



## بررسی اثرات کاربرد توام اسکوپولتین و نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز بر رگزایی در مدل پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه

پریسا زمانی عصمتی<sup>۱</sup>، جواد بهار آرا<sup>۲\*</sup>، علیرضا ایرانبخش<sup>۳</sup>، طیبه رضانی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.

<sup>۳</sup> گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، تهران، ایران.

<sup>۴</sup> گروه زیست شناسی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

[baharara@yahoo.com](mailto:baharara@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۲۸

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۹

### چکیده

امروزه خواص ضد رگزایی فرآورده های گیاهی مورد توجه محققان قرار دارد. نانو ذرات نقره (AgNPs) سنتز شده به روش سبز و اسکوپولتین دارای خواص ضد رگزایی هستند. در مطالعه حاضر کاربرد توام این دو ماده بر رگ زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه بررسی گردید. در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی تخم مرغ های نطفه دار به گروه شاهد و گروه های تجربی شامل نمونه های تیمار شده با نانو ذرات نقره (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰)، اسکوپولتین (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰)، گروه هم افزایی شامل ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  نانو ذرات نقره و ۲۵  $\mu\text{g/ml}$  اسکوپولتین تقسیم شدند. روز هشتم انکوباسیون تیمار بر روی اسفنج ژلاتینی انجام شد و روز دوازدهم پس از عکس برداری، تعداد و طول انشعابات عروقی، طول فرق سری-نشیمنگاهی، وزن جنین ها و سطح هموگلوبین عروق خونی ثبت و با شاهد مقایسه گردید. داده ها توسط نرم افزار SPSS-۱۶، آزمون های واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey در سطح معنی داری  $P>0/05$  تجزیه و تحلیل گردید. یافته ها نشان داد نانو ذرات نقره و اسکوپولتین، وابسته به دوز منجر به کاهش تعداد و طول عروق خونی و سطح غلظت هموگلوبین خون در نمونه های تیماری می شود. بکارگیری توام غلظت های ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  نانو ذرات نقره و غلظت ۲۵  $\mu\text{g/ml}$  اسکوپولتین که بر روند آنژیوژنز بی تاثیر بودند، کاهش معنی دار رگ زایی را نشان دادند ( $P>0/05$ ). بکارگیری توام نانوذرات نقره و اسکوپولتین باعث تقویت اثر ضد رگزایی آنها شده و می تواند به عنوان یک زمینه مطالعاتی مهم جهت شناسایی راه های درمانی موثر مورد توجه قرار گیرد.

کلید واژه ها: آنژیوژنز، اسکوپولتین، پرده کوریوآلانتوئیک، نانو ذره نقره

مقدمه:

آنژیوژنز، به معنی تشکیل عروق جدید از رگ های قبلی است که در شرایط فیزیولوژیک مانند تولید مثل و شرایط پاتولوژیک مانند رشد تومور و متاستاز امری حیاتی محسوب می شود [۱۷]. در آنژیوژنز نرمال تعادل بین فاکتورهای القا کننده و مهار کننده وجود دارد که در صورت برهم خوردن این تعادل، شرایط برای بروز برخی بیماری ها نظیر رتینوپاتی دیابتی، آرتریت روماتوئید، انواع سرطان ها و تومور ها به وجود می آید [۷]. امروزه افزایش مقاومت به درمان های رایج در سرطان ها مسئله ساز شده است، به طوریکه مقاومت سلول های سرطانی نسبت به داروهای شیمیایی منجر به کاهش پاسخ این سلولها نسبت به دارو و در نهایت منجر به شکست اقدامات درمانی میگردد، بنابراین تحقیق و توسعه به منظور افزایش اثربخشی داروها و کاهش اثرات جانبی آنها از اهمیت زیادی برخوردار می باشد [۱۳]. مهار رگ زایی در تومور می تواند روش مناسبی برای غلبه بر مقاومت دارویی در انواع سرطان ها باشد و تاکنون مطالعات زیادی جهت بررسی اثرات ضد رگ زایی مواد مختلف انجام گرفته است [۱۹]. پیشرفت سریع نانو تکنولوژی و تنوع کاربردهای آن موجب استفاده وسیعی از مواد با ابعاد نانو گردیده است [۲۰]. گفته می شود، نقره در ابعاد نانو دسترسی بیشتری به بافت ها، سلول ها و مولکول های بیولوژیک بدن موجودات زنده دارد و تا کنون اثرات ضد التهاب، ضد سرطان، و آنتی اکسیدانی آن به اثبات رسیده است [۱۴]. از طرفی سنتز نانوذرات نقره با روش های زیست سازگار با ویژگی امکان تولید آسان در مقیاس بالا بدون نیاز به استفاده از ترکیبات سمی، دما و فشار بالا، موجب بالا رفتن اهمیت استفاده از آنها در درمان های انسانی شده است [۱۸]. در پژوهش های انجام شده اثرات ضد توموری نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی در برابر برخی از

دارو های شیمیایی به اثبات رسیده است [۲]. در سال های اخیر سنتز نانو ذرات نقره به روش زیستی توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است و تا به حال با بهره گیری از گیاهان دارویی متنوعی از جمله، عصاره گیاه مریم گلی، اکالیپتوس، آلوئه ورا، زیره سیاه و ... به سنتز این نانو ذرات پرداخته شده است، از این میان گیاه بومادران با نام علمی "*Achillea biebersteinii*" دارای خواص دارویی و درمانی مختلف از جمله خواص آنتی باکتریال، آنتی اکسیدانی، ضد اسپاسم و ضد التهاب است که بومی اکثر مناطق ایران می باشد [۲]. نتایج مطالعه ی *Alenad* و همکاران بر روی خواص ضد سرطانی عصاره گیاه بومادران بر روی سلولی K562 نشان دهنده ی پتانسیل درمانی این گیاه از طریق القاء تمایز، مهار چرخه ی سلولی و آپوپتوز در سلول های سرطانی بوده است [۱] و در این مطالعه از عصاره ی گیاه بومادران زرد جهت تولید و پوشش دهی نانو ذرات نقره استفاده شد. همچنین مطالعات زیادی بر روی اثر ترکیبات فنولیک بر پیشگیری و درمان سرطان ها انجام شده است، از جمله کومارین ها که امروزه با استفاده از مشتقات آنها، سمیت سلولی را کاهش و اثر درمانی آن را افزایش داده اند، یکی از این مشتقات ماده ای به نام اسکوپولتین است که با مهار سلول های اندوتلیال از طریق مهار مسیر های *ERK1/2* و فسفوریلاسیون پروتئین کیناز فعال شده با میتوز که در رگزایی نقش محوری ایفا می کنند، موجب مهار مهاجرت سلول های اندوتلیال و تشکیل لوله می شود، در نتیجه انتظار میرود این ماده به عنوان مهار کننده ی خاص آنژیوژنز کاندایدی مناسبی برای درمان بیماری های مرتبط با رگزایی از جمله سرطان باشد [۱۵]. از این رو در تحقیق حاضر از دو ماده ی نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز با پوشش عصاره گیاه بومادران زرد و

بعدی نگهداری شد. جهت سنتز نانو ذرات نقره ۱۰۰۰ میکرو لیتر از عصاره مذکور با ۱۰۰ میلی لیتر نیترات نقره ۵ میلی مولار دور از نور مخلوط شدند، تغییر رنگ محلول از زرد کم رنگ به قهوه ای نشان دهنده آغاز سنتز نانو ذرات نقره میباشد.

#### اندازه گیری نانو ذرات نقره:

اندازه متوسط نانو ذرات با استفاده از دستگاه DLS(Cordovan, Vaso particle, France) تعیین گردید قبل از اندازه گیری برای اطمینان از همگن بودن ذرات نمونه ها از سونیکت به مدت ۵ دقیقه استفاده گردید.

مطالعات طیف سنجی مادون قرمز (Fourier transform infrared) FT-IR قبل از انجام آنالیز به منظور حذف هرگونه باقیمانده توده زیستی آزاد و یا عصاره بدون اتصال به سطح، نانو ذرات نقره ۳ بار با آب مقطر شسته شدند، سپس این نانو ذرات در ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد، سپس با دستگاه انجماد خشک پودر شدند. نانو ذرات نقره و پودر عصاره گیاه بومادران با پودر KBr مخلوط شدند طیف مادون قرمز در محدوده ۴۰۰۰ - ۴۰۰ نانومتر برای عصاره گیاه بومادران نانو ذرات سنتز شده بطور جداگانه ثبت گردید.

#### بررسی اثرات ضد رگ زایی نانو ذرات نقره با پوشش گیاه بومادران زرد بر پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه

تعداد ۸۰ عدد تخم مرغ نطفه دار نژاد راس به صورت تصادفی در ۸ گروه آزمون به صورت تصادفی و مساوی شامل گروه شاهد، سه گروه تجربی نانو ذرات نقره (با غلظت های ۵۰، ۱۰۰، و ۱۵۰)  $\mu\text{g/ml}$  و سه گروه تجربی اسکوپولتین (با غلظت های ۰.۲۵، ۵۰، و ۱۰۰) و یک گروه تجربی هم افزایی (تیمار با غلظت ۵۰  $\mu\text{g/ml}$

اسکوپولتین با منشا گیاهی، با هدف اثر بخشی بیشتر و کاهش عوارض جانبی، با در نظر داشتن کمترین غلظت مورد استفاده، به اثرات توام این دو ماده بر آنژیوژنز در پرده ی کوریوآلانتوئیک جنین جوجه پرداخته شده است.

#### مواد و روش ها:

این پژوهش تجربی آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در سال ۱۳۹۵ انجام شد، از تخم مرغهای نطفه دار نژاد ROSS به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده گردید. تخم مرغهای نطفه دار از شرکت مرغداران طوس مشهد تهیه شدند. گیاه بومادران زرد نیز با شماره هرباریومی ۳۴۵۱۶ در هر بار یوم دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی گردید. اسکوپولتین خالص نیز از شرکت سیگما تهیه گردید.

نانو ذرات نقره با پوشش گیاه بومادران در مرکز تحقیقاتی بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی سنتز گردید و با روش های بررسی طیف نوری در محدوده نور فرابنفش-نور مرئی، اندازه نانو ذرات، عکس برداری با میکروسکوپ الکترونی گذاره و طیف سنجی مادون قرمز شناسایی انجام شد.

#### روش کار:

#### تهیه نانو ذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران زرد و شناسایی آنها

تهیه نانو ذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران زرد و شناسایی آن ها: بدین منظور ۵ گرم از گیاه بومادران زرد با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر دو بار استریل مخلوط گردید و روی هاتپلیت قرار داده شد تا بجوشد، سپس این عصاره با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید و در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای استفاده های

نانوذرات نقره و  $25. \mu\text{g/ml}$  اسکوپولتین) تقسیم شدند، تخم مرغ های نطفه دار در دستگاه جوجه کشی (Cocks, netherland)، دردمای  $38$  درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی  $65$  درصد قرار گرفتند، در روز دوم انکوباسیون در شرایط کاملا استریل ایجاد شده توسط هود لامینار (Telstar, Spain) با تکنیک پنجره بخشی از پوسته تخم مرغها برداشته شد، سپس به وسیله چسب زخم و پارافین استریل (پارافین فارا، ایران) پنجره ای در یک طرف تخم مرغ ها ایجاد گردید، سپس به انکوباتور برگردانده شدند، در روز هشتم انکوباسیون یک اسفنج ژلاتینی (متشکل از محلول آگار در نرمال سالین، و سفیده تخم مرغ با نسبت مساوی) بر روی پرده کوریوآلانتوئیک نمونه ها قرار داده شد و تیمار نمونه ها بر روی این اسفنج ها با غلظت های  $50$ ،  $100$  و  $150$  از نانو ذرات نقره و غلظت های  $25. \mu\text{g/ml}$ ،  $50$  و  $100$  از اسکوپولتین و در گروه هم افزایی غلظت  $50 \mu\text{g/ml}$  از نانو ذرات نقره و  $25 \mu\text{g/ml}$  از اسکوپولتین انجام شد، سپس محل پنجره ها مجددا پوشانده شد و نمونه ها به انکوباتور برگردانده شدند، در روز دوازدهم انکوباسیون از تمام نمونه های شاهد و تیمار با غلظت های مختلف نانو ذرات نقره توسط فتواسترئومیکروسکوپ تحقیقاتی (Ziess, Germany) در محدوده ی اسفنج ژلاتینی عکسبرداری شد، تعداد و طول عروق با نرم افزار Image J ثبت گردید، همچنین وزن و طول فرق سری تا نشیمنگاهی جنین ها به ترتیب با ترازوی دیجیتال (Sartorius, Germany) و کولیس (AACO, China) اندازه گیری شدند [۱۳].

#### اندازه گیری محتوی هموگلوبین نمونه ها با روش درابکین:

در روز دوازدهم انکوباسیون پس از عکسبرداری از نمونه ها، پرده کوریوآلانتوئیک نمونه ها جدا و به یک پلیت انتقال داده شد، سپس توسط قیچی تمام عروق پاره شدند، پس از آن به مدت  $10$  دقیقه توسط دستگاه هموژنایزر همگن

سازی شد، سپس  $24$  میکرولیتر از محلول حاصل به اپندروف حاوی  $3$  میلی لیتر معرف درابکین افزوده شد و در ادامه به مدت  $10$  دقیقه با سرعت  $5000$  دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام شد، سپس محلول شفاف رویی رابه پلیت  $96$  خانه انتقال دادیم و میزبان جذب نوری آن توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (EPOCH, US) در طول موج  $546$  نانومتر قرائت گردید [۴]. وعدد بدست آمده برای محاسبه ی غلظت هموگلوبین در عدد ثابت  $36/8$  ضرب شد، چرا که سطح غلظت هموگلوبین با عروق تشکیل شده رابطه ای مستقیم داشته وبه عنوان معیاری جهت سنجش تراکم عروق استفاده می شود.

در پژوهش حاضر اصول کار با جنین جوجه به صورت استاندارد های آزمایشگاهی رعایت شد.

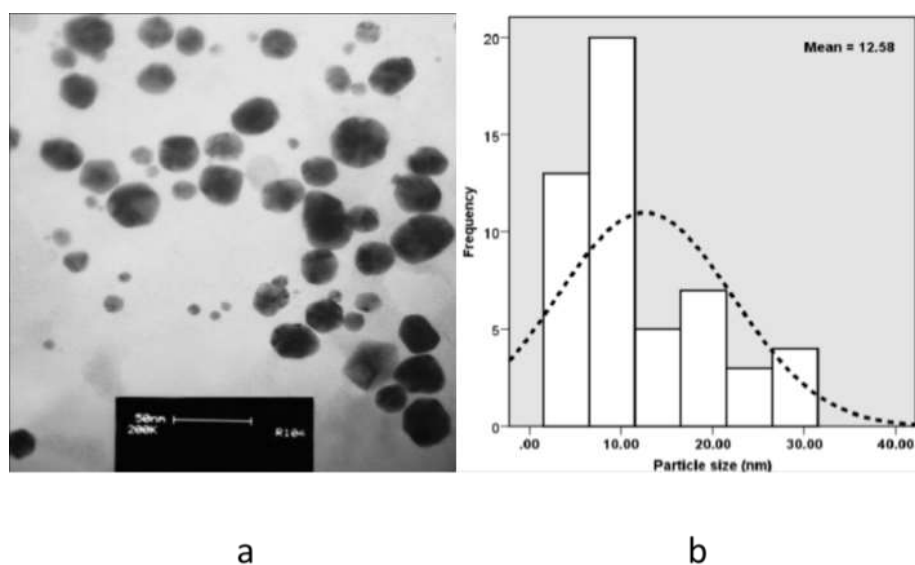
#### بررسی های آماری:

داده های کمی توسط نرم افزار SPSS-16، آزمون های واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey در سطح معنی داری  $P < 0/05$  تحلیل گردید و نمودارها توسط Excel رسم گردید.

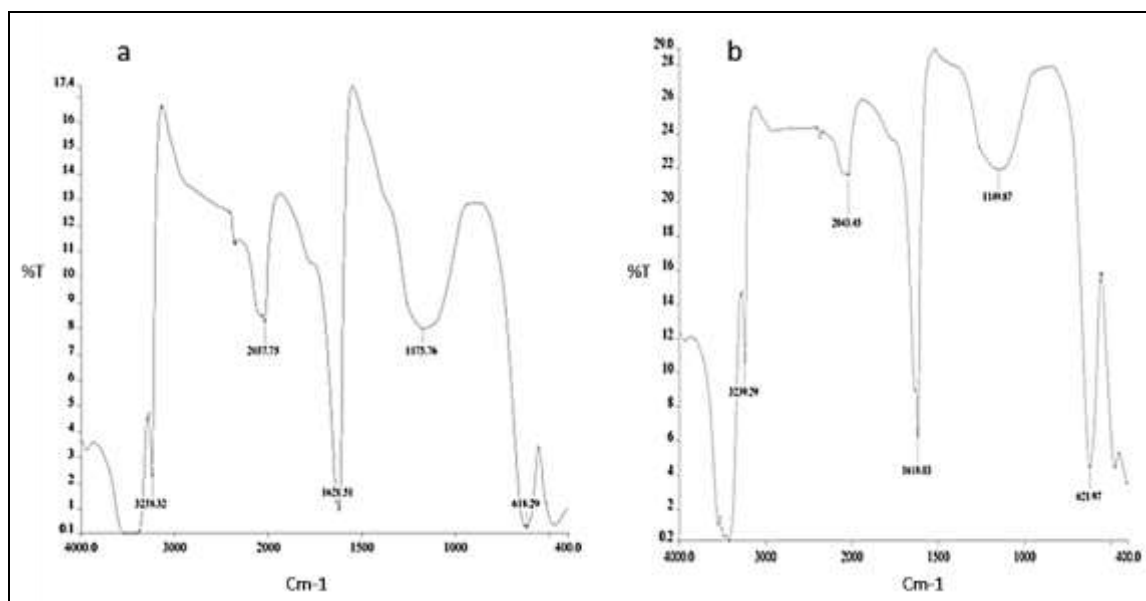
#### نتایج:

#### نتایج حاصل از شناسایی نانو ذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران زرد و ویژگی های آن:

نتایج حاصل از بررسی اندازه نانو ذرات نقره نشان داد که متوسط اندازه این نانو ذرات  $12$  نانومتر است و دامنه پراکنش نانو ذرات بین  $1$  تا  $30$  نانومتر قرار داشت (شکل ۱). هم چنین نتایج حاصل از طیف سنجی مادون قرمز نشان داد که نمودارهای حاصل از نانو ذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران زرد با نمودار حاصل از عصاره گیاه بومادران زرد شباهت زیاد دارد این نتایج قرار گیری عصاره گیاهی بر سطح نانو ذرات را تایید نمود (شکل ۲)



شکل ۱: (a) تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی گذاره. (b) اندازه نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز



شکل ۲: نمودار حاصل از طیف سنجی مادون قرمز، در این تصویر نمودار a نشان دهنده طیف عصاره گیاه بومادران می باشد در حالی که نمودار b طیف حاصل از نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران را نشان می دهد، شباهت دو طیف تایید پوشش سطحی نانو ذرات از جنس عصاره گیاهی می باشد.

ذرات نقره، نشان داد که غلظت های بیشتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر منجر به کاهش معنی دار ( $P < 0/05$ ) تعداد و طول عروق شده است و همچنین در نمونه های تیمار با اسکوپولتین نشان داد که غلظت های

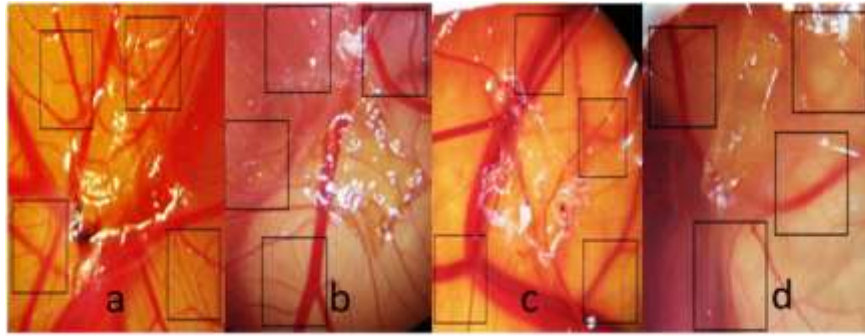
نتایج حاصل از بررسی طول و تعداد انشعابات عروقی در پرده کوریوآلانتوییک جنین جوجه:

نتایج حاصل از بررسی تعداد و طول عروق در پرده کوریوآلانتوییک جنین جوجه در گروه های تیمار با نانو

ذرات نقره و ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر از اسکوپولتین جهت هم افزایی استفاده گردید(نمودار ۱، شکل ۳، جدول ۱).

بیشتر از ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر منجر به کاهش معنی دار ( $P<0/05$ ) تعداد و طول عروق شده است.

با توجه به نتایج حاصل از بررسی تعداد و طول انشعابات عروق، غلظت های ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از نانو



شکل ۳: تصویر استرئو میکروسکوپی از پرده کوریوآلانوتونیک جنین جوجه در نمونه های تیمار با نانو ذرات نقره و اسکوپولتین

a: نمونه شاهد: b,c,d به ترتیب گروه های تجربی تیمار با نانو ذرات نقره (۵۰ µg/ml)، اسکوپولتین (۲۵ µg/ml) و هم افزایی (اسکوپولتین ۲۵ µg/ml و نانوذرات نقره ۵۰ µg/ml)

جدول ۱. میانگین مقادیر متغیرهای تعداد و طول انشعابات عروق خونی

p-Value	میانگین تعداد انشعابات عروقی (n)	p-Value	میانگین طول عروق (mm)	گروه های تجربی (µg/ml)
-	8/45±1/18	-	10/23±0/53	کنترل
P>0/05	3/83±0/08	P>0/05	9/58±0/25	اسکوپولتین (25)
P<0/05	3/77±0/08	P<0/01	7/49±0/25	اسکوپولتین (50)
P<0/01	2/75±0/17	P<0/001	5/78±0/29	اسکوپولتین (100)
P>0/05	5/83±0/11	P>0/05	9/54±0/20	نانوذره نقره (50)
P<0/05	4/33±0/05	P<0/01	7/36±0/13	نانوذره نقره (100)
P<0/01	3/66±0/26	P<0/001	6/55±0/22	نانوذره نقره (150)
P<0/01	3/37±0/11	P<0/001	5/41±0/18	هم افزایی (اسکوپولتین 25، نانوذره نقره 50)

در مقایسه با گروه شاهد معنی دار ( $P<0/05$ ) بوده است. همچنین در بررسی وزن جنین ها در نمونه تجربی اسکوپولتین با غلظت ۵۰ µg/ml، کاهش در سطح معنی دار مشاهده نگردید ( $P>0/05$ )، سایر گروه های تجربی در مقایسه با گروه شاهد معنی دار ( $P<0/05$ ) بوده است.

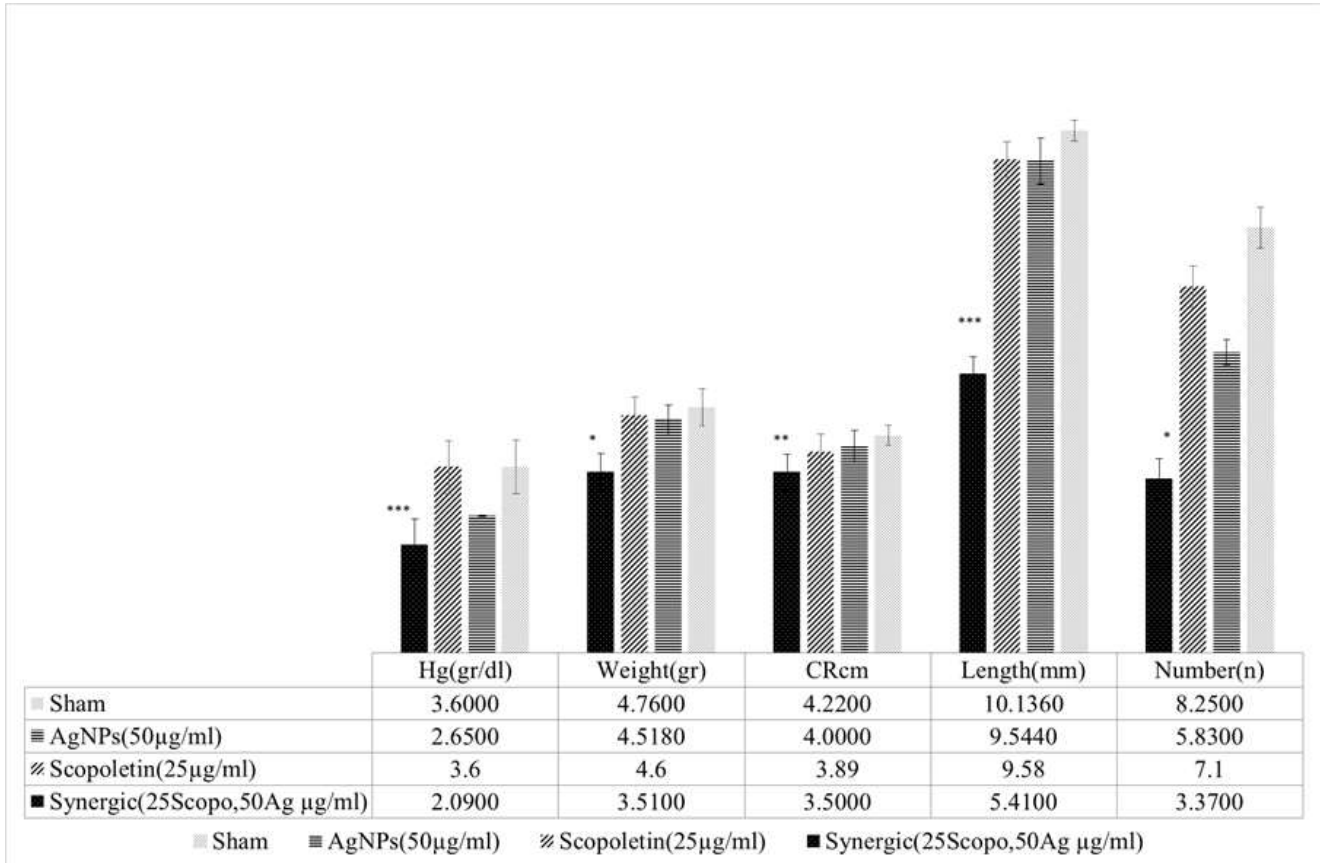
نتایج حاصل از بررسی طول فرق سری - نشیمنگاهی و وزن جنین ها: در بررسی میانگین طول فرق سری-نشیمنگاهی جنین ها برای گروه های نانو ذرات نقره با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و اسکوپولتین با غلظت ۲۵ µg/ml، کاهش در سطح معنی دار مشاهده نگردید ( $P>0/05$ ). بقیه ی گروه های تجربی

( $P > 0/05$ )، در حالیکه کاهش معنی دار ( $P < 0/05$ ) غلظت هموگلوبین در سایر گروه های تجربی نسبت به گروه شاهد به صورت وابسته به غلظت مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج حاصل از بررسی میزان هموگلوبین خون توسط معرف درابکین: با توجه به نتایج بدست آمده از میزان هموگلوبین عروق خونی، در نمونه های تجربی نانو ذرات نقره با غلظت  $50 \mu\text{g/ml}$  و اسکوپولتین با غلظت  $25 \mu\text{g/ml}$  کاهش در سطح معنی دار مشاهده نگردید

جدول ۲. میانگین غلظت هموگلوبین خون

p-Value	میانگین غلظت هموگلوبین ( $\mu\text{g/dl}$ )	گروه های تجربی ( $\mu\text{g/ml}$ )
—	$3/62 \pm 0/21$	کنترل
$P > 0/05$	$3/6 \pm 0/12$	اسکوپولتین (25)
$P < 0/01$	$3/55 \pm 0/32$	اسکوپولتین (50)
$P < 0/01$	$2/37 \pm 0/21$	اسکوپولتین (100)
$P > 0/05$	$2/65 \pm 0/19$	نانوذره نقره (50)
$P < 0/01$	$2/49 \pm 0/18$	نانوذره نقره (100)
$P < 0/001$	$2/36 \pm 0/61$	نانوذره نقره (150)
$P < 0/001$	$2/09 \pm 0/04$	هم افزایی (اسکوپولتین 25، نانوذره نقره 50)



نمودار ۱: میانگین تعداد و طول انشعابات عروق، CR، وزن جنین ها و غلظت هموگلوبین عروق خونی در گروه های شاهد و تجربی  
 $P < 0/05$ ،  $P < 0/01$  و  $P < 0/001$ \*\*\*

### بحث:

کلینیکی از آن ها اختلالاتی ایجاد نماید[۵]. به همین دلیل در بسیاری از مطالعات جهت بررسی خاصیت ضد سرطانی نانو ذرات نقره (AgNPs) از روش های سبز برای سنتز آنها استفاده گردیده است، که با اتصال برخی از ترکیبات موجود در عصاره گیاه در حین سنتز به سطح نانوذرات تولید شده می گردد و فعالیت های ذکر شده در مورد این نانو ذرات را اصلاح و بهبود خواهند داد[۱۴].

اثرات ضد سرطانی گیاه بومادران زرد در مطالعات متعدد مورد توجه و بررسی قرار گرفته است[۱۲]، لذا در مطالعه حاضر نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه دارویی بومادران زرد سنتز گردید. نتایج نشان داد که نانو ذرات نقره سنتز شده به روش سبز بصورت وابسته به غلظت

امروزه به علت نقش کلیدی رگزایی در رشد تومور ها، مهار کننده های رگ زایی توجهات زیادی را در تحقیقات تجربی به خود جلب نموده است، روند آنژیوژنز وابسته به تکثیر، اتصال، مهاجرت و بلوغ سلول های اندوتلیال است، بنابراین اکثر استراتژی های درمانی جهت تعدیل آنژیوژنز، بر مهار فعالیت سلولهای اندوتلیال متمرکز شده است[۱۱].

هدف این مطالعه بررسی پتانسیل ضد رگ زایی نانو ذرات نقره با پوشش عصاره بومادران زرد و اسکوپولتین به تنهایی و هم چنین در حالت کاربرد توام در پرده کوریوآلانتویک جنین جوجه بود. بر اساس مطالعات گذشته عنوان شده است که تولید نانو ذرات نقره با روش های شیمیایی منجر به رسوب برخی عوامل شیمیایی بر سطح نانو ذرات می گردد که می توانند در روند استفاده



منجر به مهار رگ زایی در مدل پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه می شود.

پژوهشگران اثرات ضد رگ‌زایی نانو ذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه مریم گلی (*Saliva officinalis*) را بر رگ زایی در پرده ی کوریو آلانتوئیک جنین جوجه بررسی و نتایج آنها نشان داده است که نانو ذرات نقره مذکور موجب کاهش تعداد و طول رگ ها و همچنین کاهش طول فرق سری-نشیمگاهی (CR) و وزن جنین ها نسبت به گروه شاهد می شود [۴]. همچنین در مطالعات دیگری نشان داده شده است، نانو ذرات نقره با بلوکه کردن سلول های اندوتلیال و با مهار فاکتور رشد اتدوتلیال عروقی (VEGF) اثرات ضد رگ‌زایی خود را اعمال می کنند [۹]. Dubey و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ عنوان نمودند که نانوذرات نقره با مهار فاکتور رشد اندوتلیال عروق موجب مهار رگ‌زایی میشوند [۶]. نتایج پژوهش حاضر، با مطالعات سایر پژوهشگران سازگاری دارد و به نظر می رسد نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز از عصاره گیاه بومادران زرد باعث کاهش رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه و مهار VEGF و FGF در سلول های اندوتلیال می شود.

ماده دیگری که اثرات ضد رگ زایی آن در این مطالعه بررسی گردید، ماده فنولی اسکوپولتین بود که در پژوهش حاضر اثرات مهاری وابسته به غلظت آن بر رگ‌زایی پرده کوریوآلانتوئیک جوجه اثبات گردید، اسکوپولتین با اثرات درمانی مختلف، یک ترکیب گیاهی مشتق شده از کومارین ها است که تا به امروز خواص ضد رگ زایی آن توسط محققین مورد ارزیابی قرار گرفته است. بر اساس نتایج پژوهشگران این ترکیب اثرات خود را از طریق مهار مهاجرت و تشکیل ساختارهای لوله مانند توسط سلول ها ی اندوتلیال اعمال می کند و در نهایت باعث آغار روند آپوپتوز در سلول های اندوتلیال می شود [۱۶]. مطابق نتایج Pan و همکارانش در سال ۲۰۰۹ اسکوپولتین بدون

اثر سیتوتوکسیک موجب مهار مهاجرت و تشکیل لوله در سلول های اندوتلیال می شود، و از طریق فسفوریلاسیون مسیر ERK1/2 و MAPK2 اثرات ضد رگ‌زایی خود را اعمال می کنند [۱۵]. همچنین بر اساس نتایج Pan و همکاران در سال ۲۰۱۱ اسکوپولتین از طریق مهار FGF و قطع فسفوریلاسیون گیرنده VEGF قادر به کاهش رگ‌زایی می باشد [۱۶]. در مطالعه Khuda-Bukhsh و همکارانش در سال ۲۰۱۰ با استفاده از رده سلولی A375 ملانوما، خواص ضد سرطانی اسکوپولتین مورد بررسی قرار گرفت، آن ها گزارش نمودند که اسکوپولتین باعث مهار سایکلین D1 و Stat3 و تنظیم فاکتور P53 و کاسپاز ۳ در جهت پیش برد فرایند مرگ برنامه ریزی شده می شود، در واقع نتایج این گروه نشان داد که اسکوپولتین با افزایش آپوپتوز و مهار چرخه سلولی منجر به مهار سلول های اندوتلیال می شود [۱۰]. نتایج مطالعات ذکر شده در ارتباط با ویژگی ضد رگ زایی اسکوپولتین با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همسو بود. به علاوه در این مطالعه با هدف افزایش اثر گذاری و هم چنین کاهش اثرات جانبی، غلظت های غیر سمی نانو ذرات نقره بصورت سینرژیک با اسکوپولتین برای مهار رگ زایی در مدل پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه استفاده گردید. نتایج نشان داد که درگروه هم افزایشی براساس شاخص تعداد، طول انشعابات عروق و غلظت هموگلوبین، بیشترین میزان مهار رگ‌زایی نسبت به گروه شاهد در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه رخ می دهد. لازم به ذکر است در گروه هم افزایشی (غلظت  $50\mu\text{g/ml}$  نانو ذره نقره و  $25\mu\text{g/ml}$  اسکوپولتین) بر اساس شاخص تعداد انشعابات عروق میزان مهار رگ‌زایی در مقایسه با گروه تجربی نانو ذره نقره در غلظت  $50\mu\text{g/ml}$  به تنهایی و اسکوپولتین با غلظت  $25\mu\text{g/ml}$  به تنهایی بیشتر بوده است. پس می توان نتیجه گرفت ترکیب این دو ماده مهار رگ‌زایی را به طور قابل توجهی نسبت به کاربرد هر ماده به تنهایی افزایش می دهد. از طرفی بر اساس یافته های پژوهش Asgar

پوشش داروی سیلیمارین منجر به افزایش اثرات مهارى ضد رگزایی آن بر پرده کوریو آلانتوئیک جنین جوجه گردیده است [۸]، که با نتایج مطالعه ی حاضر همسو می باشد. نتایج نشان داد که پتانسیل ضد رگزایی اسکوپولتین و نانو ذرات نقره در صورت استفاده هم زمان افزایش می یابد، لذا استفاده هم زمان این دو ترکیب با منشاء گیاهی می تواند کاندید مناسبی در مطالعات بیماری های وابسته به آنژیوژنز از جمله سرطان قرار گیرد.

### نتیجه گیری:

نتایج حاکی از آن بود، نانو ذرات نقره با اسکوپولتین در یک الگوی وابسته به غلظت باعث مهار رگزایی افزایش می یابد و نانو ذرات نقره در غلظت های پایین و غیر سمی به همراه اسکوپولتین اثرات ضد رگزایی بهتری دارند. لذا کاندیدای مناسبی جهت انجام مطالعات بیشتر در بیماری های وابسته به رگزایی نظیر سرطان می باشند.

وهمکارانش در سال ۲۰۱۵ که از روش هم افزایی ترکیب اسکوپولتین با داروی معروف شیمیایی سیس پلاتین استفاده کردند، هر ماده به تنهایی موجب مهار رشد سلول ها در فاز G1 و G0 شده است، اما در گروه هم افزایی درصد بالاتری از سلول ها دچار آپوپتوز شدند، بنابراین نتایج این گروه نشان داد که استفاده از اسکوپولتین موجب کاهش اثرات جانبی و دوز مورد استفاده از ترکیب شیمیایی سیس پلاتین می شود [۳]. در این مطالعه نیز به اثرات توأم اسکوپولتین به همراه یک ماده ی طبیعی دیگر پرداخته شد. بر اساس پژوهش های انجام شده قبلی نانو ذرات سنتز شده به روش زیستی، اثرات مهارى بیشتری نسبت به نانو ذرات تجاری بر روی رده ی سلول های سرطانی معده و فیبروبلاست ریه داشته است [۱۸]. در پژوهش حاضر نیز احتمالاً بخشی از اثرات مهارى نانو ذرات نقره به علت سنتز زیستی آنها می باشد. همچنین استفاده از نانو ذرات نقره سنتز شده به روش سبز با

منابع:

[3] Asgar A., Senawong G., Sripa B. & Senawong T., 2015. Scopoletin potentiates the anticancer effects of cisplatin against cholangiocarcinoma cell lines. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10(1):69–77.  
 [4] Baharara J., Namvar F., Mousavi M., Ramezani T. & Rosfarzin M. 2014, Anti-angiogenesis effect of biogenic silver nanoparticles synthesized using saliva officinalis on chick chorioalantoic membrane (CAM). *Molecules*, 19(9): 13498–13508.  
 [5] Castiglioni S., Cazzaniga A., Perrotta C. & Maier J. 2015. Silver Nanoparticles-induced Cytotoxicity Requires Erk Activation in Human Bladder Carcinoma

[1] Alenad A M., Al-Jaber N A., Krishnaswamy S., Yakout S M., Al-Daghri N M and Alokail . M S. 2013, Achillea fragrantissima extract exerts its anticancer effect via induction of differentiation, cell cycle arrest and apoptosis in chronic myeloid leukemia (CML) cell line K562. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(21): 1561-1567.  
 [2] Alikhanzadeh M., Tehranipour M., Khayyatzade J. 2014, Investigating the Neuroprotective Effect of Alcoholic Extracts of Achillea Biebersteinii Leave on  $\alpha$  Motoneurons after Sciatic Nerve Compression in Rats. *J Shahrekord Univ MedSci*; 22(4): 1323–1332. [In Persian]

- The Effect of Saffron aqua Extract on Angiogenesis in Chick Chorioalantoic Membrane. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(3): 55–58.
- [14] Palaniappan P., Sathishkumar G., Sankar R. 2015, Fabrication of nano-silver particles using *Cymodocea serrulata* and its cytotoxicity effect against human lung cancer A549 cells line. *Spectrochimica acta. Part A. Molecular and biomolecular spectroscopy*, 138(5): 885–890.
- [15] Pan R., Dai Y., Gao X-H., Lu D., Xia Y-F. 2011, Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by scopoletin through interrupting the autophosphorylation of VEGF receptor 2 and its downstream signaling pathways. *Vascular Pharmacology*, 24(7): 18–28.
- [16] Pan R., Dai Y., Yang J., Li Y., Yao Y., Xia X., Yao Y. 2009, Anti-angiogenic potential of scopoletin is associated with the inhibition of ERK1/2 activation. *Drug Development Research*, 70(3): 214–219.
- [17] Quesada A. R., Munoz-Chapuli R & Medina M A. 2006, Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials. *Medicinal research reviews*, 26(4): 483–530.
- [18] Rashmezzad M A., Ali Asgary E., Tafvizi F., Shandiz S., Ataollah, S., Mirzaie A. 2015, Comparative study on cytotoxicity effect of biological and commercial synthesized nanosilver on human gastric carcinoma and normal lung fibroblast cell lines. *Tehran Univ Med Journal*; 72(12): 799–807.
- [19] Vargas A., Zeisser-Labouèbe M., Lange N., Gurny R., Delie F. 2007, The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery Cells. *Toxicology Letters*, 732(3): 237–243.
- [6] Dubey Sh P., Lahtinen M., Sillanpaa M. 2010, Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. *Process Biochemistry*, 45(7): 1065–1071.
- [7] Folkman J. 2003, Fundamental concepts of the angiogenic process. *Current molecular medicine*, 3(7): 643–651.
- [8] Hajbabaei M, Baharara J, Iranbakhsh A, Ramezani T., 2017. Investigation Angiogenesis Effect of Silver Nanoparticles Coated with Silymarin on Chick Embryo Chorioalantoic Membrane and Evaluation of Its Antioxidant Activity. *Razi Journal of Medical Sciences*. 23 (152): 54-64.
- [9] Karimi Andeani J., Kazemi H., Mohsenzadeh S., Safavi A. 2011, Biosynthesis of gold nanoparticles using dried flowers extract of *Achillea wilhelmsii* plant. *Dig J Nanomater Bios*; 6(3): 1211–1217. [In Persian]
- [10] Khuda-Bukhsh A R., Bhahacharyya S S., Paul Saili & Boujedaini N. 2010, Polymetric nanoparticle encapsulation of a naturally occurring plant scopoletin and its effects on human melanoma cell A375. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 8(9): 853-562.
- [11] Litwin, C., Leong K., GZapf, R., Sutherland, H., Naiman, Sh., CKarsan, A. 2002, Role of the microenvironment in promoting angiogenesis in acute myeloid leukemia. *American journal of hematology*, 70(1): 22–30.
- [12] Mohammadi-Motlagh, H.-R., Mansouri, K. & Mostafaie, A. 2010. Plants as useful agents for angiogenesis and tumor growth prevention. *Physiology and Pharmacology*, 14(3): 302–317.
- [13] Mousavi M., Baharara J., Zafar-balanezhad S., Shaheokh-abadi K. 2014,

review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 3(2): 109–138.

systems. *Advanced drug delivery reviews*, 59(11): 1162–1176.

[20] Wijnhoven, SW P., Peijnenburg W J., Herberts C A., Hagens W I., Oomen A G., Heugens, E.H.W. 2009, Nano-silver-a