

The effect of silver nanoparticles covered with the *Achillea biebersteinii* plant extract on angiogenesis of chick chorioallantoic membrane

Zamani-Esmati P¹, Baharara J^{2*}, Iranbakhsh AR³, Ramezani T⁴

1- Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I. R. Iran.

2- Research Center for Animal Development Applied Biology and Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I. R. Iran.

3- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran.

4- Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I. R. Iran.

Received May 21, 2016; Accepted December 5, 2017

Abstract:

Background: Angiogenesis is a major event in many diseases such as cancer. Today, using silver nanoparticles in industry and medicine has taken into consideration. The *Achillea biebersteinii* extract has antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant effects. The present study aimed at examining the effects of silver nanoparticles coated with the *A. biebersteinii* extract on angiogenesis of chick chorioallantoic membrane.

Materials and Methods: In this experimental study, 50 fertilized eggs Ross were randomly divided into 5 groups: the sham and experimental groups 1 to 4. In the second day of incubation, the window was opened on eggs and the eggs were treated with 50, 100, 150 and 200 µg/mL silver nanoparticles. At the twelfth day, the samples were photographed and the number and lengths of vessels around the sponges, the length of crown-rump, fetal weight and blood vessels' hemoglobin levels were recorded and compared with the control group.

Results: The results showed that the 50 µg/mL of silver nanoparticles had no significant effect on the angiogenesis process. However, 100, 150 and 200 µg/mL of the nanoparticles doses-dependently decreased the number, length and content of hemoglobin in the blood vessels. Also, fetal weight and crown-rump in concentrations 150 and 200 µg/mL showed a significant decrease compared with the control group ($P < 0.01$).

Conclusion: Silver nanoparticles coated with *A. biebersteinii* extracts can be considered in the studies of diseases associated with angiogenesis such as cancer.

Keywords: Angiogenesis, Chorioalantoic membrane, Silver nanoparticles, *Achillea biebersteinii*

* Corresponding Author.

Email: baharara78@gmail.com

Tel: 0098 513 843 7092

Fax: 0098 513 843 7092

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2018; Vol. 21, No 6, Pages 553-561

Please cite this article as: Zamani-Esmati P, Baharara J, Iranbakhsh AR, Ramezani T. Effect of Silver Nanoparticles covered with *Achillea biebersteinii* plant extract on Angiogenesis of Chick Chorioallantoic Membrane. *Feyz* 2018; 21(6): 553-61.

بررسی اثر نانوذره نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران بر رگ‌زایی در مدل پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه

پریسا زمانی عصمتی^۱، جواد بهار آرا^{۲*}، علیرضا ایرانبخش^۳، طیبه رضانی^۴

خلاصه:

سابقه و هدف: رگ‌زایی در بیماری‌هایی زیادی نظیر سرطان دخالت دارد. امروزه استفاده از نانوذرات نقره در صنعت و پزشکی مورد توجه قرار گرفته است. عصاره گیاه بومادران زرد دارای خاصیت‌های آنتی‌باکتریال، ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی است. در پژوهش حاضر اثر نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران زرد بر رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه بررسی گردیده است. **مواد و روش‌ها:** در این پژوهش تجربی ۵۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار نژاد ROSS در ۵ گروه شاهد و تجربی ۱ تا ۴ تقسیم‌بندی شدند. پنجره در روز دوم انکوباسیون در تخم‌ها ایجاد شده و در روز هشتم تیمار با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانو ذرات نقره انجام شد. عکس‌برداری در روز دوازدهم انجام شد تعداد و طول انشعابات عروقی، طول فرق سری-نشیمناگی، وزن جنین‌ها و سطح هموگلوبین عروق خونی ثبت و با شاهد مقایسه گردید. **نتایج:** یافته‌ها نشان داد غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره اثر معنی‌دار بر روند رگ‌زایی ندارد، درحالی‌که غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در منجر به کاهش معنی‌دار تعداد، طول عروق خونی و غلظت هموگلوبین می‌شوند. همچنین، وزن جنین‌ها و فاصله فرق سری-نشیمناگی در غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌دار $P < 0.01$ نشان داد. **نتیجه‌گیری:** نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران زرد می‌تواند جهت مطالعات بیماری‌های مرتبط با رگ‌زایی نظیر سرطان مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: رگ‌زایی، پرده کوریوآلانتوئیک، نانوذرات نقره، بومادران

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۶، صفحات ۵۶۱-۵۵۳

مقدمه

براساس مطالعات انجام شده در طول دهه گذشته، عوامل ضد رگ‌زایی مختلفی شناخته شده است که برخی از آنها در آزمایش‌های بالینی جهت درمان مورد استفاده قرار گرفته‌اند، اما به‌علت بروز مشکلاتی مانند نیاز به استفاده از غلظت‌های بالای دارو در طولانی‌مدت و خطر ایجاد مسمومیت، استفاده از این داروها با محدودیت همراه است؛ از این‌رو جستجو جهت یافتن عوامل ضد رگ‌زایی با اثرگذاری بیشتر و اثرات جانبی کمتر ضروری به‌نظر می‌رسد [۵]. در سال‌های اخیر نانوذرات نقره به‌علت خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به‌فرد مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند [۶]. از نانوذرات نقره در شیمی‌درمانی استفاده می‌شود [۷]. تاکنون اثرات ضدالتهابی، ضدسرطانی، و آنتی‌اکسیدانی این نانوذرات به اثبات رسیده است [۸]. نانوذرات نقره در مدل موش مبتلا به لنفوما، بدون ایجاد سمیت در سلول‌های طبیعی، رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی را مهار کرده و باعث افزایش زمان بقا می‌شوند [۹]. این نانوذرات بدون تحت تاثیر قرار دادن قابلیت زیستی جنین منجر به اثرات مهاری بر رگ‌زایی در غشاء پرده یکوریوآلانتوئیک جنین جوجه می‌شوند [۱]. همچنین، برخی مطالعات نشان داده‌اند که نانوذرات نقره با مهار فاکتور رشد اتدوتلیال عروقی (VEGF) اثر ضد رگ‌زایی خود را اعمال می‌کنند [۱۰]. عقیده بر این است که نانوذرات نقره با هدف قرار دادن این سلول‌ها می‌توانند به ابزار

آنژیوژنز به فرآیند جوانه زدن رگ‌های جدید از رگ‌های قبلی اطلاق می‌گردد [۱]. عملکرد طبیعی بافت‌های مختلف به‌طور مستقیم به شبکه عروقی آن بافت وابسته است. لذا، می‌توان آنژیوژنز را یک فرآیند ضروری در فیزیولوژی طبیعی دانست [۲]. فرایند رگ‌زایی توسط مولکول‌های مهارکننده و فعال‌کننده به‌صورت بسیار دقیق تنظیم گردیده و در صورت وجود عدم تعادل بین آنها، شرایط برای بروز برخی بیماری‌ها از جمله آرتریت روماتوئید، رتینوپاتی دیابتی و انواع سرطان‌ها به‌وجود می‌آید [۳]. از طرف دیگر، امروزه مهار رگ‌زایی در تومور به استراتژی درمانی مهمی در مبارزه با سرطان تبدیل شده است [۴].

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

^۲ استاد، گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

^۳ استاد، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۴ دانشجوی دکتری تخصصی زیست شناسی تکوین جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری و گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

دوره‌نویس: ۰۵۱ ۳۸۴۳۷۰۹۲

تلفن: ۰۵۱ ۳۸۴۳۷۰۹۲

پست الکترونیکی: baharara78@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۹/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۱

داده شد تا بجوشد. سپس این عصاره با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای استفاده بعدی نگهداری شد. جهت ساخت نانوذرات نقره، ۱۰۰۰ میکرولیتر از عصاره مذکور با ۱۰۰ میلی‌لیتر نیترات نقره (۵ میلی‌مولار در آب) دور از نور مخلوط شد؛ تغییر رنگ محلول از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای نشان‌دهنده آغاز ساخت نانوذرات نقره می‌باشد. تعیین اندازه نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران زرد با استفاده از دستگاه DLS (Cordovan, Vaso particle, France) انجام شد. قبل از اندازه‌گیری برای اطمینان از همگن بودن نانوذرات، آنها به مدت ۵ دقیقه سونیکه شدند.

مطالعات طیف‌سنجی مادون قرمز

قبل از انجام آنالیز، به منظور حذف هرگونه باقیمانده توده زیستی آزاد و یا عصاره بدون اتصال به سطح، نانوذرات نقره سه بار با آب مقطر شسته شدند. سپس، این نانوذرات در ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و در ادامه با دستگاه انجماد خشک پودر شدند. نانوذرات نقره و پودر عصاره گیاه بومادران با پودر KBr مخلوط شدند. طیف مادون قرمز در محدوده ۴۰۰-۴۰۰۰ نانومتر برای عصاره گیاه بومادران و نانوذرات ساخته شده به‌طور جداگانه ثبت گردید.

میکروسکوپ الکترونی گذاره

برای شناسایی شکل و ابعاد نانوذرات نقره تولید شده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (CM-120, Philips) استفاده شد. این مشاهدات با قرار دادن یک قطره از نانوذرات نقره روی گرید مسی پوشش داده شده با یک فیلم کربن انجام گرفت [۱۸].

بررسی اثرات ضد رگ‌زایی نانوذرات نقره با پوشش گیاه بومادران زرد بر مدل پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه:

تعداد ۵۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار نژاد Ross در ۵ گروه آزمایشی به‌صورت تصادفی و مساوی شامل گروه شاهد و ۴ گروه تجربی تیمار با نانوذرات نقره در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تقسیم شدند. تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار در دستگاه جوجه‌کشی (Cocks, Netherlands) در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد قرار داده شدند. در روز دوم انکوباسیون در شرایط کاملاً استریل ایجاد شده توسط هود لامینار (Telstar, Spain) و با تکنیک پنجره بخشی از پوسته تخم‌مرغ‌ها برداشته شد. سپس به‌وسیله چسب زخم و پارافین استریل (پارافین فارا، ایران) پنجره‌ای در یک طرف تخم‌مرغ‌ها ایجاد گردید و تخم-

مفید در درمان سرطان تبدیل شوند [۱۱]. روش‌های متعددی برای تولید نانوذرات نقره وجود دارد [۱۲]. طی دهه اخیر ساخت زیستی نانوذرات نقره با واسطه باکتری‌ها، قارچ‌ها و عصاره‌های گیاهان مورد توجه قرار گرفته است [۱۳]. ساخت زیستی نانوذرات دارای مزایای بسیاری از جمله هزینه کمتر، سازگاری با محیط زیست، امکان تولید آسان در مقیاس بالا بدون نیاز به استفاده از ترکیبات سمی، دما و فشار بالا می‌باشد [۱۴]. در سال‌های اخیر ساخت نانوذرات نقره به روش زیستی با بهره‌گیری از گیاهان دارویی بومی از جمله، عصاره گیاه مریم گلی [۱]، اکالیپتوس [۱۲]، زیره سیاه [۱۳] و آلوئه‌ورا [۱۵] انجام شده است. گیاه دارویی بومادران زرد با نام علمی "*Achillea biebersteinii*" در اکثر مناطق ایران رشد می‌کند. این گیاه حاوی انواع فلاونوئید، آلکالوئید و تانن می‌باشد و تاکنون خواص آنتی‌باکتریال، آنتی‌اکسیدانت، ضداسپاسمی و خواص ضدالتهابی گیاه بومادران زرد مورد بررسی قرار گرفته است [۱۶]. نتایج مطالعه Asma و همکاران برای بررسی خواص ضدسرطانی عصاره گیاه بومادران زرد روی رده سلولی K ۵۶۲ نشان‌دهنده پتانسیل درمانی این گیاه از طریق القاء تمایز، مهار چرخه سلولی و آپوپتوز در سلول‌های سرطانی بوده است [۱۷]. در تحقیق حاضر نانوذرات نقره با روش دوست‌دار محیط زیست و با استفاده از گیاه دارویی بومادران زرد ساخته شد و با توجه به این‌که اثرات ضد رگ‌زایی این نانوذرات زیستی بر رگ‌زایی در مدل پرده کوریوآلانتوئیک مطالعه نشده است، در تحقیق حاضر به این مهم پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش تجربی آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در سال ۱۳۹۴-۱۳۹۳ انجام شد و از تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار نژاد Ross به‌عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده گردید. تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار از شرکت مرغداران طوس مشهد تهیه شدند. گیاه بومادران زرد نیز با شماره هرباریومی ۳۴۵۱۶ در هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی گردید. در این مطالعه از نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران زرد که قبلاً در مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد ساخته و شناسایی گردیده بود، استفاده شد:

تهیه نانوذرات نقره با پوشش عصاره بومادران زرد و شناسایی آنها: بدین منظور ۵ گرم از گیاه بومادران زرد با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار استریل مخلوط گردید و روی هات‌پلیت قرار

نتایج

یافته‌های حاصل از شناسایی نانوذرات نقره پوشش‌دار شده با عصاره گیاه بومادران زرد:

تصویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی گذاره نشان-دهنده اشکال کروی نانوذرات نقره بود. همچنین، اندازه متوسط این نانوذرات ۱۲ نانومتر بوده و دامنه پراکنش آنها بین ۱ تا ۳۰ نانومتر قرار داشت (شکل شماره ۱). به‌علاوه، نتایج حاصل از طیف‌سنجی مادون قرمز نشان داد که طیف حاصل از نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران زرد با طیف حاصل از عصاره گیاه بومادران بسیار شباهت دارد؛ این نتایج قرارگیری عصاره گیاهی بر سطح نانوذرات را تایید نمود (شکل شماره ۲).

یافته‌های حاصل از بررسی اثرات نانوذرات نقره پوشش‌دار با عصاره گیاه بومادران بر طول و تعداد عروق:

در این مطالعه طول عروق و تعداد انشعابات آن در نمونه‌های آزمون و شاهد مورد بررسی قرار گرفت. گروه تجربی با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با میانگین تعداد انشعابات $5/83 \pm 0/11$ و طول عروق $9/54 \pm 0/20$ میلی‌متر نسبت به گروه شاهد به ترتیب $8/45 \pm 1/18$ و $10/23 \pm 0/53$ میلی‌متر کاهش معنی‌دار نشان نداد ($P > 0/05$). در گروه تجربی نانوذرات نقره با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعداد انشعابات ($4/33 \pm 0/05$) نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار ($P < 0/05$) و طول عروق ($7/35 \pm 0/13$ میلی‌متر) نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار ($P < 0/001$) نشان داد. در نمونه تجربی نانوذرات نقره با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعداد انشعابات ($3/66 \pm 0/26$) نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار ($P < 0/01$)، و طول عروق ($6/55 \pm 0/22$ میلی‌متر) نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار ($P < 0/001$) نشان داد و در نمونه تجربی نانوذرات نقره با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعداد انشعابات ($3/25 \pm 0/11$) نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار ($P < 0/01$) و طول عروق ($6/0 \pm 0/12$ میلی‌متر) نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار ($P < 0/001$) داشته است. بنابراین، نانوذرات نقره به‌صورت وابسته به غلظت باعث کاهش معنی‌دار تعداد و طول عروق در گروه‌های تیماری می‌شوند، درحالی‌که غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر کاهش روند رگ‌زایی تاثیر معنی‌داری نداشت (نمودارهای شماره ۱ و ۲ و شکل شماره ۳).

نتایج حاصل از بررسی وزن و طول فرق سری تا نشیمنگاهی جنین‌ها:

مقایسه میانگین وزن ($4/86 \pm 0/21$ گرم) در نمونه شاهد

مرغ‌ها به انکوباتور برگردانده شدند. در روز هشتم انکوباسیون یک اسفنج ژلاتینی (متشکل از محلول آگار در نرمال سالین، و سفیده تخم‌مرغ با نسبت مساوی) روی پرده کوریوآلتوتونیک جنین‌ها قرار داده شد و تیمار نمونه‌ها روی این اسفنج‌ها با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات نقره انجام شد. سپس، محل پنجره‌ها مجدداً پوشانده شد و نمونه‌ها به انکوباتور برگردانده شدند. در روز دوازدهم انکوباسیون از تمام نمونه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره توسط فتواسترونومیکروسکوپ تحقیقاتی (Ziess, Germany) در محدوده اسفنج ژلاتینی عکس‌برداری شد. تعداد و طول عروق با نرم‌افزار ImageJ ثبت گردید. همچنین، وزن و طول فرق سری تا نشیمن-گاهی جنین‌ها با ترازوی دیجیتال (Sartorius, Germany) و کولیس (AACO, China) اندازه‌گیری شد [۱۹].

بررسی غلظت هموگلوبین نمونه‌ها با روش درابکین:

در روز دوازدهم انکوباسیون پس از عکس‌برداری از نمونه‌ها، پرده کوریوآلتوتونیک نمونه‌ها جدا شده و به یک پلیت انتقال داده شد. سپس، توسط قیچی تمام عروق پاره شدند. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه توسط دستگاه هموژنایزر همگن‌سازی شد. سپس، ۲۴ میکرولیتر از محلول حاصل به اپندروف حاوی ۳ میلی-لیتر معرف درابکین افزوده شد و در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. سپس، محلول شفاف رویی به پلیت ۹۶ انتقال داده شد و میزان جذب نوری آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Epock, USA) در طول موج ۵۴۶ نانومتر قرائت گردید و طبق دستورالعمل موجود در کیت درابکین عدد به‌دست آمده برای محاسبه غلظت هموگلوبین با عدد ثابت $36/8$ ضرب شد؛ چراکه سطح غلظت هموگلوبین با عروق تشکیل شده رابطه‌ای مستقیم داشته و به‌عنوان معیاری جهت سنجش تراکم عروق استفاده می‌شود [۲۰]. در پژوهش حاضر اصول کار با جنین جوجه مطابق استانداردهای آزمایشگاهی رعایت گردیده است.

بررسی‌های آماری:

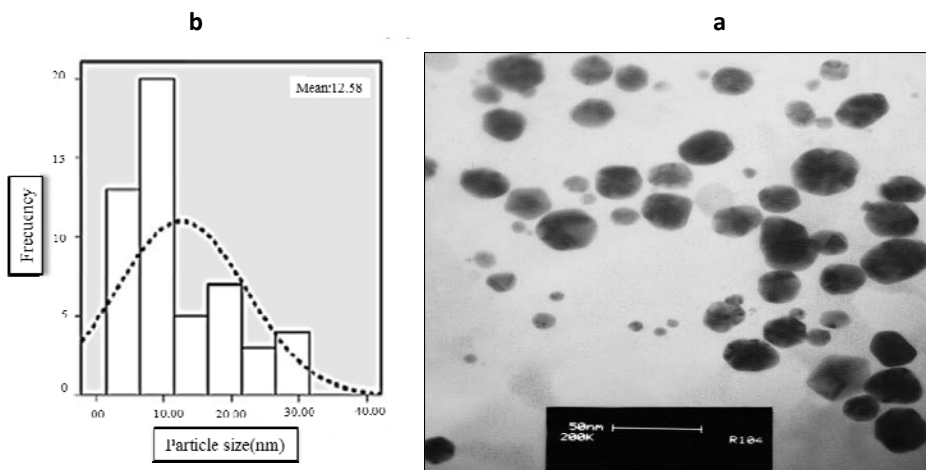
داده‌های کمی توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ و آزمون ANOVA در سطح معنی‌داری $P < 0/05$ تحلیل گردید و به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شد. نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید.

کاهش در سطح معنی‌دار مشاهده نگردید، در بقیه گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بوده است.

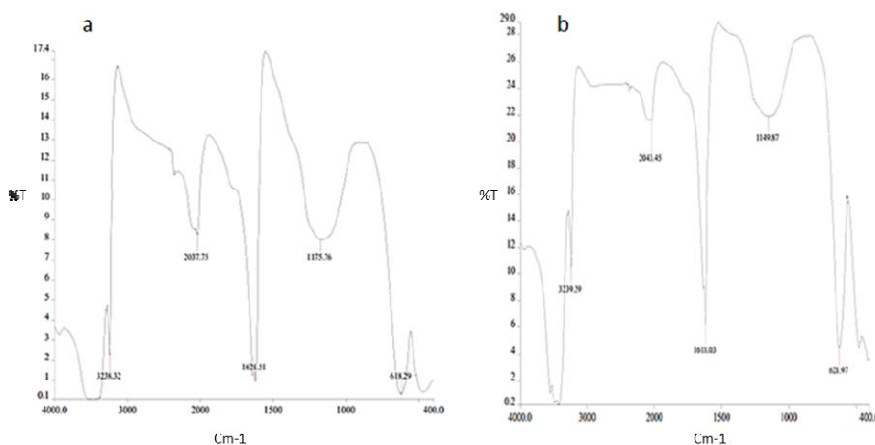
نتایج حاصل از بررسی میزان هموگلوبین خون توسط تست درابکین:

مقایسه میانگین میزان هموگلوبین خون در نمونه شاهد مقایسه می‌گردد با نمونه‌های تجربی نانوذرات نقره با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب (۳/۶۲±۰/۱۲ gr/dL) و (۲/۶۵±۰/۱۹ gr/dL) نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار ($P < 0/01$) نشان داد و در نمونه‌های تجربی نانوذرات نقره با غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب (۲/۳۶±۰/۶۱ gr/dL) و (۲/۲۵±۰/۰۱ gr/dL) نسبت به گروه شاهد دارای کاهش معنی‌دار ($P < 0/001$) بود. با توجه به نتایج به دست آمده، میزان هموگلوبین عروق خونی در تمامی گروه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد به صورت معنی‌دار کاهش یافته است.

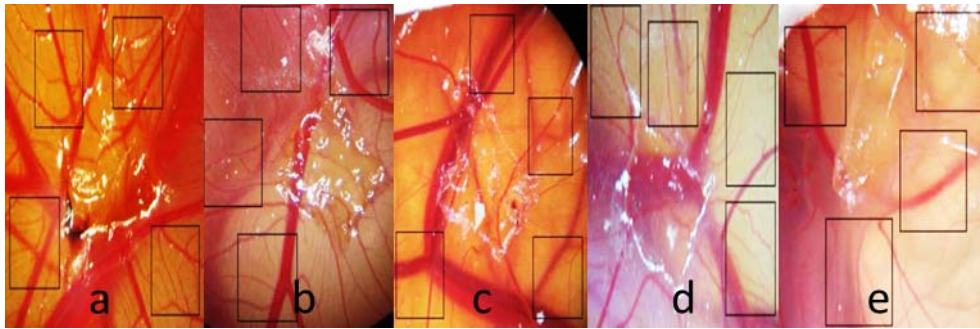
با نمونه‌های تجربی نانوذرات نقره با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۴/۵۱±۰/۱۳ و ۴/۴۵±۰/۲۵ گرم کاهش معنی‌داری نشان نداد ($P > 0/05$)، ولی در نمونه‌های تجربی نانوذرات نقره با غلظت ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۳/۴۶±۰/۲۹ و ۲/۹۶±۰/۲۹ گرم کاهش معنی‌دار ($P < 0/001$) مشاهده شد. مقایسه میانگین طول فرق سری نشیمنگاهی (۴/۲۲±۰/۱۰) سانتی‌متر) در نمونه شاهد با نمونه‌های تجربی نانوذرات نقره با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۴/۰±۰/۱۳ و ۳/۹±۰/۱۸ سانتی‌متر کاهش معنی‌داری نشان نداد ($P > 0/05$). در نمونه تجربی نانوذرات نقره با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۳/۶۶±۰/۰۹ سانتی‌متر) نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار ($P < 0/01$) مشاهده شد و در نمونه تجربی نانوذرات نقره با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۳/۰±۰/۰۶ سانتی‌متر) نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار ($P < 0/001$) مشاهده شد. بنابراین، در مورد وزن و طول فرق سری نشیمنگاهی جنین‌ها به جز نمونه‌های تجربی نانوذرات نقره با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر که



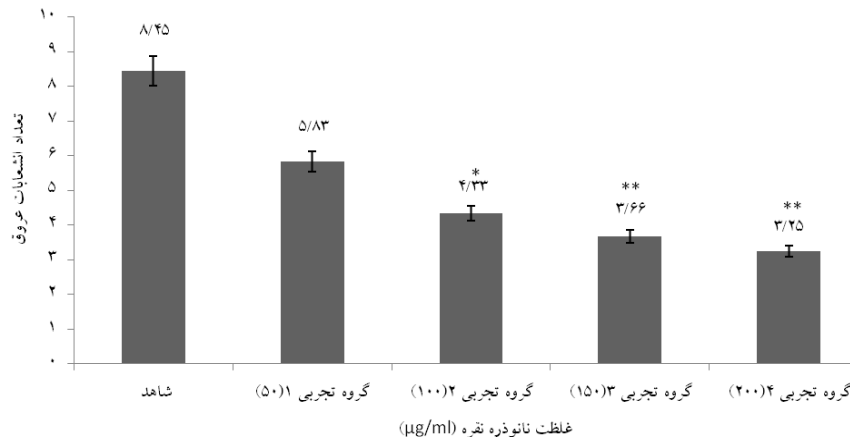
شکل شماره ۱- a تصویر حاصل از عکس‌برداری از نانوذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره، b- نمودار حاصل از اندازه‌گیری نانوذرات نقره



شکل شماره ۲- نمودار حاصل از طیف‌سنجی مادون قرمز. در این تصویر نمودار a نشان دهنده طیف عصاره گیاه بومادران به تنهایی می‌باشد، در حالی که نمودار b طیف حاصل از نانوذرات نقره را نشان می‌دهد. شباهت دو طیف تایید پوشش سطحی نانوذرات از جنس عصاره گیاهی می‌باشد.

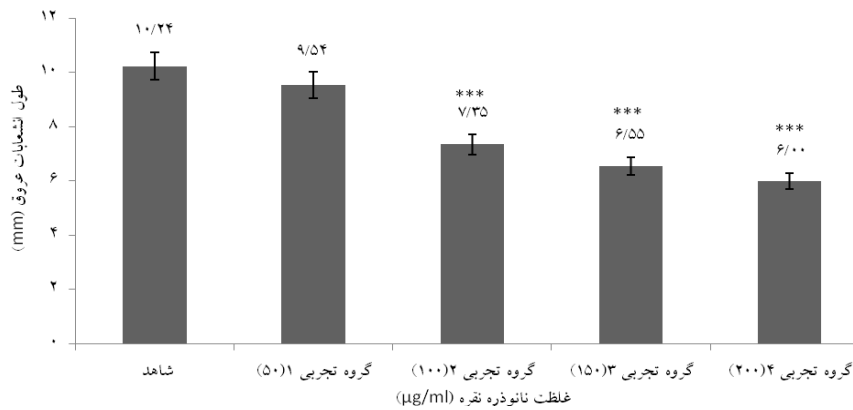


شکل شماره ۳- تصویر استرئومیکروسکوپی از پرده کوریوآلتوتوئیک جنین جوجه در نمونه‌های شاهد و تیمار با نانوذرات نقره
a: نمونه شاهد و b, c, d, e: تیمار با نانو ذره نقره به ترتیب (از چپ به راست) با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر



نمودار شماره ۱- نمودار میانگین تعداد انشعابات عروقی در گروه‌های شاهد و تجربی

** $P < 0.01$ و * $P < 0.05$



نمودار شماره ۲- میانگین طول انشعابات عروقی در گروه‌های شاهد و تجربی

*** $P < 0.001$

کوریوآلتوتوئیک جنین جوجه به عنوان یک مدل قابل اعتماد برای ارزیابی و بررسی روند رگ‌زایی و مهارکننده‌های آن به اثبات رسیده است [۲۱]. در پژوهش Castiglioni و همکارانش در سال ۲۰۱۴ پتانسیل سمیت سلولی نانوذرات نقره با پوشش پلی‌وینیل پیرولیدون در سلول‌های کارسینوما مثانه T24 مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌های ایشان نشان می‌دهد که نانوذرات نقره با فعال-سازی مسیر ERK1/2 موجب سمیت سلولی در سلول‌های T24

بحث

در مطالعه حاضر اثرات نانوذرات نقره پوشش‌دار شده با عصاره گیاه بومادران زرد بر رگ‌زایی در پرده کوریوآلتوتوئیک جنین جوجه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره ساخته شده به روش سبز با پوشش عصاره گیاه بومادران در غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به صورت وابسته به غلظت باعث کاهش رگ‌زایی می‌شوند. مدل غشای پرده

می‌شوند [۹]، درحالی‌که در پژوهش حاضر به‌منظور کاهش اثرات جانبی احتمالی نانوذرات نقره از روش ساخت سبز توسط گیاه بومادران زرد استفاده گردید. در برخی مطالعات قبلی از روش پرده کوریوآلانتوئیک برای بررسی اثرات ضد رگ‌زایی نانوذرات نقره استفاده شده است. در پژوهش Kemp و همکاران نیز به‌منظور بررسی اثرات ضد رگ‌زایی نانوذرات نقره با پوشش هپارین از مدل پرده کوریوآلانتوئیک استفاده شده است. براساس یافته‌های آنها استفاده از هپارین به‌عنوان پوشش موجب کاهش معنی‌دار رگ‌زایی در مقایسه با نانوذرات نقره به‌تنهایی شده است [۲۲]. بر-اساس نتایج مطالعات قبلی کاربرد نانوذرات پوشش‌دار موجب افزایش پتانسیل مهاری آن بر رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه می‌شود. در پژوهش حاضر نیز از مدل پرده کوریو-آلانتوئیک جنین جوجه به‌منظور بررسی اثرات مهاری نانوذرات نقره ساخته شده به روش سبز با پوشش عصاره گیاه بومادران زرد بر رگ‌زایی استفاده گردید. از نقاط ضعف این پژوهش در رابطه با استفاده از مدل پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه به عدم رشد و نمو برخی از جنین‌های جوجه در دستگاه جوجه‌کشی می‌توان اشاره کرد. براساس مطالعات انجام شده اثرات مهاری نانوذرات نقره ساخته شده به روش زیستی نسبت به نانوذرات تجاری روی رده‌های سرطانی بیشتر است [۱۲]. لذا، در پژوهش حاضر از روش زیستی به‌منظور ساخت نانوذرات نقره استفاده گردید. در این زمینه محققین قبلی گزارش کرده‌اند نانوذرات نقره ساخته شده با عصاره گیاه مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) منجر به کاهش تعداد و طول رگ‌ها و همچنین کاهش طول فرق سری تا نشیمنگاهی و وزن جنین‌ها در نمونه‌ها تحت تیمار می‌شود. به‌علاوه، تجربیات قبلی نشان داده است که غلظت هموگلوبین به‌عنوان معیاری برای سنجش تراکم عروق پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه، در نمونه‌های تجربی تیمار شده با نانوذرات نقره نسبت به نمونه کنترل کاهش معنی‌دار یافته است. در این مطالعه نشان داده شده است که در مدل پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه، نانوذرات نقره اثرات سمیت وابسته به دوز در سلول‌های اندوتلیال و مهار تشکیل رگ-های خونی را دارند [۱]، که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر هم-سو می‌باشد. بر اساس نتایج این پژوهش نانوذرات نقره با پوشش گیاه بومادران زرد به‌صورت وابسته به دوز موجب کاهش معنی‌دار غلظت هموگلوبین خون در نمونه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد گردیده است. همچنین، براساس نتایج مطیع و همکاران در سال ۲۰۱۶ نانوذرات نقره دارای اثرات مهاری بر رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه است [۲۳]. Koyyati و همکاران گزارش نموده‌اند که نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره گیاه

"*Morinda pubescens*" دارای پتانسیل بالایی برای مهار تکثیر سلول‌های کارسینومای کبد است [۲۴]. Samina و همکاران نیز گزارش کرده‌اند که نانوذرات ساخته شده به‌روش زیستی نسبت به دو داروی متوتروکسات و وینبلاستین بر رده‌های سلولی H_{157} و HT_{144} دارای اثرات ضد سرطانی بیشتر و موثرتری می‌باشند [۲۵]. در مطالعه حاضر از گیاه بومادران زرد به‌عنوان ترکیبی طبیعی، برای ساخت و پوشش نانوذرات نقره استفاده گردید. گیاه بومادران دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد تکثیری می‌باشد [۱۶]. به‌عنوان مثال، در مطالعه Lin و همکاران اثرات ضد تکثیری عصاره این گیاه بر رده سلولی سرطان کبد تایید شده است [۲۶]. در پژوهشی دیگر مشخص شد که عصاره گیاه بومادران منجر به مهار سلول‌های سرطان خون در موش می‌گردد [۲۷]. قوامی و همکاران نیز خواص ضد سرطانی گیاه بومادران زرد را در برابر شش دودمان شامل سرطان معده، پستان، ملانوما، ریه، کولورکتال ادنوکارسینوما و سرطان کبد مورد پژوهش قرار دادند و گزارش نمودند که این گیاه می‌تواند به‌عنوان عاملی بالقوه برای مهار سرطان به‌کار رود [۲۸]. بنابراین، با توجه به اثرات مهاری گیاه بومادران بر رگ‌زایی به‌نظر می‌رسد که ممکن است بخشی از اثرات مهاری نانوذرات نقره نیز به‌دلیل پوشش زیستی آنها بوده باشد. سلول‌های اندوتلیال و فیبروبلاست عناصر کلیدی در روند آنژیوژنز می‌باشند و براساس مطالعات انجام شده، نانوذرات نقره با مهار فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) موجب مهار رگ‌زایی می‌شوند [۲۹، ۳۱]. در نتیجه نانوذرات نقره با هدف قرار دادن این سلول‌ها به ابزار مفید در درمان سرطان‌ها تبدیل شده‌اند [۹]. به‌نظر می‌رسد نتایج پژوهش ما هم‌راستا با نتایج تحقیقات سایر پژوهشگران، درخصوص اثرات ضد رگ‌زایی نانو-ذرات نقره بوده است و می‌توان پیشنهاد کرد احتمالاً تیمار پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه با نانوذرات نقره از طریق مهار بیان فاکتورهای مهم رگ‌زایی VEGF و FGF در سلول‌های اندوتلیال عروقی از رگ‌زایی ممانعت نموده است.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر بیان‌گر آن است که نانوذرات نقره پوشش‌دار شده با گیاه بومادران زرد به‌صورت وابسته به غلظت دارای اثرات مهاری بر رگ‌زایی در مدل پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه است. از آنجاکه مکانیسم عمل نانوذرات نقره بر مهار رگ‌زایی تاحدی هنوز ناشناخته مانده است، لذا پیشنهاد می‌شود روی مکانیسم اثر و بیان ژنتیکی مرتبط با آن و مسیرهای سیگنال-دهی در شرایط آزمایشگاهی و طبیعی تحقیقات بیشتری صورت

گیرد. همچنین، بررسی اثرات نانوذرات نقره جهت درمان بیماری-های مرتبط با رگ‌زایی مورد توجه بیشتری قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاران محترم مرکز تحقیقاتی بیولوژی-

کاربردی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد که در انجام این پژوهش همکاری داشتند، سپاسگزاری می‌شود. این مقاله با کد اخلاق /ir/IAUM/1394/19/265 به ثبت رسیده است و حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۴ با کد مصوب ۱۱۳۰۵۱۷۹۳۱۰۰۹ می‌باشد.

References:

- [1] Baharara J, Namvar F, Mousavi M, Ramezani T, Mohamad R. Anti-angiogenesis effect of biogenic silver nanoparticles synthesized using *Saliva officinalis* on chick chorioalantoic membrane (CAM). *Molecules* 2014; 19(9): 13498-508.
- [2] Carmeliet P, Luttun A. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001; 86(1): 289-97.
- [3] Heidenreich R, Rocken M, Ghoreschi K. Angiogenesis: the new potential target for the therapy of psoriasis. *Drug News Perspect* 2008; 21(2): 97-105.
- [4] Kouhestanian K, Baharara J, Ramezani T, Mousavi M. Antiangiogenic effects of eugenol in chorioallantoic membrane of chick embryo. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2015; 23(4): 2109-17. [in Persian]
- [5] Lee S, Sivakumar K, Shin WS, Xie F, Wang Q. Synthesis and anti-angiogenesis activity of coumarin derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16(17): 4596-9.
- [6] Naghsh N, Doudi, M, Safaeinejad, Z. The Antifungal Activity of Silver Nanoparticles and Fluconazole on *Aspergillus Fumigatus*. *Med Lab J* 2013; 7(2): 7-12.
- [7] Palaniappan P, Sathishkumar G, Sankar R. Fabrication of nano-silver particles using *Cymodocea serrulata* and its cytotoxicity effect against human lung cancer A549 cells line. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2015; 138(5): 885-90.
- [8] Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett* 2008; 176(1): 1-12.
- [9] Castiglioni S, Cazzaniga A, Perrotta C, Maier JA. Silver Nanoparticles-induced Cytotoxicity Requires Erk Activation in Human Bladder Carcinoma Cells. *Toxicol Lett* 2015; 732(3): 237-43.
- [10] Sheikpranbabu S, Kalishwaralal K, Venkataraman D, Eom SH, Park J, Gurunathan S. Silver nanoparticles inhibit VEGF-and IL-1beta-induced vascular permeability via Src dependent pathway in porcine retinal endothelial cells. *J Nanobiotechnol* 2009; 7(1):8
- [11] Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine* 2012; 6(1): 103-109.
- [12] Rashmezzad MA, Ali Asgary E, Tafvizi F, Shandiz S, Ataollah, S, Mirzaie A. Comparative study on cytotoxicity effect of biological and commercial synthesized nanosilver on human gastric carcinoma and normal lung fibroblast cell lines. *Tehran Univ Med J* 2015; 72(12): 799-807. [in Persian]
- [13] Andeani JK, Kazemi H, Mohsenzadeh S, Safavi A. Biosynthesis of gold nanoparticles using dried flowers extract of *Achillea wilhelmsii* plant. *Dig J Nanomater Bios* 2011; 6:1011-7. [in Persian]
- [14] Khan Z, Hussain, JI, Hashmi AA. Shape-directing role of cetyltrimethylammonium bromide in the green synthesis of Ag-nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf extract. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012; 95: 229-34.
- [15] Chandran SP, Chaudhary M, Pasricha R, Ahmad A, Sastry M. "Synthesis of Gold Nanotriangles and Silver Nanoparticles Using Aloe Vera Plant Extract". *J Biotechnol Prog* 2006; 22(2): 577-83.
- [16] Alikhanzade M, Tehranipour M, Khayatizade J. Investigating the neuroprotective effect of alcoholic extracts of *achillea biebersteinii* leave on a motoneurons after sciatic nerve compression in rats. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2014; 22(4): 1323-32. [in Persian]
- [17] Asma M, Alenad AM, Al-Jaber NA, Krishnaswamy S, Yakout SM, Al-Daghri NM, et al. *Achillea fragrantissima* extract exerts its anticancer effect via induction of differentiation, cell cycle arrest and apoptosis in chronic myeloid leukemia (CML) cell line K562. *J Med Plants Res* 2013; 7(21): 1561-7.
- [18] Baharara J, Namvar F, Ramezani T, Hosseini N, Rosfarizan M. Green Synthesis of Silver Nanoparticles using *Achillea biebersteinii* Flower Extract and Its Anti-Angiogenic Properties in the Rat Aortic Ring Model. *Molecules* 2014; 19(4): 4624-34.
- [19] Mousavi M, Baharara J, Zafar-balanezhad S, Shaheokh-abadi, K. The Effect of *Saffron aqua* Extract on Angiogenesis in Chick Chorioalantoic Membrane. *Zahedan J Res Med Sci* 2014; 16(3): 55-58. [in Persian]
- [20] Majidian Eidgahi Sh, Baharara J, Zafar Balanezhad S. Comparison of anti-angiogenic effect

of Licorice root aqueous extract and Glycyrrhizic acid chick Chorioallantoic membrane. *Complementary Med J Fac Nurs Midw* 2015; 4(4): 967-76. [in Persian]

[21] Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(11): 1162-76.

[22] Kemp M M, Kumar A, Mousa Sh, Dyskin E, Yalcin M, Ajayan P, et al. Gold and silver nanoparticles conjugated with heparin derivative possess anti-angiogenesis properties. *Nanotechnology* 2009; 20(45): 455104.

[23] Motie M, Baharara J, Iranbakhsh A, Ramezani T. Synergic Application Effects of Silver Nanoparticles and Low-Frequency Electromagnetic Field on the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane on Angiogenesis. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2016; 24(4): 317-28. [in Persian]

[24] Koyyati R, Nagati V, Merugu R, Manthurpadigya P. Biological synthesis of silver nanoparticles using *Raphanus sativus* var.

longipinnatus leaf extract and evaluation of their antioxidant and antibacterial activity. *IJMPS* 2013; 3(4): 89-100.

[25] Nazir S, Hussain T, Iqbal Md MK, Muazzam AG, Ismail JM. Novel and cost-effective green synthesis of silver nano particles and their in vivo antitumor properties against human cancer cell lines. *J Biosci Tech* 2011; 2(6): 425-30.

[26] Lin LT, Liu LT, Chiang LC, Lin CC. In vitro Anti-hepatoma Activity of Fifteen Natural Medicines from Canada. *Phytother Res* 2002; 16(5): 440-4.

[27] Goun EA, Petrichenko VM, Solodnikov SU, Suhinina TV, Kline MA, Cunningham G, et al. Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. *J Ethnopharmacol* 2002; 81(3): 337-42.

[28] Ghavami G, Sardari S, Shokrgozar MA. Anticancerous potentials of *Achillea* species against selected cell lines. *J Med Plant Res* 2010; 4(22): 2411-7.

[29] Dubey S. P, Lahtinen M, Sillanpaa M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. *Process Biochemistry* 2010; 45(7): 1065-71.