



سمیت زیستی نانوذرات نقره

فاطمه میرزاجانی^{۱،۲*}

^۱ عضو هیئت علمی، مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
^۲ عضو هیئت علمی، دانشکده انرژی و فناوری های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۳/۳۰

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۳

Nanotoxicity: Silver Nano Particles

Fateme Mirzajani^{1,2}

¹ Faculty of New Technologies Engineering (NET), Shahid Beheshti University, G.C., Tehran, Iran.

² Protein Research Center (PRC), Shahid Beheshti University, G.C., Tehran, Iran.

Abstract

Nanoparticles with a wide range of unique features have been allocated many applications in the field of nanotechnology. Their special properties and their interaction with biological molecules have grabbed the attention of many researchers. These particles, because of their small size and unique characteristics, can be used in various fields, especially the life sciences. Because the lack of any logical model of nanoparticle and biomolecule interaction, their properties and influences on the environment have been evaluated using various separate and non-comparable studies. Nanoparticles interact with plants, animals, and humans and have various and essential impacts on them and these should be considered. The aim of this article is to conduct a morphological and proteomic study of the interaction of biomolecular, bacterial and plant models with silver nanoparticles. The findings are associated with trypsin and human blood serum albumin (as a molecular model), *Staphylococcus aureus* and *Bacillus Thuriensis* (as bacterial models) and *Oryza sativa* L. (rice) as a plant model.

Key words: Proteomics, Morphological study, Silver Nanoparticles, *S. aureus*, *B. Thuriensis*, *Oryza sativa* L.

چکیده

امروزه نانوذرات سنتزی گستره وسیعی از ذرات با ویژگی‌های منحصر به فرد را دربر می‌گیرند و کاربردهای زیادی در حوزه نانو تکنولوژی دارند. خواص ویژه نانوذرات و برهمکنش آنها با مولکول‌های زیستی توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. این ذرات به دلیل اندازه کوچک و ویژگی‌های منحصر به فرد، قابلیت استفاده در علوم مختلف، مخصوصاً علوم زیستی را دارند. بررسی‌های گذشته در حوزه نانوذرات نشان می‌دهند که به دلیل عدم وجود یک مدل منطقی از برهمکنش این ذرات با مولکول‌های زیستی، تاکنون از روش‌های آزمایش و خطا به ویژگی‌های یک نانوذره و اثرات آن بر محیط و واکنش و مولکول‌های حاضر در آن محیط پی می‌برند. به دلیل ورود این ذرات به گیاهان و بدن جانوران، و مخصوصاً استفاده روزافزون آنها در محصولات مورد استفاده انسان، بررسی اثرات ایجاد شده توسط این ذرات بر مولکول‌ها و میزبان‌های زیستی ضروری به نظر می‌رسد. در این مقاله مروری اثرات سمی نانو ذرات نقره در محیط‌های زیستی و آثار مخرب آنها بررسی شد و نتایج پژوهش‌های بین‌المللی در حوزه‌های مختلفی از جمله مولکول‌های زیستی، میکروارگانیسم‌ها، گیاهان، جانوران و انسان مرور شده است. در این میان یافته‌های مرتبط با تریپسین و آلبومین سرم خونی انسانی در حوزه رفتارهای مولکولی، باکتری‌های *Bacillus thuriensis* و *Staphylococcus aureus* در زیرمجموعه باکتریایی و گیاه *Oryza sativa* L. (برنج)، از نظر ریخت‌شناسی و پروتئومیکس به‌طور ویژه مورد توجه قرار گرفته‌اند.

کلمات کلیدی: پروتئومیکس، بررسی‌های ریخت‌شناسی، نانوذرات نقره، *Oryza sativa* L.، *Bacillus thuriensis*، *Staphylococcus aureus* (برنج)

* Corresponding Author. E-mail Address: f_mirzajani@sbu.ac.ir

۱- مقدمه

فناوری نانو وابسته به اندازه مواد در مقیاس نانومتر (10^{-9} متر) است. این ویژگی‌ها در برخی موارد شامل نمایان شدن اثرهای کوانتومی مخصوص نانو مواد است. همین نشانه‌ها بیانگر ویژگی‌های مربوط به اندازه ذره‌ای و نیز موجب ایجاد احتمال فعالیت زیستی وابسته به اندازه هستند. مفهوم بی‌نظیر بودن اغلب هنگام بحث درباره آنچه که نانو را در زمینه ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی متفاوت جلوه می‌دهد به کار می‌رود [۱]. جالب توجه‌ترین ویژگی این دست مواد، توانایی عبور و یا امکان غلبه بر سد هایی است که برای ساختارهای شیمیایی مشابه با اندازه درشت تر نفوذناپذیرند. بسیاری از فواید نانومواد آشکار شده و بسیاری دیگر نیز در پرده ابهام قرار دارند. نقره (Ag) به شکل خالص، آلیاژ با سایر فلزات یا نمک استفاده می‌شود. گزارش شده که این عنصر در حالت یونی و در غلظت‌های کنترل شده اثرات ضد باکتری، ویروس، قارچ و مخمر داشته و اثرات منفی برای انسان ندارد [۲]. با این حال، کاربرد بیش از حد و ایجاد آلودگی‌های ناشی از غلظت بالای آن باعث صدمات جبران‌ناپذیر به فلور میکروبی خاک، گیاهان، جلبک‌ها، ماهیان و قارچ‌ها می‌شود [۳-۶]. از سوی دیگر یون نقره (Ag^+) در محیط معده، به نمک کلرید با محلولیت پایین تبدیل شده و اثر کمتری دارد، حال آنکه نانو ذرات نقره (Ag^0) از این فرایند محفوظ مانده و اثرات شدیدتر و پایدارتری دارند [۷].

۲- اثرات زیستی یون نقره، کلرید نقره ($AgCl$) و نانوذرات نقره

مشخص شده است که Ag^+ عامل تغییر در میزان نفوذپذیری غشاء سلول نسبت به K^+ است. همچنین موثر بر فعالیت K^+-ATP و عملکرد میتوکندری بوده و تمایل شدیدی برای اتصال نسبت به یون‌های فلزی دارد. این ذرات به پروتئین‌های حاوی گروه‌های تیولی ($-SH$) متصل شده و منجر به غیر فعال کردن آنها و تولید ROS شده و به همین دلایل در غلظت‌های بالاتر از حد خاصی اثرات سمی دارد [۵ و ۸]. در سال ۲۰۰۰، Feng و همکارانش مکانیسم اثر Ag^+ بر دو باکتری *S. aureus* و *E. coli* را به ترتیب به عنوان مدل‌های باکتریایی گرم منفی و مثبت بررسی کردند [۹]. آنها مشاهده کردند که ساختار طبیعی DNA از بین رفته و قطعات آن در

قسمتی از سلول، تجمع و متراکم شده است. همچنین بررسی‌های بررسی‌ها با اشعه X وجود گرانول‌هایی با چگالی بالا را بر سطح غشاء و دیواره، سیتوپلاسم و سطح DNA تأیید می‌کردند. با توجه به نتایج ذکر شده در مورد مکانیسم اثر Ag^+ بر باکتری، دو فرضیه بیان شد؛ اول آنکه در اثر برهمکنش و اتصال Ag^+ به DNA، ماده ژنتیکی توانایی همانندسازی را از دست داده و در ادامه تقسیم سلولی متوقف می‌شود. از سوی دیگر Ag^+ تمایل شدیدی به گروه‌های عاملی تیول در پروتئین‌ها داشته و به همین جهت بسیاری از آنزیم‌ها را در سیتوپلاسم غیرفعال می‌کند [۹].

اینکه سمیت Ag^0 تا چه مقدار وابسته به حالت یونی یا نانویی است در پرده ابهام قرار داشته و نظریه‌های متفاوتی در این زمینه وجود دارد. در جدیدترین بررسی‌ها در سال ۲۰۱۲، Beer و همکارانش اثرات این دو را بر سلول‌های سرطان ریه انسان مقایسه کردند [۱۰]. آنها وابستگی اثرات سمیت سلولی را به نحوه تهیه نانو ذرات و غلظت Ag^+ و پارامترهای مرگ ناگهانی/برنامه‌ریزی شده سلولی، تولید ROS و رفتار چرخه سلولی را بررسی کرده‌اند. نتایج حاکی از آن است که نسبت غلظت این دو به هم و غلظت کل یون نقره در محیط در نتیجه نهایی و سمیت محلول اثر فوق‌العاده‌ای دارد. در حضور نانو ذرات کروی با اندازه ۵۰-۳۰ nm و پوشش سطحی PVP که دارای ۳۹٪ یون نقره در محیط خود هستند ۹۲٪ سلول‌ها زنده مانده‌اند در حالی که وقتی غلظت به ۶۴٪ افزایش می‌یابد درصد زنده‌مانی تا ۵۴٪ کاهش می‌یابد. آنها نشان می‌دهند که اثر سمیت مایع رویی محلول نانو ذرات پس از سانتیفریوژ و در مورد سلول‌های ریه که حاوی بیش از ۵/۵٪ یا بیشتر یون باشد، مربوط به یون نقره بوده و با سمیت خود ذرات یکسان است. اما وقتی غلظت یونی در مایع رویی به ۲/۶٪ و یا کمتر برسد، این مایع اثری نداشته و ذرات نقش اصلی را در سمیت دارند [۱۰].

۳- سمیت زیستی

برخی تحقیقات نشان می‌دهند که Ag^0 ، پنجاه برابر از آزیست سمی تر است. در مورد میزان و نحوه تأثیر Ag^0 نتایج قطعی و کاملی وجود ندارد. بسیاری بر این عقیده‌اند که نانوذرات نقره علاوه بر اینکه خود سمی هستند با آزادسازی یون نقره در محیط، اثرات سمی Ag^+ را نیز از خود بروز

می‌دهند [۵ و ۱۰-۸]. رفتارهای زیستی نانو ذرات نقره به ویژگی‌های آن وابسته است. علاوه بر آن، نوع ساختار زیستی درگیر نیز در میزان سمیت مؤثر است.

۳-۱- برهم‌کنش با مولکول‌های زیستی

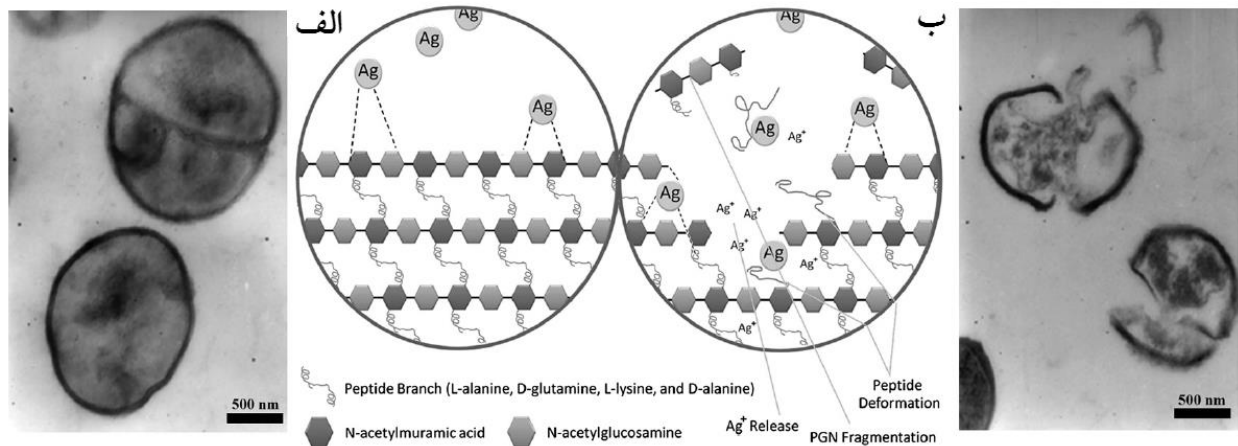
اولین بررسی‌ها درباره تأثیر نانو ذرات نقره بر مولکول‌های زیستی به سال ۲۰۰۴ برمی‌گردد [۱۱]. Li و همکارانش تغییرات الگوی CD مولکول‌های زیستی کایرال را بررسی کردند برهم‌کنش‌های نانو ذرات نقره با اسیدهای آمینه سیستئین، گلوتامین، لیزین و ترکیبات پنیسیل آمین، گلوکاتین و سیستئین متیل استر حاکی از آن بود که الگوی CD ساختارهای حاوی گروه عاملی تیول، مانند سیستئین، پس از تماس با نانو ذرات نقره به شدت دچار تغییر می‌شود [۱۲]. آنها این موضوع را به نزدیک بودن ماهیت عنصری (عناصر نرم) این دو نسبت می‌دهند. بررسی‌های آنها زمینه بسیاری از تحقیقات دیگر بر پایه تمایل نانو ذرات نقره به گوگرد شد. Chio و همکارانش این ویژگی را راهکاری برای کاهش آلودگی محیطی نانو ذرات معرفی کرده‌اند [۱۳]. بررسی پایداری نانو ذرات نقره در حضور لیگاندهای $EDTA^{4-}$ ، PO_4^{3-} ، Cl^- ، S^{2-} ، SO_4^{2-} که غلظت نانو ذرات در حضور S^{2-} نسبت به سایرین کمترین مقدار را دارد. نتایج آنالیز اشعه ایکس نشان داد که نانو ذرات نقره در حضور این لیگاندها، کمپلکس Ag_xS_y تولید کرده و رسوب می‌کنند. با توجه به این نتایج دور از ذهن نیست که پروتئین‌ها، به خصوص از بخش‌هایی مانند اسید آمینه سیستئین، با نانو ذرات برهم‌کنش بدهند. بررسی‌ها حاکی از آن است که بخش‌های SH- پروتئین‌های پیام‌گیر در باکتری‌ها و آنزیم‌های سیتوپلاسمی، تمایل شدیدی به واکنش با نانو ذرات نقره دارند [۱۴ و ۱۵]. دلیل دیگر برهم‌کنش با مولکول‌های زیستی ماهیت و ویژگی نانو است. اولین دریافت پیام‌های سطحی و درک سلولی متعاقب آن، به دنبال برهم‌کنش اولیه نانو ذرات و دریافت‌کننده‌های سیگنال (پروتئین‌ها یا پلی‌ساکاریدها) روی دیواره یا غشاء است. مشخص شده که سطوح و پاسخ‌های سلولی به واسطه جذب نانو ذرات تغییر می‌کنند. برهم‌کنش‌های نانو ذرات-پروتئین بر فرایند فیبریلاسیون آنها تأثیر می‌گذارد [۱۶ و ۱۷]. همچنین چسبیدن نانو ذرات به مولکول گیرنده‌های خارج سلولی

خانواده گیرنده‌های چسبندگی مانند اینتگرین، سلکتین، ایمونوگلوبولین و کادرین داخل دریافت‌های محیطی و ارتباطات سلولی را به همراه دارد [۱۸].

تحقیقاتی در زمینه برهم‌کنش‌های نانو ذرات-مولکول‌های زیستی و ادراک سلولی از آنها توسط Dawson و Lynch انجام شده است [۱۸-۱۶]. برهم‌کنش نانو ذرات با ماکرومولکول‌های زیستی تاج یا "کرونا" نامیده می‌شود. نانو ذرات پپتیدهای کوچک را روی سطح‌شان جذب می‌کنند و آنچنان برهم‌کنشی با تاج پروتئین‌های بزرگ دارند که فعالیت این مولکول‌ها مختل می‌شود [۱۶ و ۱۷]. این در حالی است که ذرات درشت‌تر فقط رفتارها را در سطح سلولی تحت تأثیر قرار می‌دهند. این گروه ادعا می‌کنند خود ذرات به تنهایی عامل ترس یا خطر نیستند بلکه رفتار و یا ضعف و قدرت اتصال آنها با پروتئین‌های دریافت‌کننده پیام و به خصوص بخش تاج آنها یا انباشت روی ذخایر ژنتیکی مانند DNA و RNA نکته‌های قابل بررسی هستند. مشخص شده، تأثیر نانو ذرات نقره بر توانایی هضمی آنزیم تریپسین بر آلبومین سرم خونی انسان مورد بررسی قرار گرفت. آنها مشخص کردند که توانایی آنزیمی تریپسین تحت تیمار نانو ذرات دستخوش تغییر شده و میزان و کیفیت قطعات پپتیدی حاصل از لحاظ تعداد و مقدار تحت تأثیر قرار خواهد گرفت. این تغییرات توسط سیستم Nano/UPLC-MS بررسی شد. بر اساس این بررسی‌ها قطعات پپتیدی YICENQDSISSKLLK، QRLKASLQKFGER و QRLKASLQKFGER و CCKADDKETCFAEEGK مهم‌ترین محصولات هضمی هستند. از میان کل توالی‌های شناسایی شده توالی‌های VPQVSTPTLVEVSRNLGK، EQLKAVMDDFAAFVEK و TPVSDRVTK در محصول هضمی مرتبط با کرومای نرم وجود دارند. حالی که در محصول کرومای سخت وجود ندارند. قرارگیری توالی‌های شناسایی شده در ساختار دو بعدی شکل ۱ آمده است. توالی‌های منحصراً مربوط به مخلوط که اسیدهای آمینه ۲۳ تا ۳۴ و ۲۲۰ تا ۲۲۹ را شامل می‌شوند در موقعیت هلیکس پروتئین قرار دارند. این در حالی است که برخی توالی‌های ایجاد شده توسط کرومای سخت علاوه بر هلیکس مربوط به رشته‌های بتا و یا لوپ‌ها هستند.



شکل ۱- موقعیت اسیدهای آمینه توالی‌های شناسایی شده از آلبومین سرم انسانی.



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی و مکانیسم پیشنهادی تأثیر نانوذرات نقره بر دیواره باکتری گرم مثبت [۲۰].

گذشته در زمینه گودال زدن را قبول کرده و با شواهد بیشتر آن را تأیید می‌کنند. در همین سال Dror-Ehre و همکارانش به بررسی میزان بازماندگی *E. coli* در حضور غلظت‌های مختلف نانو ذرات زیر ۲۰ nm پرداخته‌اند [۲۳]. آنها عقیده دارند که در غلظت‌های کم که امکان گودال‌زایی کاهش می‌یابد نشست روی دیواره، اتصال به گیرنده‌های سطحی یا کانال‌های عبور مواد مهم‌ترین دلایل مرگ باکتری‌ها هستند (شکل ۲).

باکتری‌های گرم مثبت نیز بررسی شده‌اند [۲۰ و ۲۲]. نشان داده شده است که در حضور نانوذرات نقره DNA فشرده شده و به فاز فشرده‌گی رفته و توانایی رونویسی را از دست می‌دهد، دیواره سلولی از بین رفته، مواد درون سیتوپلاسمی به خارج نشت کرده و در نهایت سلول در هم شکسته می‌شود. در بررسی تغییرات نیم‌رخ پروتئینی (پروتئومیکس) اثر نانو ذرات نقره بر *B. thuringiensis* مشخص شد که تنش نانو ذرات نقره در این سویه با تغییرات بیان ۱۱۶ پروتئین همراه بوده‌است [۲۴]. UDP-N-استیل گلوکز آمین-۲-ترانسفراز یکی از آنزیم‌های شرکت کننده در بیوسنتز پپتیدوگلیکان دیواره بوده و فرایند ترانسفورماسیون استیل گلوکز آمین را به زنجیره قندی و

۲-۳- اثرات بر میکروارگانیسم‌ها

همچنان که اشاره شد از دیرباز مشخص شده بود که ترکیبات نقره، توانایی بالایی در مهار و کشتن گستره وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها دارند [۴]. برخی بررسی‌ها بیان می‌کنند با اینکه این مواد برای میکروارگانیسم‌ها کشنده هستند ولی برای سلول‌های پستانداران خطر قابل توجهی ندارند. اثرات ضدباکتریایی نانوذره نقره بارزترین ویژگی زیستی آن است. بر این اساس این مواد به بسیاری از محصولات بهداشتی مانند پمادهای سوختگی و ضدعفونی‌کننده‌ها، سیستم‌های تصفیه آب و تجهیزات پزشکی افزوده می‌شوند [۴ و ۷]. اثرات نانوذرات نقره بر گستره وسیعی از باکتری‌ها، بررسی شده است. *E. coli* و *S. aureus* مدل‌های باکتریایی گرم منفی و مثبت هستند [۹، ۱۹ و ۲۰]. در سال ۲۰۰۴، Sondi و Salopek- اثرات ضد باکتریایی سه نوع از نانو ذرات نقره را روی *E. coli* بررسی کردند [۲۱]. آنها مهم‌ترین مکانیسم اثر را تخریب دیواره و یا به اصطلاح خود گودال زدن می‌دانند [۲۰]. تحقیقی مشابه و البته جامع‌تر توسط Li و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام شده است [۲۲]. آنها نیز نظریات

جلب کرده‌اند [۲۸]. در سال ۲۰۰۷، Lin و Xing به بررسی اثرات سمی نانوذرات اکسید روی چند دیواره‌ای در مرحله جوانه‌زنی و رشد ریشه گیاهان *Raphanus sativus*، *Loctuca sativa*، *Lolium multiflorum*، *Brassica napus* و *Zea mays Cucumis sativus* پرداختند [۲۹]. همچنین بررسی روی جذب و انتقال نانوذرات ZnO در *Lolium perenne* نشان داد که وزن بافت به شدت کاهش یافته، نوک ریشه تحلیل رفته، سلول‌های لایه اپیدرم و کوتیکول آسیب دیده و حتی تخریب شده‌اند. نانوذرات روی دیواره سلول‌های لایه خارجی ریشه نشست کرده و حتی در آپوپلاست و پروتوپلاست و لایه‌های اندودرم و استوانه آوندی مشاهده شده‌است [۳۰]. برخی از بررسی‌ها نیز بر عدم سمیت نانوذرات برای گیاهان دلالت دارند [۲۷]. به نظر می‌رسد حتی اگر نانوذرات دارای ویژگی‌های خاص و مقادیر کم اثرات منفی نداشته و یا حتی اثرات مثبت در رشد داشته باشند، به هر حال به واسطه ارتباط بسیار قوی گیاه با محیط اطرافش، برهمکنش‌ها باید بررسی شوند. Racuciu و Creanga اثر نانوذرات آهن را روی مراحل اولیه رشد *Z. mays* بررسی کردند [۳۱]. سمیت سلولی و ژنی نانوذرات نقره ۱۰۰ nm در محدوده غلظتی ۱۰۰-۲۵ $\mu\text{g/mL}$ بر سلول‌های ریشه *Allium cepa* توسط Kumari و همکارانش بررسی شد [۳۲]. نتایج وی حاکی از آن است که وقتی گیاه در حضور نانوذرات نقره قرار می‌گیرد شاخص میوزی به شکل قابل توجهی از ۶۰٪ به ۲۷٪ کاهش می‌یابد. در زمینه اثرات آلودگی‌های اتمسفری ناشی از نانوذرات بر گیاهان نیز گزارش‌هایی وجود دارند، که با توجه به اینکه در راستای بررسی‌ها تحقیق حاضر قرار ندارند به آنها پرداخته نخواهد شد.

تأثیرات نانوذرات بر گیاه برنج (*Oryza sativa* L.) از منظر ریخت‌شناسی، تغییرات سازوکارهای حیاتی از جمله فتوسنتز، متابولیت‌های ثانویه مانند لیگنین و رنگدانه‌های فتوسنتزی و تغییرات در سطح بیان ژن و نیم‌رخ پروتئینی بررسی شده است [۳۳]. با افزایش غلظت نانوذرات یا زمان تیماردهی، نفوذ به درون سلول و تخریب ساختارهای آن از جمله دیواره، مشاهده می‌شود. روند معمول رشد گیاهی، از جمله مسیرهای سنتز رنگدانه‌ها، پلی‌فنول‌ها و کربوهیدرات‌ها دستخوش تغییر شده است. در حالی که نسبت توزیع و انتقال مواد از اندام هوایی به سمت ریشه و رشد انشعابات آن زیاد شده، میزان مرگ بافت‌ها نیز افزایش نشان می‌دهند (شکل ۳).

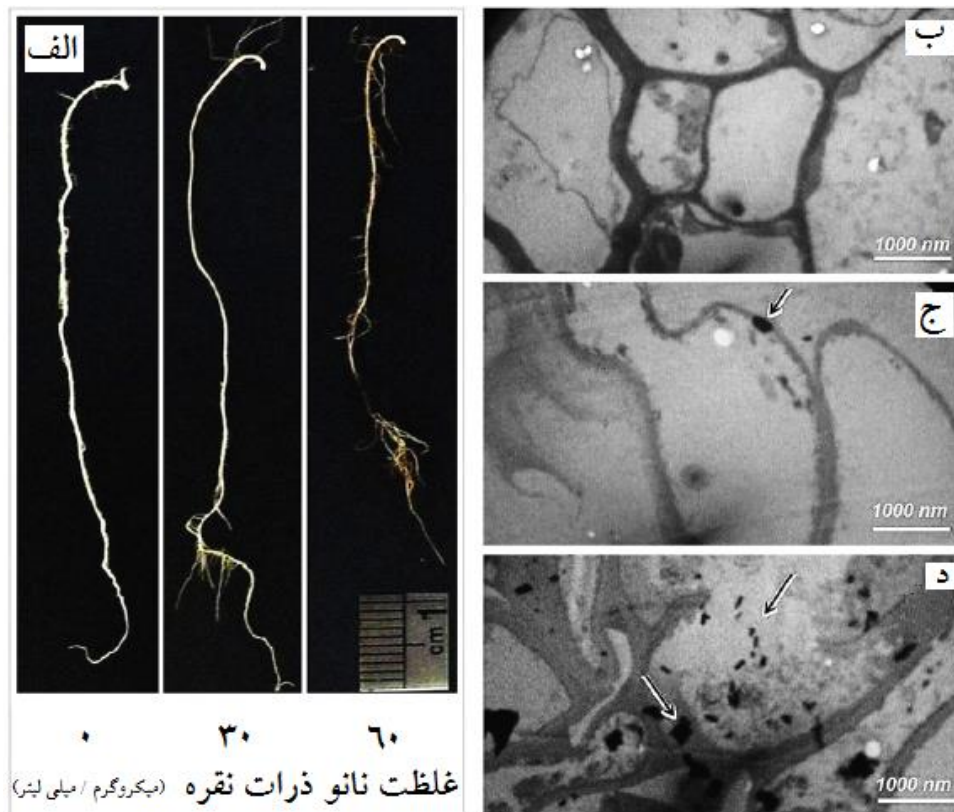
اتصال آن به شاخه‌های جانبی پپتیدی کنترل می‌کند. از سویی پروتئین آلانین دهیدروژناز که نقش مهمی در سنتز زنجیره‌های آلانینی پپتیدهای پپتیدوگلیکان دیواره دارد، تحت تنش نانوذرات افزایش می‌یابد. افزایش بیان آنزیم‌های بیوسنتزکننده پپتیدوگلیکان دیواره حاکی از متأثر شدن دیواره تحت تنش است. همچنین پروتئین‌های کنترل‌کننده تنش اکسیداتیو نیز دستخوش تغییر می‌شوند. افزایش بیان آنها به‌ویژه سوپراکسید دیسموتاز، تیول پراکسیداز، آلکیل هیدروپراکسید ردوکتاز احتمال افزایش ROS و نیاز به افزایش کنترل‌کننده آنها را تحت تنش قوت می‌بخشند [۲۴].

ویروس HIV-1 از زمره میکروارگانیسیم‌ها و بسیار مورد اقبال محققان است. در زمینه برهمکنش این ویروس و نانوذرات نقره مشخص شده است که ذرات ۲۰-۱۰ nm با پوشش پلیمری در غلظت‌های بالاتر از ۲۵ $\mu\text{g/mL}$ به خوبی سلول‌های مورد حمله آن را کنترل و حذف می‌کنند، و بر این اساس استفاده از کرم‌های حاوی نانوذرات نقره برای پیش‌گیری از ابتلا به ایدز پیشنهاد شده است [۲۵ و ۲۶].

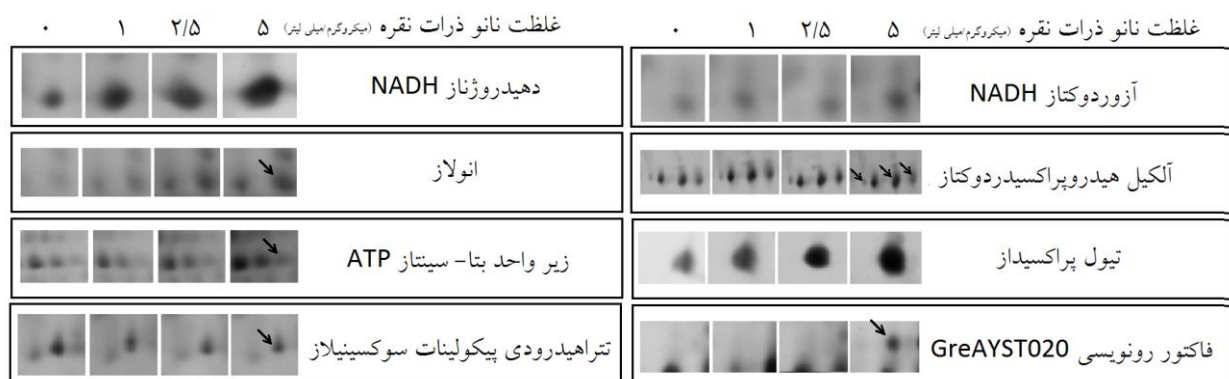
قارچ‌ها از جمله میکروارگانیسیم‌های بیماری‌زا نیز هستند و به همین واسطه از نانوذرات نقره برای مهار آنها استفاده می‌شود. در سال ۲۰۰۹، Jo و همکارانش اثرات سمی نانوذرات نقره بر قارچ‌های بیماری‌زای *Bipolaris sorokiniana* و *Magnaporthe grisea* را بررسی و نتایج حاصل را بر کاهش پنجاه درصدی کلونی‌ها با محلول AgNO_3 مقایسه کرده‌اند. از آنجایی که حضور یون کلرید در محیط یکی از عوامل ناپایداری یون و نانوذره نقره است، نتایج در حضور NaCl نیز بررسی شد. نتایج حاکی از آن است که نانوذره نقره در غلظت‌های بالاتر قابلیت کنترل بیماری قارچی را دارند در حالی که سمیت خاصی برای گیاه گزارش نشده است. از سوی دیگر در حضور NaCl قابلیت کنترل بیماری توسط یون نقره شدیداً کاهش می‌یابد ولی نانوذره نقره حتی در حضور یون کلرید نسبت به حالت یونی قابلیت بالاتری دارد [۲۷].

۳-۳- اثرات بر گیاهان عالی

با وجود کاربردهای روزافزون و افزایش آلودگی محیط با نانوذرات، به سمیت آنها برای گیاهان توجه چندانی نشده است. همچنان که اشاره شد گیاهان با اکوسیستم خود و آلودگی آنها ارتباط گسترده‌ای دارند. در حالی که برخی گزارش‌ها در زمینه سمیت گیاهی نانوذرات وجود دارد، سمیت و آلودگی نانوذرات نقره کمترین توجه را به خود



شکل ۳- انشعابات ایجادشده روی ریشه برنج (*Oryza sativa* L.)، (الف) و تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به بافت ریشه در غلظت‌های صفر (ب)، ۳۰ (ج) و ۶۰ (د)، [۳۳].



شکل ۴- تغییرات بیان برخی از پروتئین‌های *B. thuringiensis* تحت تیمار نانوذرات نقره، [۳۳].

ساختاری، سیستمی و مرگ سلولی ناشی از آن، فرضیه ایجاد تنش اکسیداتیو با مشاهده افزایش بیان پروتئین‌های درگیر در کاهش صدمات این تنش و تلاش گیاه در حفظ و تنظیم سیکل گلوکوتایون-آسکوربات، ممکن به نظر می‌رسد. همچنین با توجه به تغییرات نحوه بیان زیرواحدهای پروتئین‌های انتقال‌دهنده کلسیم، درگیر شدن فرآیندهای تنظیم پتانسیل سلولی و فشار اسمزی؛ برای کاهش آثار تنش، منطقی به نظر می‌رسد.

بر اساس نتایج ارائه‌شده، برنج در مراحل اولیه رشد جوانه‌ها و هم‌چنین گیاهچه‌های یک ماهه، به شدت تحت تأثیر تیمار نانوذرات نقره قرار می‌گیرد. اولین میان‌کنش این دو، در تیمارهای با غلظت کم و مدت کوتاه، نفوذ به فضای آپوپلاستی ریشه و جذب ذرات نقره بر سطح دیواره سلول‌ها است. تحت تنش نانوذرات نقره، تغییرات بیان ۷۰ پروتئین از جمله تیول دیسموتاز، آلکیل هیدروپراکسیدردوکتاز، گلوکوتایون-S-ترانسفراز GSTF2، L-آسکوربات پراکسیداز ارزیابی شدند، (شکل ۴-)، [۲۰]. به دنبال تنش‌های شدید

۳-۴- اثرات بر حیوانات

بررسی روی حیوانات به واسطه محدودیت‌های حقوقی و هزینه‌های بالا تنها چند صد مورد از بیش از پنجاه هزار مورد آزمایش‌های سمیت را به خود اختصاص می‌دهند. همچنان‌که اشاره شد در دنیای گیاهی و باکتریایی مدل‌هایی برای بررسی‌ها استفاده می‌شوند که تحقیقات جانوری از این قاعده مستثنی نیستند. *Danio rerio* یا دلک‌ماهی یکی از همین مدل‌ها است که بیشترین بررسی‌های سمیت نانوذرات را به خود اختصاص داده‌است [۳ و ۳۴].

تحقیقات نشان داده‌اند که با وجود اینکه TiO_2 سمیت خاصی برای دلک‌ماهی ندارد ولی نانوذرات نقره و مس سمیت شدیدی نشان می‌دهند. Asharani و همکارانش نیز با بررسی اثر سمی نانو ذرات نقره مشخص کرده‌اند که جنین این ماهی پیش از بیرون آمدن از تخم دچار تغییرات مورفولوژیکی شده و پس از خارج شدن نیز توانایی رشد معمولی و تولیدمثل را نداشته و در غلظت‌های بالا، طول عمر کوتاهی دارند [۳۵]. هم‌چنین پوشش سطحی نانوذرات نقره اهمیت زیادی در میزان سمیت دارد، به طوری که نانوذرات با پوشش نشاسته‌ای اثراتی شدیدتر، سرعت تپش قلب و توانایی کمتر سوراخ کردن پوسته تخم و مرگ‌ومیر بیشتری از انواعی با پوشش BSA به همراه دارند. جالب‌ترین تحقیق صورت‌گرفته در زمینه سمیت نانوذرات بر حیوانات، پژوهشی است که توسط Wang و همکارانش روی نماتود *Caenorhabditis elegans* انجام شده است [۳۶]. نماتود موجودی تک‌جنسی است و از لحاظ بررسی تأثیر بر توانایی تولیدمثلی در نوع خود بی‌نظیر است. نتایج وی حاکی از آن است که انواع نانوذرات (شامل نقره، ZnO ، TiO_2 و Al_2O_3) سمیت شدید و اثرات قابل‌توجهی بر توانایی تولیدمثلی آنها دارد.

۳-۵- اثرات بر انسان

پوست، ریه و خون مهم‌ترین راه‌های نفوذ نانوذرات به بدن هستند [۳۷]. Oberdorster و همکارانش نشان داده‌اند که معمول‌ترین روش ورود نانو ذرات به بدن، تنفس آن در مکان‌های صنعتی است و این مواد از ریه به سایر اندام‌ها منتقل می‌شوند [۲۸]. پوست وسیع‌ترین عضو در تماس با این ذرات است و البته سدی در برابر آنها نیز هست [۳۷]. این ذرات روی پوست با ایجاد عوارضی مانند نشست ذرات در لایه‌ها و خاکستری/آبی شدن پوست همراه است [۹]. اثرات این ذرات روی سلول‌های فیبروبلاست کبد موش با

بروز سرطان همراه است [۳۷]. این ذرات پس از ورود به خون در اولین مرحله متابولیسم از کبد عبور کرده و جذب آنها در کبد با افزایش احتمال ابتلا به هپاتیت همراه است، که البته به ماهیت ذرات نیز وابسته است [۳۷]. این جذب با کاهش فعالیت میتوکندری، افزایش نشست لاکتات دهیدروژناز (LDH) و غلظت آنتی‌اکسیدانت گلوتاتیون (GSH) همراه است. مشاهده شده که ذرات کوچکتر از ۱۰۰ nm اکثراً توسط کبد حذف می‌شوند ولی ذرات بزرگتر در طحال گیر می‌افتند [۳۷]. ذراتی که در خون باقی می‌مانند با عبور از سد خونی-مغزی با ایجاد اختلالات و ازهم‌گسیختگی آنها و بروز آماس همراه است. به ظاهر سمیت نانوذرات برای سلول‌های انسانی مهم‌ترین اثرات آنهاست که نظرات متفاوتی در این زمینه نیز به چاپ رسیده است. Veranth و همکارانش پس از بررسی آثار نانوذرات TiO_2 ، SiO_2 ، NiO ، Fe_2O_3 ، CeO_2 ، Al_2O_3 بر سلول‌های ریه (BEAS-2B) معتقدند با اینکه نانوذرات صنعتی نسبت به انواع میکرو سمیت بالاتری دارند ولی از نانوذرات طبیعی سمیت بیشتری ندارند [۳۸]. Asharani و همکارانش به بررسی تأثیر غلظت‌های مختلفی از نانوذرات نقره بر سلول‌های سالم فیبروبلاست ریه انسانی (IRM-90) و سلول‌های *glioblastoma* (U251) پرداخته‌اند [۳۵]. این تأثیر با تخریب ساختاری کروموزوم‌ها و توقف رشد، تغییرات مورفولوژیکی سلولی، تخریب و تغییر ساختار سطحی و تداخل در فعالیت کانال‌های انتقال Ca^{2+} ، کاهش شدید بیان پروتئین‌های متصل‌شونده به اکتین و فیلامین - و افزایش بیان پروتئین‌های متالوتیونین و هموکسیژناز I همراه بوده است. نتایج آنها حاکی از آن است که جذب نانوذرات از طریق اندوسیتوز و ماکروپینوسیتوز بوده و سلول‌های سرطانی توانایی کمتری در مقابله با سمیت نانوذرات نقره دارند.

۴- نتیجه‌گیری

گزارش شده است که عنصر نقره در حالت یونی و در غلظت‌های کنترل‌شده اثرات ضد باکتری، ویروس، قارچ و مخمر داشته و اثرات منفی برای انسان ندارد. با این حال، کاربرد بیش از حد و ایجاد آلودگی‌های ناشی از غلظت بالای آن با صدمات جبران‌ناپذیر به فلور میکروبی خاک، گیاهان، جلبک‌ها، ماهیان و قارچ‌ها همراه بوده است.

بسیاری از گزارش‌ها وابستگی اثرات سمیت سلولی نانو ذرات نقره را به نحوه تهیه، پوشش سطحی این مواد و

۵- پی‌نوشت‌ها

Uniquenes	مفهوم بی‌نظیر بودن
adhesion receptor	چسبندگی
integrine	اینترگرین
selectin	سلکتین
immunoglobulin	ایمونوگلوبولین
CORONA	کرونا
Soft corona	کرونا نرم
Hard corona	کرونا سخت
pit formation	گودال زدن
tension state	فاز فشردگی
lactate dehydrogenase	لاکتات دهیدروژناز (LDH)
antioxidant glutathione	گلوتاتیون (GSH)
Blood Brain Barrier	سد خونی-مغزی BBB
fibrillaiton	فیبرولاسیون

منابع

- [1] Monteiro-Riviere, N.A., Tran, C.L. *Nanotoxicology: Characterization, Dosing And Health Effects*. Taylor and Francis. **2007**.
- [2] Basra, A.S. *Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants*, Chapter 11: Mechanisms of plant resistance to toxicity of aluminum and heavy metals. CRC Press. Wichita, Kansas USA. **1997**.
- [3] Griffitt, R.J., Hyndman, K., Denslow, N.D., Barber, D.S. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicological Sciences*. **2009**; **107**: 404-415.
- [4] Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.J., Quigg, A., Santschi, P.H., Sigg, L. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*. **2008**; **17**: 372-386.
- [5] Choi, O., Deng, K.K., Kimc, N.J., Jr, L.R., Surampalli, R.Y., Hu, Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*. **2008**; **42**: 3066-3074.
- [6] Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., Popovic, R. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **2000**; **78**: 80-85.
- [7] Chen, X., Schluesener, H.J. *Nanosilver: A nanoproduct in medical application*. *Toxicology Letter*. **2008**; **176**: 12-1.

میزان آزادسازی Ag+ نسبت می‌دهند. مهم‌ترین برهمکنش‌های سلولی گزارش شده بین نانوذرات نقره با ویژگی‌های متفاوت و سلول‌ها عبارتند از برهم‌کنش‌های آنها با اسیدهای آمینه به‌ویژه سیستئین، گلوتامین، لیزین و ترکیبات پنیسیل آمین، گلوکاتین و سیستئین متیل استر و در ادامه پپتیدها و پروتئین‌ها و ایجاد هاله‌های پروتئینی، کاهش توانایی و قدرت اتصال پروتئین‌های دریافت‌کننده پیام سطوح دیواره سلولی و غشاء پلاسمایی و تداخل در دریافت‌های محیطی و ارتباطات سلولی، تغییرات فیبرولاسیون، انباشت روی ذخایر ژنتیکی مانند DNA و RNA، فشردگی آنها، تضعیف توانایی رونویسی و به دنبال آن تأثیر بر نحوه و میزان بیان پروتئین‌ها، تخریب ساختاری کروموزوم‌ها و توقف رشد، برهمکنش‌های فیزیکی به اصطلاح "گودال زدن" و تخریب دیواره سلولی یا تمامیت غشاء پلاسمایی، تغییرات مورفولوژیکی سلولی، تخریب و تغییر ساختار سطحی و تداخل در فعالیت کانال‌های انتقال Ca²⁺، افزایش پارامترهای مرگ ناگهانی/برنامه‌ریزی شده سلولی، تولید ROS و تغییر رفتار سیکل سلولی، ایجاد تنش اکسیداتیو به دنبال تنش‌های شدید ساختاری، سیستمی و مرگ سلولی به‌واسطه آن. در مورد گیاهان می‌توان به برخی نتایج ویژه از جمله کاهش وزن بافت، تحلیل و انشعاب زایی ریشه، آسیب به سلول‌های لایه اپیدرم و کوتیکول و تخریب آنها، نشست روی دیواره سلول‌های لایه خارجی ریشه، آپوپلاست، پروتوپلاست و لایه‌های اندودرم و استوانه، کاهش قابل توجه شاخص میوزی، تأثیر بر روند معمول رشد گیاهی مانند مسیرهای سنتز رنگدانه‌ها، پلی‌فنول‌ها و کربوهیدرات‌ها، تغییر در نسبت توزیع و انتقال مواد در گیاه و افزایش میزان مرگ بافت‌ها اشاره کرد. همچنین برخی برهمکنش‌های ویژه در سلول‌های جانوری و انسانی نیز گزارش شده‌اند مانند تغییرات مورفولوژیکی و کاهش توانایی رشد معمولی، تولید مثل و طول عمر، نشست ذرات در لایه‌ها پوست و خاکستری/آبی شدن آن، جذب در کبد و افزایش احتمال ابتلا به هیپاتیت، کاهش فعالیت میتوکندری، افزایش نشست LDH و غلظت GSH.

۵- تشکر و قدردانی

از کلیه محققان و نویسندگان مقالات استفاده‌شده در نگارش این مقاله مروری متواضعانه تقدیر می‌شود. همچنین از امکانات مالی و آزمایشگاهی ستاد فناوری نانو و دانشگاه شهید بهشتی سپاسگذارم.

- M.J. The bactericidal effect of silver Nanoparticles. *Nanotechnology*. **2005**; **16**: 2346–2353.
- [20] Mirzajani, F., Ghassempour, A., Aliahmadi, A., Esmaeili, M.A. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Research in Microbiology*. **2011**; **162**: 542-549.
- [21] Sondi, I., Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticle as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2004**; **275**: 177-182.
- [22] Li, W.R., Xie, X.B., Shi, Q.S., Duan, S.S., Ouyang, Y.S., Chen, Y.B. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biomedical and Life Science*. **2011**; **24**: 135-141.
- [23] Dror-Ehre, A., Mamane, H., Belenkova, T., Markovich, G., Adin, A. Silver nanoparticle–*E. coli* colloidal interaction in water and effect on *E. coli* survival. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2009**; **399**: 521-526.
- [24] aMirzajani, F., Askari, H., Hamzelou, S., Schober, Y., Römpp, A., Ghassempour, A., Spengler, B. Proteomics Study of Silver Nanoparticles Toxicity on *Bacillus thuringiensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **2013**; **100**: 130-122
- [25] Hamdani, S.Z. Study shows silver nanoparticles attach to HIV-1 virus. *Journal of Nanotechnology*. **2005**; 2pp. Original story at: www.physorg.com/news.html.
- [26] Elechiguerra, J.L., Burt, J.L., Morones, J.R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H.H., Yacaman, M.J. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*. **2005**; **3**: 10-1.
- [27] Jo, Y.K., Kim, B.H., Jung, G. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on Phytopathogenic Fungi. *Plant Disease*. **2009**; **93**: 1037-1043.
- [28] Monica, R.C., Cremonini, R. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*. **2009**; **62**: 161-165.
- [29] Oberdorster, G., Stone, V., Donaldson, K. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicolog*. **2002**; **1**: 25-2.
- [30] Lin, D., Xing, B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*. **2011**; **150**: 243-250.
- [8] Panyala, N.R., Pena-Mendez, E.M., Havel, J. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health? *Journal of Applied Biomedicine*. **2008**; **6**: 117-129.
- [9] Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N., Kim, J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*. **2000**; **52**: 662-668.
- [10] Beer, C., Foldbjerg, R., Hayashi, Y., Sutherland, D.S., Autrup, H. Toxicity of silver nanoparticles-nanoparticle or silver ion? *Toxicology Letter*. **2012**; **208**: 286-292.
- [11] Li, T., Park, H.G., Lee, H.S., Choi, S.H. Circular dichroism study of chiral biomolecules conjugated with silver nanoparticles. *Nanotechnology*. **2004**; **15**: 660-663.
- [12] Gondikas, A.P., Morris, A., Reinsch, B.C., Marinakos, S.M., Lowry, G.V., Hsu-Kim, H. Cysteine-Induced Modifications of Zero-valent Silver Nanomaterials: Implications for Particle Surface Chemistry, Aggregation, Dissolution, and Silver Speciation. **2012**; **46**: 3045-3037.
- [13] Chio, O., Clevenger, T.E., Deng, B., Surampalli, R.Y., Jr, L.R., Hu, Z. Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water Research*. **2009**; **43**: 1879-1889.
- [14] Kramer, J.R., Bell, R.A., Smith, D.S. Determination of sulfide ligands and association with natural organic matter. *Applied Geochemistry*. **2007**; **22**: 1611-1606.
- [15] Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., MCLAughlin, M.J., Lead, J.R. Nanomaterial in the environment: behavior, fate, bioavailability and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **2008**; **27**: 1825-1851.
- [16] Lynch, I., Dawson, K.A. Protein-nanoparticle interaction. *Nanotoday*. **2008**; **3**: 40-47.
- [17] Lynch, I., Salvati, A., Dawson, K.A. Protein-nanoparticle interactions: What does the cell see? *Nature Nanotechnology*. **2008**; **4**: 546-547.
- [18] Lynch, I. Are there generic mechanisms governing interactions between nanoparticles and cells? Epitope mapping the outer layer of the protein-material interface. *Physica*. **2007**; **373**: 511-520.
- [19] Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramirez, J.T., Yacaman,

- [31] Lin, D., Xing, B. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science and Technology*. **2008**; **42**: 5580-5585.
- [32] Racuciu, M., Creanga, D.E. TMA-OH coated magnetic nanoparticles internalized in vegetal tissues. *Romanian Journal of Physics*. **2007**; **52**: 391-395.
- [33] Kumari, M., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*. **2009**; **407**: 5243-5246.
- [34] bMirzajani, F., Askari, H., Hamzelou, S., Farzaneh, M., Ghassempour, A. Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **2013**; **88**: 48-54.
- [35] Ispas, C., Andreescu, D., Patel, A., Goia, D., Andreescu, S., Wallace, K.N. Toxicity and Developmental Defects of Different Sizes and Shape Nickel Nanoparticles in Zebrafish. *Environmental Science and Technology*. **2009**; **43**: 6349-6356.
- [36] Asharani, P.V., Wu, Y.L., Gong, Z., Valiyaveetil, S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*. **2009**; **19**: 255102 (8pp).
- [37] Wang, H., Wick, R.L., Xing, B. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution*. **2009**; **157**: 1171-1177.
- [38] Yildirim, L., Thanh, N.T.K., Loizidou, M., Seifalian, A.M. considerations of clinically applicable nanoparticles. *Nano Today*. **2011**; **6**: 585-607.
- [39] Veranth, J.M., Kaser, E.G., Veranth, M.M., Koch, M., Yost, G.S. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Particle and Fibre Toxicology*. **2007**; **4**: 18-1.

