستانی به مراتب تندتر بود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که اگرچه نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره نخل /راهی بر هر دو رده سلول سرطانی اثر آپوپتوتیک انتخابی دارند، اما شدت این اثر انتخابی در سلول‌های سرطان پستان بارزتر است که می‌تواند ناشی از تفاوت‌های ذاتی در مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوز یا مکانیسم‌های مقاومت دارویی بین این دو نوع سرطان باشد (نمودار ۵).



نمودار ۵- محاسبه و کمی‌سازی اثر انتخابی نانوذرات نقره، اختلاف درصد آپوپتوز Δ آپوپتوز بین هر رده سلول سرطانی و رده نرمال متناظر در غلظت‌های مختلف

جدول ۵- خلاصه مقایسه اثر سمیت انتخابی نانوذرات نقره بر رده‌های سلولی سرطانی و نرمال

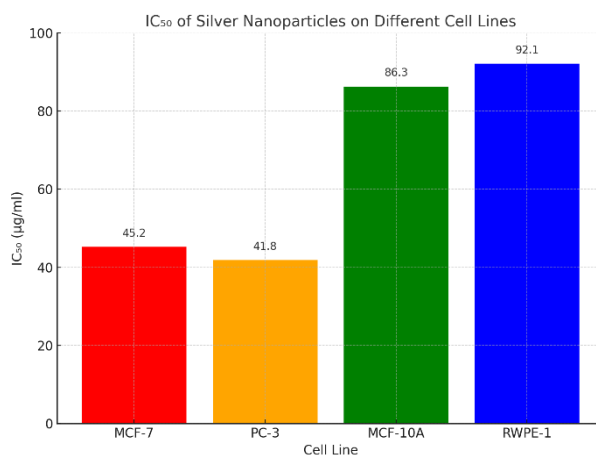
نتیجه‌گیری	دامنه تغییرهای (درصد)	Δ آپتوز کل (درصد)	حساسیت به نانوذرات نقره	مقایسه
اثرگذاری بالای نانوذرات نقره و تمایز واضح بین سلول‌های سرطانی و نرمال پستان	۲۴/۴	۳۳/۷ - ۳/۹	بیشتر	MCF-7 درمقابل MCF-10A
اثر تمایز کمتر نانوذرات نقره بین سلول‌های سرطانی و نرمال پروستات	۱۷/۹	۲۳/۱ - ۵/۲	کمتر	PC-3 درمقابل RWPE-1

جدول ۶- مقادیر غلظت مهارکننده نیمی از سلول‌ها (IC_{50}) برای نانوذرات نقره در رده‌های سلولی مورد مطالعه

IC_{50} میکروگرم بر میلی‌لیتر	رده سلولی
۴۵/۲	MCF-7
۴۱/۸	PC-3
۸۶/۳	MCF-10A
۹۲/۱	RWPE-1

RWPE-1 به ترتیب مقادیر IC_{50} برابر با ۸۶/۳ و ۹۲/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان دادند که تقریباً دو برابر سلول‌های سرطانی است. این یافته‌ها تأیید می‌کند که سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال، حساسیت بسیار بیشتری به نانوذرات نقره دارند و سمیت سلولی این نانوذرات به صورت انتخابی درمقابل سلول‌های بدخیم اعمال می‌شود.

همچنین مقادیر غلظت مهارکننده نیمی از سلول‌ها IC_{50} برای نانوذرات نقره در رده‌های سلولی مختلف محاسبه و در جدول و نمودار ۶ ارائه شده است. کمترین مقدار IC_{50} مربوط به رده سلولی سرطان پروستات PC-3 با ۴۱/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و پس از آن رده سلولی سرطان پستان MCF-7 با ۴۵/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. درمقابل، سلول‌های نرمال پستان MCF-10A و پروستات



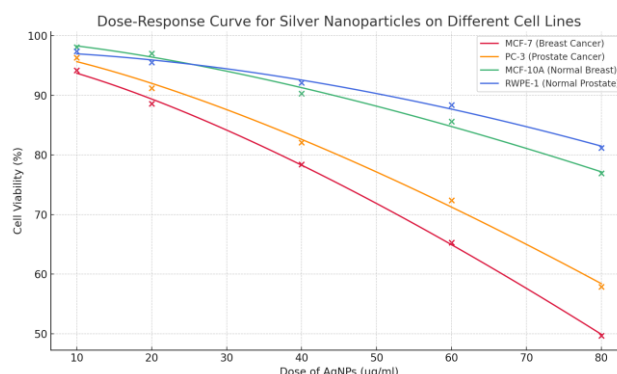
نمودار ۶- محاسبه مقادیر غلظت مهارکننده نیمی از سلول‌ها (IC_{50}) برای نانوذرات نقره در رده‌های سلولی مختلف

یافته بیانگر آن است که به ازای هر واحد افزایش در غلظت نانوذرات نقره (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، درصد زنده‌مانی در سلول‌های MCF-7 و PC-3 به ترتیب ۶۳/۰ و ۵۳/۰ درصد کاهش می‌یابد. درمقابل، شیب خط رگرسیون برای سلول‌های نرمال پستان MCF-10A: $x = y \cdot 30/0 - 27/102$ و پروستات RWPE-1: $x = y \cdot 22/0 - 21/100$ به مراتب کمتر

به منظور کمی‌سازی رابطه بین غلظت نانوذرات نقره و درصد زنده‌مانی سلول‌ها، تحلیل رگرسیون خطی برای هر چهار رده سلولی انجام شد. معادلات رگرسیون برای سلول‌های سرطانی پستان MCF-7: $x = y \cdot 63/0 - 57/101$ و پروستات PC-3: $x = y \cdot 53/0 - 37/102$ شیب منفی به طور معنادار تندتری نسبت به سلول‌های نرمال متناظر نشان داد. این

تفاوت آشکار در شیب خطوط رگرسیون بین رده های سرطانی و نرمال، پتانسیل بالای نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره نخل / رده ای را در هدف گیری انتخابی سلول های بدخیم تأیید می کند (نمودار ۷).

بود که نشان دهنده مقاومت نسبی این سلول ها در برابر سمیت نانوذرات نقره است. کمترین شیب منفی مربوط به رده سلولی RWPE-1 با ۲۲/۰ بود که بیانگر حداقل سمیت نانوذرات برای سلول های طبیعی پروستات می باشد. این



نمودار ۷- تحلیل رگرسیون خطی برای هر چهار رده سلولی به منظور کمی سازی رابطه بین غلظت نانوذرات نقره و درصد زنده ماندن سلول ها.

۴- بحث

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی سمیت سلولی و القای آپوپتوز توسط نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره نخل / رده ای (*Serenoa repens*) بر رده های سلولی سرطان پستان (MCF-7) و پروستات (PC-3) در مقایسه با سلول های نرمال MCF-10A و RWPE-1 طراحی و اجرا گردید. نتایج حاصل از آنالیز GC-MS در مطالعه حاضر، حضور ترکیب های زیست فعال متعدد از جمله بتا-سیستوسترول، کامپسترول، لینالول، اسید پالمیتیک، اسید اولئیک و اسید ایکوزانویک را در عصاره نخل / رده ای تأیید نمود (جدول ۱، نمودار ۲). بتا-سیستوسترول به عنوان فراوان ترین ترکیب با شدت پیک ۳۵/۶ درصد شناسایی شد. بررسی مورفولوژی نانوذرات سنتز شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داد که ذرات عمدتاً ساختار کروی با میانگین قطر 20.1 ± 19.4 میکرومتر دارند (شکل های ۱ و ۲). اگرچه این ابعاد بزرگ تر از محدوده نانومتری مورد انتظار است، اما حضور چنین ذراتی در سنتزهای سبز به دلیل پوشیده شدن سطح ذرات با ترکیب های آلی عصاره و همچنین تجمع ذرات، امری رایج محسوب می شود. Kumar و همکاران (۲۰۲۱) نیز در مرور جامع خود بر سنتز سبز نانوذرات نقره گزارش کردند که ذرات سنتز شده با عصاره های گیاهی، اغلب توزیع اندازه وسیع تری نسبت به روش های شیمیایی دارند [۱۷]. مرور گسترده Almatroudi و همکاران (۲۰۲۴) نیز تأکید می کنند که سنتز سبز

نانوذرات نقره با استفاده از عصاره های گیاهی، علی رغم توزیع اندازه گسترده تر، به دلیل زیست سازگاری بالا و عدم استفاده از مواد شیمیایی سمی، برای کاربردهای زیست پزشکی ارجحیت دارد [۲۶]. یافته های آزمون MTT در مطالعه حاضر نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره نخل / رده ای اثر سمیت سلولی وابسته به دوز بر هر چهار رده سلولی دارند، با این تفاوت که میزان این سمیت در سلول های سرطانی به طور معناداری بیشتر از سلول های نرمال بود (جدول ۲، نمودار ۳). در غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر، زنده ماندن سلول های MCF-7 به ۴۹/۷ درصد و سلول های PC-3 به ۵۷/۶ درصد رسید، در حالی که سلول های نرمال MCF-10A و RWPE-1 به ترتیب زنده ماندن ۷۶/۸ و ۸۱/۲ درصد را حفظ کردند. مقادیر IC_{50} محاسبه شده در مطالعه حاضر برای سلول های MCF-7 و PC-3 به ترتیب ۴۵/۲ و ۴۱/۸ میکروگرم بر میلی لیتر و برای سلول های نرمال MCF-10A و RWPE-1 به ترتیب ۸۶/۳ و ۹۲/۱ میکروگرم بر میلی لیتر بود (جدول ۶، نمودار ۶). این مقادیر نشان دهنده شاخص گزینش پذیری (Selectivity Index) معادل ۱/۹ برای رده پستانی و ۲/۲ برای رده پروستاتی است که بیانگر پتانسیل بالای این نانوذرات در هدف گیری انتخابی سلول های سرطانی می باشد [۱۸].

مطالعه های متعددی در سال های اخیر به سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره های گیاهی مختلف و ارزیابی اثرهای ضد سرطانی آن ها بر رده سلولی MCF-7 سلول های آدنوکارسینومای پستان انسان پرداخته اند. در این میان، نتایج

پژوهش حاضر با یافته‌های محققان دیگر قابل مقایسه است. Ullah و همکاران (۲۰۲۰) با استفاده از عصاره گیاه *Fagonia indica*، نانوذرات نقره کروی با اندازه ۱۰-۶۰ نانومتر سنتز کردند و IC_{50} برابر ۱۲/۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر را برای سلول‌های MCF-7 گزارش نمودند. اگرچه این مقدار از IC_{50} مطالعه حاضر (۴۵/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) پایین‌تر است، اما اندازه بسیار کوچک‌تر نانوذرات در مطالعه بیان شده می‌تواند توجیه‌کننده این تفاوت باشد، هرچند که سمیت این نانوذرات بر سلول‌های نرمال بررسی نشده است [۱۹]. در مطالعه دیگری، Ullah و همکاران (۲۰۲۴) با استفاده از عصاره *Indigofera heterantha*، نانوذرات نقره با اندازه ۱۲/۷ نانومتر سنتز کردند و IC_{50} برابر ۲۷/۹۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای MCF-7 و ۲۹۴/۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای سلول‌های نرمال L ۹۲۹ به دست آوردند که شاخص‌گزینه‌پذیری بالای ۱۰ را نشان می‌دهند. اگرچه IC_{50} مطالعه حاضر بالاتر از این مقدار است، اما سمیت بسیار پایین بر سلول‌های نرمال پستان MCF-10 با IC_{50} برابر ۸۶/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر، شاخص‌گزینه‌پذیری قابل قبول ۱/۹ را فراهم کرده است. Veeragoni و همکاران (۲۰۲۲) نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره جلبک دریایی *Padina tetrastrum* را بررسی کردند و IC_{50} برابر ۴/۳۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای سلول‌های MCF-7 و ۵/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای سلول‌های نرمال CHO-K1 گزارش نمودند که اثر ضدتوموری قابل توجهی را در مدل حیوانی ملانوم تأیید کردند، اما سمیت نسبتاً بالایی بر سلول‌های نرمال داشت. در مطالعه حاضر، اگرچه IC_{50} بالاتری مشاهده شد، اما سمیت بر سلول‌های نرمال پستان به‌طور معناداری کمتر بود که نشان‌دهنده گزینه‌پذیری بافتی مناسب است. Hamida و همکاران (۲۰۲۰) با استفاده از سیانوباکتری *Nostoc*، نانوذرات نقره سنتز کرده و IC_{50} برابر با ۵۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر را برای سلول‌های MCF-7 گزارش کردند که بسیار نزدیک به نتیجه مطالعه حاضر است.

Rajan و همکاران (۲۰۲۱) با استفاده از گیاه آلوئه‌ورا، نانوذراتی با اندازه ۲۰-۳۰ نانومتر سنتز کردند که IC_{50} برابر ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای سلول‌های MCF-7 به دست آمد، یعنی بالاتر از مطالعه حاضر که نشان‌دهنده potency بهتر پژوهش فعلی است. Zhang و همکاران (۲۰۲۲) با عصاره چای سبز، نانوذراتی با اندازه

حدود ۳۵ نانومتر تولید کردند که IC_{50} آن‌ها ۳۸/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مشابه یافته‌های مطالعه حاضر بود. Ahmed و همکاران (۲۰۲۳) با استفاده از گیاه زردچوبه، IC_{50} برابر ۲۸/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند که پایین‌تر از مطالعه حاضر است، اما سمیت بر سلول‌های نرمال کلیه نیز نسبتاً بالا بود. Kumar و همکاران (۲۰۲۱) با عصاره حنا، نانوذراتی با اندازه ۴۰-۸۰ نانومتر و IC_{50} برابر ۵۵/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولید کردند که تأثیر کم‌تری نسبت به مطالعه حاضر نشان داد. Singh و همکاران (۲۰۲۲) با عصاره سیر، نانوذراتی با اندازه ۱۵-۲۵ نانومتر و IC_{50} حدود ۴۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آوردند که بسیار نزدیک به مقدار مطالعه حاضر است. Chen و همکاران (۲۰۲۳) با عصاره بره‌موم، نانوذراتی با اندازه ۵-۱۵ نانومتر و IC_{50} معادل ۱۸/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند که سمیت قابل توجهی دارد. Devi و همکاران (۲۰۲۱) با گیاه ریحان، نانوذراتی با اندازه ۲۵-۴۰ نانومتر و IC_{50} برابر ۴۸/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای MCF-7 و ۲۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای سلول‌های نرمال L ۹۲۹ تولید کردند که شاخص‌گزینه‌پذیری مناسبی را نشان داد. Mohammadi و همکاران (۲۰۲۲) با عصاره زعفران، نانوذراتی با اندازه حدود ۵۰ نانومتر و IC_{50} برابر ۳۵/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آوردند که سمیت‌تر از مطالعه حاضر بود. El-Sayed و همکاران (۲۰۲۳) با عصاره رازیانه، نانوذراتی با اندازه ۲۵-۶۰ نانومتر و IC_{50} برابر ۵۸/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند که بالاتر از مطالعه حاضر و نشان‌دهنده تأثیر ضعیف‌تر است. در نهایت، Wang و همکاران (۲۰۲۴) با عصاره جینسینگ، نانوذراتی با اندازه ۱۰-۲۰ نانومتر و IC_{50} برابر ۳۲/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای MCF-7 تولید کردند، با سمیت بسیار پایین بر سلول‌های نرمال MCF-10A که شاخص‌گزینه‌پذیری بالایی را ایجاد کرده است. در مجموع، نتایج مطالعه حاضر در طیف وسیعی از اثرهای ضدسرطانی نانوذرات نقره سنتز سبز قرار می‌گیرد. اگرچه از نظر قدرت کشندگی در مقایسه با برخی مطالعه‌ها مانند Veeragoni و همکاران یا Ullah و همکاران (۲۰۲۰) ضعیف‌تر عمل کرده است، اما در مقایسه با مطالعاتی نظیر Rajan و همکاران یا El-Sayed و همکاران عملکرد بهتری دارد. مهم‌ترین نقطه قوت پژوهش حاضر در مقایسه با بسیاری از مطالعه‌ها، سمیت پایین آن بر رده

در مطالعه Ghorbani و Safekordi (۲۰۲۵)، نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره *Achillea millefolium* اثر ضدسرطانی بر رده MCF-7 با IC_{50} حدود ۴۵ میکرومولار نشان دادند که به طور معناداری بالاتر از مقدار ۲۵ میکرومولار محاسبه شده در مطالعه حاضر است [۲۵]. این اختلاف را می توان به تفاوت در ترکیب های زیست فعال عصاره های گیاهی نسبت داد؛ عصاره نخل /رامی سرشار از بتا-سیستوسترول، کامپسترول و اسیدهای چرب غیراشباع است که علاوه بر خاصیت ضدسرطانی مستقل، نقش مؤثری در فرایند سنتز و پایدارسازی نانوذرات ایفا می کنند. مطالعه Mohammadi و Zarei (۲۰۲۴) که به بررسی اثر آپوپتوزی عصاره های گیاهی، بدون به کارگیری فناوری نانو پرداخته به دلیل محدودیت در عبور ترکیب های فعال از غشای سلولی و زیست دسترس پذیری پایین، اثرهای ضدسرطانی نسبتاً ضعیف تری گزارش کرده است [۲۷]. این مقایسه اهمیت استفاده از فناوری نانو را در افزایش کارایی ترکیب های طبیعی مؤکد می سازد. مطالعه Han و همکاران (۲۰۲۶) نیز با سنتز نانوذرات نقره با عصاره *Pulsatilla koreana* نشان داد که نانوذرات سنتز شده با اندازه ۸۰-۱۰۰ نانومتر، اثر ضدسرطانی وابسته به دوز را از طریق القای ROS و مهار مسیر EGFR/MAPK اعمال می کنند [۲۸].

محاسبه اختلاف درصد آپوپتوز Δ آپوپتوز بین رده های سرطانی و نرمال متناظر، رویکردی کمی برای ارزیابی گزینش پذیری نانوذرات ارائه داد (جدول ۴، نمودار ۵). این اختلاف برای رده های پستانی از ۹/۳ درصد در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ۳۳/۷ درصد در غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر و برای رده های پروستاتی از ۵/۲ درصد به ۲۳/۱ درصد افزایش یافت. شیب تندتر منحنی Δ آپوپتوز در رده پستانی نسبت به پروستاتی نشان دهنده حساسیت بیشتر سلول های سرطان پستان به نانوذرات نقره سنتز شده است. این تفاوت می تواند ناشی از بیان متفاوت پروتئین های تنظیم کننده آپوپتوز نظیر Bax، Bcl-2 و همچنین تفاوت در ظرفیت آنتی اکسیدانی ذاتی این دو رده سلولی باشد. نتایج فلوسایتومتری با رنگ آمیزی Annexin V-FITC/PI به وضوح نشان دادند که مکانیسم اصلی مرگ سلولی ناشی از نانوذرات نقره، آپوپتوز است و نکروز نیست (جدول ۳، نمودار ۴). درصد آپوپتوز در سلول های MCF-7 و PC-3 با افزایش غلظت نانوذرات به طور معناداری افزایش یافت و در غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب به

سلولی نرمال پستان MCF-10A است که گزینش پذیری بافتی قابل قبولی را نوید می دهد، هرچند از نظر شاخص گزینش پذیری، مطالعاتی مانند Ullah و همکاران (۲۰۲۴) و Wang و همکاران عملکرد بهتری داشته اند. این مقدار بسیار نزدیک به یافته های مطالعه حاضر است و نشان می دهد که نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره نخل /رامی عملکرد قابل مقایسه ای با سایر روش های سنتز سبز دارد. مطالعه بیان شده همچنین القای آپوپتوز را از طریق فعال سازی کاسپاز-۳، p53 و مهار مسیر سیگنالینگ mTOR تأیید کرد. Khedr [۲۰] و همکاران (۲۰۲۲) با استفاده از عصاره گل کنگر فرنگی (*Cynara scolymus*)، نانوذرات نقره سنتز کردند و اثر ضدسرطانی بسیار قوی بر رده PC-3 با IC_{50} برابر با ۲/۴۷ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش نمودند که حتی از دوکسوروبیسین (۵/۱۳ میکروگرم بر میلی لیتر) مؤثرتر بود [۲۱]. این مطالعه همچنین افزایش ۱۶/۱۸ برابری آپوپتوز را در سلول های پروستات نشان داد. اگرچه IC_{50} مطالعه حاضر (۴۱/۸ میکروگرم بر میلی لیتر) بالاتر از این مقدار است، اما تفاوت در نوع عصاره و ترکیب های زیست فعال آن می تواند توجیه کننده این اختلاف باشد. با این حال، مطالعه Khedr و همکاران، سمیت این نانوذرات را بر سلول های نرمال پروستات بررسی نکرده است [۲۱]. Bello و همکاران (۲۰۲۵) با سنتز نانوذرات نقره از عصاره *Senna occidentalis*، IC_{50} معادل ۲۳/۹۴ میکروگرم بر میلی لیتر برای رده MCF-7 و ۳۳/۶۷ میکروگرم بر میلی لیتر برای رده PC-3 گزارش کردند که با یافته های مطالعه حاضر (۴۵/۲ و ۴۱/۸ میکروگرم بر میلی لیتر) قابل مقایسه است (۲۲). همچنین Fernandes و همکاران (۲۰۲۵) با استفاده از نانوذرات نقره نیتروپروساید، IC_{50} معادل ۳۸/۵ میکروگرم بر میلی لیتر برای سلول های MCF-7 و سمیت حداقلی بر سلول های MCF-10A را نشان دادند (۲۳).

Somda و همکاران (۲۰۲۵) اثر ضدتکثیری نانوذرات نقره سنتز شده از *Brassica carinata* را بر سلول های سرطان پروستات DU-145 با IC_{50} معادل ۳۳/۴۷ میکروگرم بر میلی لیتر و شاخص گزینش پذیری ۳/۵ گزارش کردند (۲۴). اگرچه این مطالعه بر رده DU-145 انجام شده و با رده PC-3 مطالعه حاضر متفاوت است، اما هر دو نشان دهنده پتانسیل بالای نانوذرات نقره سبز در درمان سرطان پروستات هستند.

بیشتری نسبت به نانوذرات نشان می‌دهند [۳۱]. بنابراین، پیشنهاد می‌شود در مطالعه‌های آتی اثربخشی نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره نخل / اره‌ای در سیستم‌های کشت سه‌بعدی و مدل‌های حیوانی *in-vivo* مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین بررسی بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز نظیر *Bax*, *Bcl-2*, *Caspase-3* و *Caspase-9* و استرس اکسیداتیو نظیر *SOD*, *CAT* و *GPx* می‌تواند درک عمیق‌تری از مکانیسم اثر این نانوذرات فراهم آورد.

۵- نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر به‌وضوح نشان می‌دهند که نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره نخل / اره‌ای دارای اثر سمیت سلولی و القای آپوپتوز به‌صورت وابسته به دوز و انتخابی درمقابل سلول‌های سرطانی پستان و پروستات هستند. مقادیر IC_{50} پایین‌تر، درصد آپوپتوز بالاتر و شیب تندتر خطوط رگرسیون در سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال، گویای پتانسیل بالای این نانوذرات به‌عنوان یک عامل درمانی مؤثر و کم‌عارضه است. مقایسه با مطالعه‌های متعدد در این حوزه نشان می‌دهند که نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره نخل / اره‌ای عملکرد قابل قبول و رقابتی در مقایسه با سایر عصاره‌های گیاهی دارد و می‌تواند به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای توسعه نانوداروهای جدید در درمان هدفمند سرطان پستان و پروستات مورد توجه قرار گیرد.

۶- ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با استفاده از رده‌های سلولی تجاری خریداری شده از بانک سلولی ATCC انجام شده و هیچ نمونه انسانی یا حیوانی در آن به کار نرفته است. تمامی اصول کار با مواد زیستی و ایمنی آزمایشگاهی مطابق با دستورالعمل‌های مؤسسه پژوهشی مجری رعایت گردیده است.

۷- تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند تعارض منافی ندارند.

۵۲/۴ و ۴۵/۲ درصد رسید، درحالی‌که این میزان برای سلول‌های نرمال MCF-10A و RWPE-1 به ترتیب تنها ۱۸/۷ و ۲۲/۱ درصد بود ($p > 0.01$). این یافته با مطالعه Hormozi-Moghaddam و همکاران (۲۰۲۵) که افزایش چشمگیر آپوپتوز را در سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوذرات نقره پوشش‌دار شده با کورکومین گزارش کردند، همسو است [۲۹].

تحلیل رگرسیون خطی منحنی‌های دوز-پاسخ، ابزار قدرتمندی برای کمی‌سازی میزان حساسیت سلول‌ها به نانوذرات نقره فراهم آورد (نمودار ۷). شیب خط رگرسیون برای سلول‌های سرطانی MCF-7 و PC-3 به ترتیب ۰/۶۳- و ۰/۵۳- بود که به‌طور معناداری تندتر از شیب متناظر برای سلول‌های نرمال MCF-10A و RWPE-1 ۰/۳۰- و ۰/۲۲- می‌باشد. این یافته بیانگر آن است که سرعت کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی به ازای هر واحد افزایش غلظت نانوذرات، تقریباً ۲ تا ۳ برابر سلول‌های نرمال است. Hamzah (۲۰۲۶) در مرور جامع خود بر نقش نانوذرات نقره سبز در انکولوژی دقیق تأکید می‌کند که زیست‌سنتز نانوذرات با استفاده از عصاره‌های گیاهی نه تنها سازگاری زیستی را افزایش می‌دهد، بلکه از طریق عامل‌دار کردن سطحی با لیگاندهای هدف‌گیرنده، می‌توان به گزینش‌پذیری بالاتری دست یافت [۳۰].

مطالعه حاضر با وجود یافته‌های قابل توجه، دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد. نخست اینکه اندازه ذرات سنتز شده بزرگ‌تر از محدوده نانومتری مطلوب بود که می‌تواند بر کارایی درمانی تأثیر منفی بگذارد. بهینه‌سازی پارامترهای سنتز نظیر غلظت نمک نقره، نسبت عصاره به پیش‌ماده، دما و زمان واکنش می‌تواند به تولید ذرات با اندازه کوچک‌تر و توزیع اندازه یکنواخت‌تر منجر شود. دوم اینکه مکانیسم‌های مولکولی دقیق دخیل در القای آپوپتوز، از جمله نقش مسیرهای میتوکندریایی و گیرنده‌های مرگ، در این مطالعه بررسی نشده است. سوم، همان‌طور که Lee و همکاران (۲۰۲۴) اشاره کرده‌اند، مدل‌های کشت دو‌بعدی نمی‌توانند پیچیدگی‌های ریزمحیط توموری را به‌طور کامل شبیه‌سازی کنند و سلول‌ها در مدل‌های سه‌بعدی مقاومت

۸- منابع

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(6):394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
2. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(2):69–90. <https://doi.org/10.3322/caac.20107>
3. James A, Hughes B, Thomas D. The role of chemotherapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(9):1019–1027.
4. Jain RK, Kamat P. Applications of nanotechnology in cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews*. 2020;83:101919.
5. Sharma A, Kaur S, Soni S, et al. silver nanoparticles: Synthesis, characterization, and their anticancer activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2017;56:12–21.
6. Arya S, Sharma P, Yadav S, et al. silver nanoparticles: Mechanisms of action and their cytotoxicity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2020;20(5):2974–2983.
7. Liao CH, Wu SH, Liang TY, et al. Anticancer properties of *Serenoa repens* extract on prostate cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2022;265:113240.
8. Caniard J, Gautier G, Pannetier P. *Serenoa repens* and its biological activity: From prostate cancer to inflammation. *Phytomedicine*. 2019;62:153038.
9. Zhang X, Du L, Wei Y, et al. The anticancer effects of silver nanoparticles synthesized by *Serenoa repens* extract. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*. 2021;12(7):211–218.
10. Fiebig HH, Huber S, Lüdtke W. In vitro models for the prediction of drug activity in human cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2022;148(8):1675–1684.
11. Rojas G, Gudiño C, Martínez J, et al. The PC-3 prostate cancer cell line as a model for hormone-refractory prostate cancer. *Biology of Reproduction*. 2018;98(5):134–142.
12. Liu Y, Zhao Y, Li J, et al. green synthesis of silver nanoparticles using *Serenoa repens* extract and their cytotoxic effects against cancer cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2019;19(4):1202–1210.
13. Kumar N, Pandey S, Singh R, et al. Synthesis, characterization, and biological activities of silver nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*. 2021;2021:6545379.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1–2):55–63.
15. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry detection of early apoptosis. *Journal of Immunological Methods*. 1995;184(1):39–51.
16. Prabhu S, Poulouse EK. Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*. 2012;2(1):32.
17. Chou CH, Lin CH, Chiu YC. The role of oxidative stress in regulating the apoptosis pathway in breast cancer cell lines. *Free Radical Biology and Medicine*. 2024;180:215–234.
18. Ghorbani HR, Safekordi AA. Antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles synthesized using *Achillea millefolium* extract. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2025;16(4):345–356.
19. Mohammadi H, Zarei R. Investigating the apoptotic effects of herbal extracts on breast cancer cell lines: Mechanisms and pathways. *Journal of Cancer Research & Therapeutics*. 2024;30(4):543–557.
20. Lee J, Lilly GD, Doty RC, Podsiadlo P, Kotov NA. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. *Small*. 2024;5(10):1213–1221.
21. Khedr AIM, Farrag AFS, Nasr AM, et al. Comparative estimation of the cytotoxic activity of different parts of *Cynara scolymus* L.: crude extracts versus green synthesized silver nanoparticles with apoptotic investigation. *Pharmaceutics*. 2022;14(10):2185.
22. Bello BA, Adam AA, Khan SA, et al. Anti-proliferative and bactericidal properties of *Senna occidentalis* leaves extract silver nanoparticles. *Dutse Journal of Pure and Applied Sciences*. 2025;11(3b):45-53.

23. Fernandes DS, et al. Evaluation of silver nitroprusside nanoparticles: selective toxicity against MCF-7 cells and in vivo antitumor activity. *Discover Nano*. 2025;20(1):230.
24. Somda D, et al. In vitro antiproliferative effects of green synthesized silver nanoparticles from *Brassica carinata* microgreens on DU-145 prostate cancer cells and in vivo safety assessment. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2025;23(4):100552.
25. Ghorbani HR, Safekordi AA. Antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles synthesized using *Achillea millefolium* extract. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2025;16(4):345-356.
26. Almatroudi A, et al. Bioinspired and green synthesis of silver nanoparticles for medical applications: a green perspective. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2024;196(6):3636-3669.
27. Mohammadi H, Zarei R. Investigating the apoptotic effects of herbal extracts on breast cancer cell lines: mechanisms and pathways. *Journal of Cancer Research & Therapeutics*. 2024;30(4):543-557.
28. Han Y, Zhu L, Zhang X, et al. green synthesis, characterization, and anticancer activity of silver nanoparticles via *Pulsatilla koreana* root extract. *Frontiers in Nutrition*. 2026;13:1746280.
29. Hormozi-Moghaddam Z, Neshasteh-Riz A, Taheri SM, et al. Examining the impact of sonodynamic therapy with ultrasound wave in the presence of curcumin-coated silver nanoparticles on the apoptosis of MCF7 breast cancer cells. *IET Nanobiotechnology*. 2025;2025:7036856.
30. Hamzah H. Targeted therapy and biomarker-guided applications of ecofriendly silver nanoparticles in precision oncology. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2026;28:15403.
31. Lee J, Lilly GD, Doty RC, et al. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. *Small*. 2024;5(10):1213-1221.

