



دانشکده طب سنتی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی

رساله

جهت دریافت درجه دکترای تخصصی Ph.D. داروسازی سنتی

عنوان

**تهیه و ارزیابی مقایسه‌ای برون‌تنی سمیت سلولی نانوذرات نقره با کشته
نقره جهت درمان سرطان در طب سنتی ایران**

اساتید راهنما

دکتر محمود مصدق

دکتر سهیلا هنری

اساتید مشاور

دکتر فرزانه نقیبی

نگارش

دکتر علیرضا مظفری دهشیری

چکیده

عنوان: تهیه و ارزیابی مقایسه‌های برون‌تنی سمیت سلولی نانوذرات نقره با کشته نقره جهت درمان سرطان در طب سنتی ایران.

پیش زمینه: امروزه ترکیبات نقره هم سمی و هم سرطان‌زا دانسته می‌شود (در نظر گرفته می‌شود) نانو ذرات نقره ارزش تشخیصی و درمانی دارند پزشکان طب سنتی پاکستان و ایران امتیازاتی برای یک دسته از ترکیبات نقره به نام کشته نقره در نظر گرفته‌اند جهت درمان زوال عقل و جذام و سرطان مانند سرطان پوست کشته‌های نقره پاکستانی و ایرانی از فرآیند تکلیس بدست می‌آیند.

هدف: با توجه به اثرات سمی آزمایشات درون بدنی سه ترکیب نقره را از طریق این مطالعه مورد هدف قرار دادیم که تعیین کنیم میزان IC50 یا زنده مانی ترکیبات نقره را، درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی سه ترکیب نقره بر روی سلول‌های سرطانی از طریق پروتکل ارزیابی با آزمایش MTT تعیین گردید.

روش کار: نانو نقره تولید شده از روش بکارگیری احیاء شیمیایی با استفاده از نیترات نقره و سدیم بورهیدرید و کیتوزان H (با وزن مولکولی بالا) در ۴ درجه سانتیگراد بدست آمد. کشته نقره ایرانی در محیط سربسته به روش عقیلی در دمای ۹۶۰ درجه سانتیگراد تهیه شد. ما در این مطالعه نانوذرات نقره را با کشته‌های نقره را از نظر خواص فیزیکوشیمیایی مقایسه کردیم. خواص فیزیکوشیمیایی سه ترکیب نقره شامل کشته نقره ایرانی، کشته نقره پاکستانی و نانو نقره به روش میکروسکوپ الکترونی (SEM) و FTR و اندازه‌گیری جذب طیف قابل رویت (UV) و آنالیز پراکندگی انرژی اشعه X (EDAX) و تفرق اشعه X (XRD) مورد بررسی قرار گرفت هدف در این مطالعه ما اثرات سمی نانونقره را به همراه کشته‌های نقره ایرانی و پاکستانی بر روی سلول‌های اولیه کبدی موش از نژاد (Sprague Dwelly) بررسی نمودیم.

نتایج: نتایج میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نانونقره و کشته نقره پاکستانی نه تنها از اندازه ذره‌ای بلکه از شکل هندسی مشابه بودند و این کشته‌ها شکل‌های مختلفی مانند کروی شکل سنگ شکل و صفحه‌های شکل را دارا هستند اگرچه تنوع اندازه و شکل بین کشته‌های پاکستانی و نانونقره بیشتر است و در مورد کشته ایرانی و نانو نقره این تشابه در کمترین وضعیت قرار دارد چرا که اشکال شبه کروی در هر دو نوع نانو نقره و کشته نقره بیشتر است و در محتوای نقره (درصد نقره) در کشته‌های پاکستانی و ایرانی به ترتیب ۶۶/۲۴ درصد و ۵۰/۴۳ درصد است و در مورد نانو نقره ۹۲٪ می‌باشد. آزمایشات سمیت سلولی بکارگیری هر دو نوع کشته نقره ایرانی و پاکستانی به روش MTT به ترتیب تا غلظت‌های 0.277 و 3.86 سمیتی را بر روی (سلول‌های

طبیعی (MDBK) و سرطانی (A549 و HT29 و MCF7 و HepG2) نشان نمی‌دهد اما نانو نقره سمیت سلولی را بر روی رده‌های سلولی طبیعی و سرطانی بجز HT29 (سلول‌های سرطانی روده) نشان داد و IC_{50} محاسبه شده در همه موارد رده‌های سلول‌های سرطانی کمتر از 10PPM بود البته این تاثیرات سمی بر روی سلول‌های کبدی موش نیز دیده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: توسعه بکارگیری زتاسایزر و دیگر تکنولوژی‌های توسعه شده خصوصیات این ذرات (نقره‌ای) را بیان کرد طبق بررسی انجام شده در این تحقیق که با استفاده از روش‌های MTT و تریپان بلو بر روی سلول‌های طبیعی (MDBK) و سرطانی (A549 و HT29 و MCF7 و HepG2) و سلول‌های اولیه کبدی موش (رت) اثر سمیت سلولی در کشته‌های ایرانی و پاکستانی تا غلظت‌های به ترتیب غلظت‌های 0.277 و $3.86 \mu\text{g/ml}$ مشاهده نگردید. به نظر می‌رسد ترکیبات نقره قدیمی (کشته نقره ایرانی و پاکستانی) نمی‌توانند از غشای سلول‌های سرطانی عبور کنند.

واژگان کلیدی: کشته نقره پاکستانی، کشته نقره ایرانی، طب سنتی، تست تریپان بلو، تست MTT، سرطان و رده سلولی، سمیت سلولی.

Abstract

Title: Preparation and Comparative Evaluation of In-vitro Cytotoxicity of Nano Silver Particles with Silver Kushta Regarding Cancer Treatment in Iranian Traditional Medicine

Background: Nowadays, silver compounds are known to be both toxic and carcinogenic; however, silver nanoparticles have showed diagnostic and therapeutic value. Pakistani and Iranian traditional medicine physicians have taken advantages of silver compounds, called silver Kushta, to treat dementia, leprosy, and skin cancers. Silver kushtas: Pakistani silver Kushta (PkAg) & Iranian silver Kushta (IkAg) are formed through a specific calcinations process.

In this study we have compared silver nanoparticles (AgNps) with silver Kushtas in terms of physicochemical properties. Regarding to the in-vitro cytotoxicity of three silver components, through the study we aim to determine IC₅₀ or viability range of these silver components. The percentage of availability of cancer cell was measured by MTT assay protocol.

Methods: AgNps were produced via employing chemical reduction method using AgNO₃, NaBH₄, and H chitosan (High Molecular Weight) at 4⁰C. PkAg powder was purchased from Hamdard pharmaceutical company. IkAg powder was produced by closed reactor (Aquili) method at 960⁰C. Physicochemical properties of all three compounds (IkAg&PkAg) and AgNps were examined by scanning electron microscopy (SEM), zeta sizer, and Fourier Transform Infrared (FTIR), uv visible spectrum Absorbance measurement, EDAX (Energy Dispersive X-ray analysis) and XRD (X-ray Diffraction). Furthermore, in this study we investigated the cytotoxic effects of AgNps and silver components (IkAg&PkAg) on liver primary cells of Male Sprague-Dawley rats (trypan blue test).

Results: SEM Results showed that AgNps and PkAg were similar in terms of not only particle size, but also geometrical shapes. Besides, SEM results illustrated that both silver Kushtas show different shapes such as spherical, rock and plate forms. However, the diversity of sizes and shapes between PkAg and AgNPs owing to a higher proportion of pseudo-spherical particles in both samples. But IKAg shows less pseudo-spherical shapes. Silver content of PkAg, IkAg and AgNps are 66.24%, 50.43% 92%, respectively.

Both silver kushtas (IkAg&PkAg) possess no toxicity for cancer and normal cell lines A549, HT29, MCF7, HepG2 MDBK (but AgNps showed toxicity against normal and cancer cell lines except HT29 but both kushtas (IkAg&PkAg) show maximum serial dilution concentration up to 0.277 and 3.86 $\mu\text{g/ml}$ of kushtas powders concentration respectively. The calculate IC50for cancerous cells were less than 10PPM. Also, this toxic effect is obvious on liver primary cells of the rats.

Discussion & Conclusion: The development of new zeta sizers and other advanced technologies have enabled a more complete characterization of the physico chemical properties of the particles. According to result of our survey by employing cytotoxic tests such as MTT and trypan blue silver kushtas (IkAg&PkAg) showed no or limited toxicity up to maximum serial dilution 0.277 and 3.86 $\mu\text{g/ml}$ of kushtas powders concentration respectively because the ancient silver components (IkAg) & (PkAg) particles cannot pass through the cancerous cell membrane.

Keywords: Pakistani silver kushtas (PkAg), Iranian silver kushtas (IkAg), AgNPs, Traditional medicine, Trypan blue test, cytotoxicity, MTT test, cancer, cell line, cell cytotoxicity.