



## 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 بهارآرا<sup>۲\*</sup>، علیرضا ایرانبخش<sup>۳</sup>، طیبه رضانی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاداسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.  
<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری گروه زیست شناسی دانشگاه آزاداسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.  
<sup>۳</sup> گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، تهران، ایران.  
<sup>۴</sup> گروه زیست شناسی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

\* E.mail: baharara@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۲۸

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱

### چکیده

امروزه خواص ضد رگزایی فرآورده‌های 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 رگزایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه بررسی گردید. در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی تخم مرغ‌های نطفه دار به گروه شاهد و گروه‌های تجربی شامل نمونه‌های تیمار شده با نانو ذرات نقره (۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰  $\mu\text{g/ml}$ )، اسکوپولتین (۲۵، ۵۰  $\mu\text{g/ml}$ )، 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-نشیمگاهی، وزن جنین‌ها و سطح هموگلوبین عروق خونی ثبت و با شاهد مقایسه گردید. داده‌ها توسط نرم افزار SPSS-16، آزمون‌های واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey در سطح معنی داری  $P>0/05$  تجزیه و تحلیل گردید. یافته‌ها نشان داد نانو ذرات نقره و اسکوپولتین، وابسته به دوز منجر به کاهش تعداد و طول عروق خونی و سطح غلظت هموگلوبین خون در نمونه‌های تیماری می شود. بکارگیری توام غلظت‌های 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 راه‌های درمانی موثر مورد توجه قرار گیرد.

**کلیدواژه‌ها:** آنژیوژنز، اسکوپولتین، پرده کوریوآلانتوئیک، نانو ذره نقره.

### مقدمه

و شرایط پاتولوژیک مانند رشد تومور و متاستاز امری حیاتی محسوب می‌شود [۱۷]. در آنژیوژنز نرمال تعادل بین فاکتورهای القا کننده و مهار کننده وجود

آنژیوژنز، به معنی تشکیل عروق جدید از رگ‌های قبلی است که در شرایط فیزیولوژیک مانند تولید مثل

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 مطالعه‌ی Alenad و همکاران بر روی خواص ضد سرطانی عصاره گیاه بومادران بر روی لاین سلولی K562 نشان دهنده‌ی پتانسیل درمانی این گیاه از طریق القاء تمایز، مهار چرخه‌ی سلولی و آپوپتوز در سلول‌های سرطانی بوده است [۱] و در این مطالعه از عصاره‌ی گیاه بومادران زرد جهت تولید و پوشش‌دهی نانو ذرات نقره استفاده شد. همچنین مطالعات زیادی بر روی اثر ترکیبات فنولیک بر پیشگیری و درمان سرطان‌ها انجام شده است، از جمله کومارین‌ها که امروزه با استفاده از مشتقات آنها، سمیت سلولی را کاهش و اثر درمانی آن را افزایش داده‌اند، یکی از این مشتقات ماده‌ای به نام اسکوپولتین است که با مهار سلول‌های اندوتلیال از طریق مهار مسیرهای ERK1/2 و فسفوریلاسیون پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن که در رگزایی نقش محوری ایفا می‌کنند، موجب مهار مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و تشکیل لوله می‌شود، در نتیجه انتظار می‌رود این ماده به عنوان مهار کننده‌ی خاص آنژیوژنز کاندایدی مناسبی برای درمان بیماری‌های مرتبط با رگزایی از جمله سرطان باشد [۱۵]. از این رو در تحقیق حاضر از دو ماده‌ی نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز با پوشش عصاره گیاه بومادران زرد و اسکوپولتین با منشأ گیاهی، با هدف اثر بخشی بیشتر و کاهش عوارض جانبی، با در نظر داشتن کمترین غلظت مورد استفاده،

دارد که در صورت برهم خوردن این تعادل، شرایط برای بروز برخی بیماری‌ها نظیر رتینوپاتی دیابتی، آرتریت روماتوئید، انواع سرطان‌ها و تومورها به وجود می‌آید [۷]. امروزه افزایش مقاومت به درمان‌های رایج در سرطان‌ها مسئله‌ساز شده است، به طوریکه مقاومت سلول‌های 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 می‌باشد [۱۳]. مهار رگ زایی در تومور می‌تواند روش مناسبی برای غلبه بر مقاومت دارویی در انواع سرطان‌ها 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 می‌شود، نقره در ابعاد نانو دسترسی بیشتری به بافت‌ها، سلول‌ها و مولکول‌های 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 روش‌های 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 درمان‌های انسانی شده است [۱۸]. در پژوهش‌های انجام شده اثرات ضد توموری نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی در برابر برخی از داروهای شیمیایی به اثبات رسیده است [۱۸]. در سال‌های اخیر سنتز نانو ذرات نقره به روش زیستی توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است و تا به حال با بهره‌گیری از گیاهان دارویی متنوعی از

میلی مولار دور از نور مخلوط شدند، تغییر رنگ محلول از زرد کم رنگ به قهوه‌ای نشان دهنده آغاز سنتز نانو ذرات نقره می‌باشد.

#### اندازه‌گیری نانو ذرات نقره:

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

#### مطالعات طیف‌سنجی مادون قرمز FT-IR (Fourier transform infrared)

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 رگ‌زایی 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 غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، و ۱۵۰) و سه گروه تجربی اسکوپولتین (با غلظت‌های ۲۵،

به اثرات توام این دو ماده بر آنژیوژنز در پرده ی کوریوآلانتوئیک جنین جوجه پرداخته شده است.

#### مواد و روش‌ها:

این پژوهش تجربی آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در سال ۱۳۹۵ انجام شد، از تخم مرغهای نطفه‌دار نژاد Ross به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده گردید. تخم مرغ‌های نطفه‌دار 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 روش‌های بررسی طیف نوری در محدوده نور فرابنفش-نور مرئی، اندازه نانو ذرات، عکس برداری با میکروسکوپ الکترونی گذاره و طیف‌سنجی مادون قرمز شناسایی انجام شد.

#### مواد و روش‌ها:

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

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 استفاده‌های بعدی نگهداری شد. جهت سنتز نانو ذرات نقره ۱۰۰۰ میکرو لیتر از عصاره مذکور با ۱۰۰ میلی لیتر نیترات نقره ۵

اندازه‌گیری محتوی هموگلوبین نمونه‌ها با روش درابکین:

در روز دوازدهم انکوباسیون پس از عکسبرداری از نمونه‌ها، پرده کوریوآلانتوئیک نمونه‌ها جدا و به یک پلیت انتقال داده شد، سپس توسط قیچی تمام عروق پاره شدند، پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه توسط دستگاه هموژنایزر همگن سازی 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 رابه پلیت ۹۶ خانه انتقال دادیم و میزان جذب نوری آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (EPOCH, US) در طول موج ۵۴۶ نانومتر قرائت گردید [۱۱]. عدد بدست آمده برای محاسبه ی غلظت هموگلوبین در عدد ثابت ۳۶/۸ ضرب شد، چرا که سطح غلظت هموگلوبین با عروق تشکیل شده رابطه‌ای مستقیم داشته و به عنوان معیاری جهت سنجش تراکم عروق استفاده می شود.

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

#### بررسی‌های آماری:

داده‌های کمی توسط نرم افزار SPSS-۱۶، آزمون‌های واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey در سطح معنی داری  $P < 0/05$  تحلیل گردید و نمودارها توسط Excel رسم گردید.

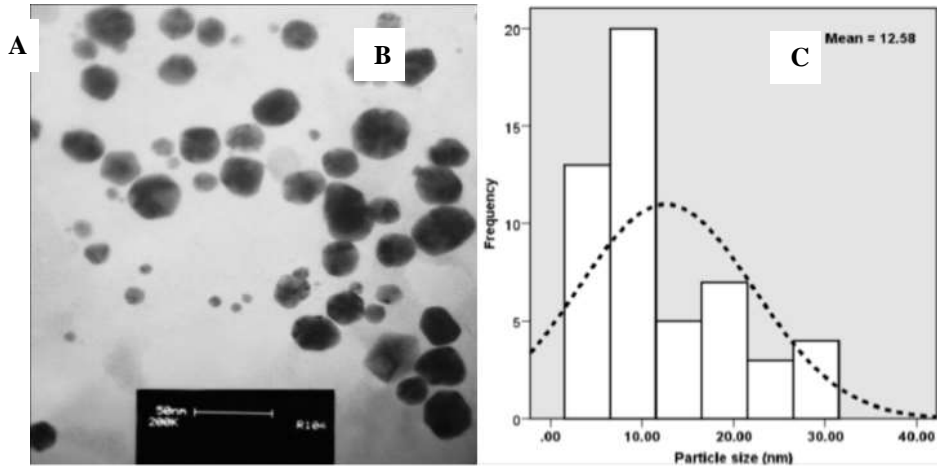
#### نتایج:

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

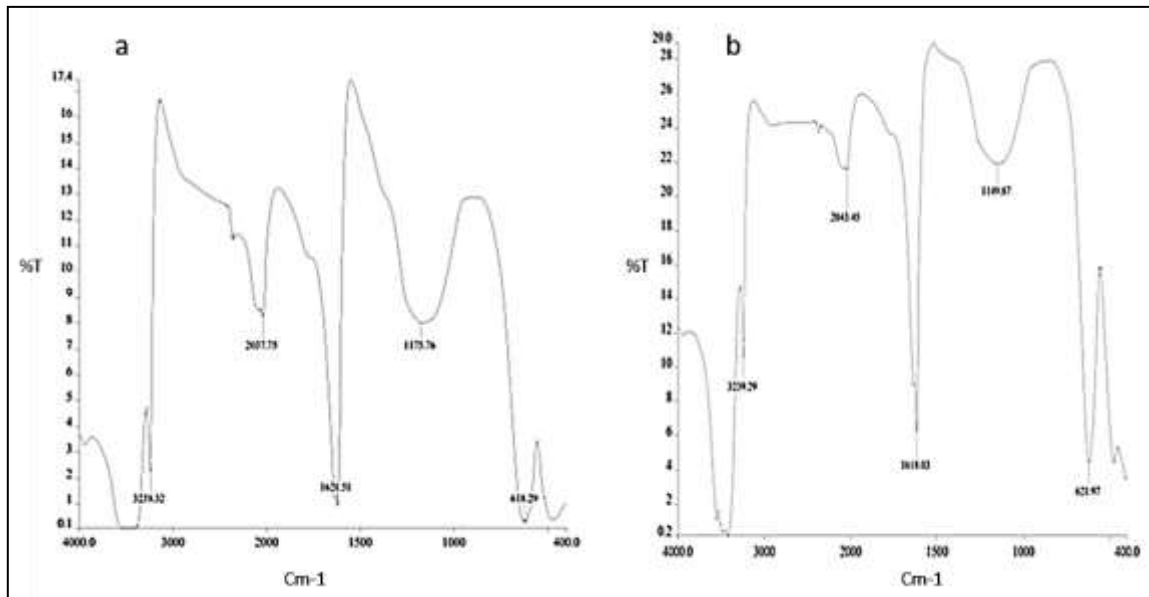
۵۰ و ۱۰۰) و یک گروه تجربی هم افزایی (تیمار با غلظت ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  نانوذرات نقره و ۲۵  $\mu\text{g/ml}$  اسکوپولتین) تقسیم شدند، تخم مرغ‌های نطفه دار در دستگاه جوجه کشی (Cocks, netherland) دردمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد قرار گرفتند، در روز دوم انکوباسیون در شرایط کاملا استریل ایجاد 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) پنجره‌ای در یک طرف تخم مرغها ایجاد گردید، و 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 نمونه‌ها قرار داده شد و تیمار نمونه‌ها بر روی این اسفنج‌ها با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ از نانو ذرات نقره و غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ از اسکوپولتین و در گروه هم افزایی غلظت ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  از نانو ذرات نقره و ۲۵  $\mu\text{g/ml}$  از اسکوپولتین انجام شد، سپس محل پنجره‌ها مجددا پوشانده شد و نمونه‌ها به انکوباتور برگردانده شدند، در روز دوازدهم انکوباسیون از تمام نمونه‌های شاهد و تیمار با غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره توسط فتواسترئومیکروسکوپ تحقیقاتی (Ziess, Germany) در محدوده ی اسفنج ژلاتینی عکسبرداری شد، تعداد و طول عروق با نرم‌افزار Image J ثبت گردید، همچنین وزن و طول فرق سری تا نشیمنگاهی جنین‌ها به ترتیب با ترازوی دیجیتال (Sartorius, Germany) و کولیس (AACO, China) اندازه گیری شدند [۱۳].

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).

نتایج حاصل از بررسی اندازه نانو ذرات نقره نشان داد که متوسط اندازه این نانو ذرات ۱۲ نانومتر است و دامنه پراکنش نانو ذرات بین ۱ تا ۳۰ نانومتر قرار داشت (شکل ۱). هم چنین نتایج حاصل از طیف سنجی مادون قرمز نشان داد که نمودارهای حاصل از



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



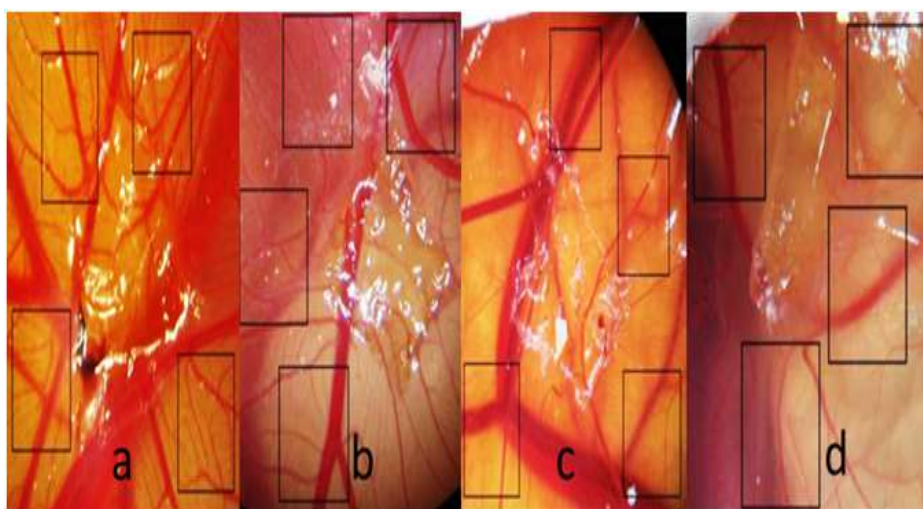
شکل ۲: نمودار حاصل از طیف سنجی مادون قرمز، در این تصویر نمودار a نشان دهنده طیف عصاره گیاه بومادران می باشد در حالی که نمودار b طیف حاصل از نانوذرات نقره با پوشش عصاره گیاه بومادران را نشان می دهد، شباهت دو طیف تایید پوشش سطحی نانو ذرات از جنس عصاره گیاهی می باشد.

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

با توجه به نتایج حاصل از بررسی تعداد و طول انشعابات عروق، غلظت‌های ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذرات نقره و ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر از اسکوپولتین جهت هم‌افزایی استفاده گردید (نمودار ۱، شکل ۳، جدول ۱).

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

نتایج حاصل از بررسی تعداد و طول عروق در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه در گروه‌های تیمار با نانوذرات نقره، نشان داد که غلظت‌های بیشتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به کاهش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) تعداد و طول عروق شده است و همچنین در نمونه‌های تیمار با اسکوپولتین نشان داد که



شکل ۳: تصویر استرئو میکروسکوپی از پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه در نمونه‌های تیمار با نانوذرات نقره و اسکوپولتین: a: نمونه شاهد: b, c, d به ترتیب گروه‌های تجربی تیمار با نانوذرات نقره (۵۰، ۲۵، ۱۰۰ µg/ml)، اسکوپولتین (۲۵ µg/ml) و هم‌افزایی (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)	گروه‌های تجربی (µg/ml)
—	۸/۴۵±۱/۱۸	—	۱۰/۲۳±۰/۵۳	کنترل
$P > 0/05$	۳/۸۳±۰/۰۸	$P > 0/05$	۹/۵۸±۰/۲۵	اسکوپولتین (۲۵)
$P < 0/05$	۳/۷۷±۰/۰۸	$P < 0/01$	۷/۴۹±۰/۲۵	اسکوپولتین (۵۰)
$P < 0/01$	۲/۷۵±۰/۱۷	$P < 0/001$	۵/۷۸±۰/۲۹	اسکوپولتین (۱۰۰)
$P > 0/05$	۵/۸۳±۰/۱۱	$P > 0/05$	۹/۵۴±۰/۲۰	نانوذره نقره (۵۰)
$P < 0/05$	۴/۳۳±۰/۰۵	$P < 0/01$	۷/۳۵±۰/۱۳	نانوذره نقره (۱۰۰)
$P < 0/01$	۳/۶۶±۰/۲۶	$P < 0/001$	۶/۵۵±۰/۲۲	نانوذره نقره (۱۵۰)
$P < 0/01$	۳/۳۷±۰/۱۱	$P < 0/001$	۵/۴۱±۰/۱۸	هم‌افزایی (اسکوپولتین ۲۵، نانوذره نقره ۵۰)

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

#### بحث:

امروزه به علت نقش کلیدی رگ‌زایی در رشد تومورها، مهار کننده‌های رگ‌زایی توجهات زیادی را در تحقیقات تجربی به خود جلب نموده است، روند آنژیوژنز وابسته به تکثیر، اتصال، مهاجرت و بلوغ سلول‌های اندوتلیال است، بنابراین اکثر استراتژی‌های درمانی جهت تعدیل آنژیوژنز، بر مهار فعالیت سلول‌های اندوتلیال متمرکز شده است [۱۱]. هدف این مطالعه بررسی پتانسیل ضد رگ‌زایی نانو ذرات نقره با پوشش عصاره بومادران زرد و اسکوپولتین به تنهایی و هم چنین در حالت کاربرد توام در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه بود. بر اساس مطالعات گذشته عنوان شده است که تولید نانو ذرات نقره با روش‌های شیمیایی منجر به رسوب برخی عوامل شیمیایی بر سطح نانو ذرات می‌گردد که می‌تواند در روند استفاده کلینیکی از آنها اختلالاتی ایجاد

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

در بررسی میانگین طول فرق سری - نشیمنگاهی جنین‌ها برای گروه‌های نانو ذرات نقره با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و اسکوپولتین با غلظت ۲۵  $\mu\text{g/ml}$ ، کاهش در سطح معنی‌دار مشاهده نگردید ( $P > 0/05$ ). بقیه‌ی گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) بوده است.

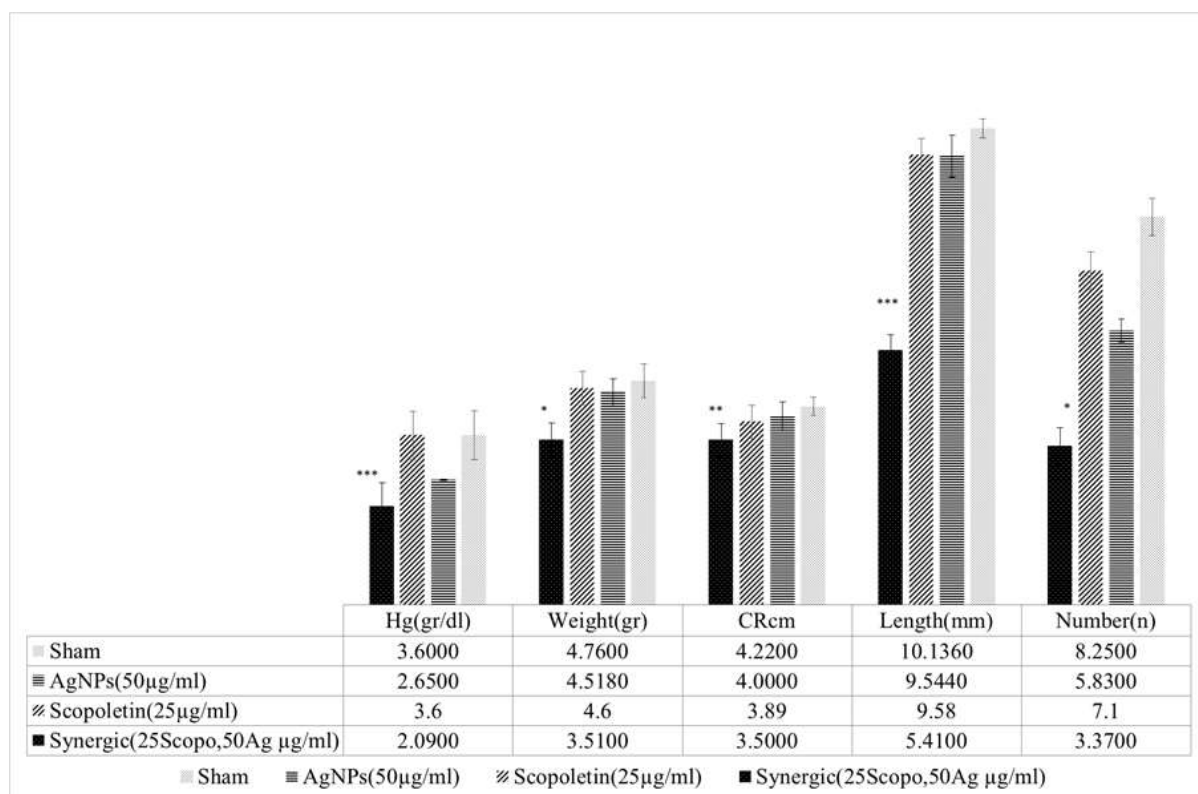
همچنین در بررسی وزن جنین‌ها در نمونه تجربی اسکوپولتین با غلظت ۵۰  $\mu\text{g/ml}$ ، کاهش در سطح معنی‌دار مشاهده نگردید ( $P > 0/05$ )، سایر گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) بوده است.

#### نتایج حاصل از بررسی میزان هموگلوبین خون توسط معرف درابکین:

با توجه به نتایج بدست آمده از میزان هموگلوبین عروق خونی، در نمونه‌های تجربی نانو ذرات نقره با غلظت ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  و اسکوپولتین با غلظت ۲۵  $\mu\text{g/ml}$  کاهش در سطح معنی‌دار مشاهده نگردید ( $P > 0/05$ ).

جدول ۲. میانگین غلظت هموگلوبین خون

p-Value	میانگین غلظت هموگلوبین ( $\mu\text{g/dl}$ )	گروه‌های تجربی ( $\mu\text{g/ml}$ )
-	$3/62 \pm 0/21$	کنترل
$P > 0/05$	$3/6 \pm 0/12$	اسکوپولتین (۲۵)
$P < 0/01$	$3/55 \pm 0/32$	اسکوپولتین (۵۰)
$P < 0/01$	$2/37 \pm 0/21$	اسکوپولتین (۱۰۰)
$P > 0/05$	$2/65 \pm 0/19$	نانوذره نقره (۵۰)
$P < 0/01$	$2/49 \pm 0/18$	نانوذره نقره (۱۰۰)
$P < 0/001$	$2/36 \pm 0/61$	نانوذره نقره (۱۵۰)
$P < 0/001$	$2/09 \pm 0/04$	هم افزایی (اسکوپولتین ۲۵، نانوذره نقره ۵۰)



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  $P < 0/001$  \*\*\*

پژوهشگران اثرات ضد رگزایی نانو ذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه مریم گلی ( *Saliva officinalis* ) را بر رگزایی در پردهی کوریو آلانتوئیک جنین جوجه بررسی و نتایج آنها نشان داده است که نانو ذرات نقره مذکور موجب کاهش تعداد و طول رگها و همچنین کاهش طول فرق سری-نشیمنگاهی (CR) و وزن جنینها نسبت به گروه شاهد می شود [۱۱]. همچنین در مطالعات دیگری نشان داده شده است، نانو ذرات نقره با بلوکه کردن سلولهای اندوتلیال و با مهار فاکتور رشد اتدوتلیال عروقی (VEGF) اثرات ضد رگزایی خود را اعمال می کنند [۱۵]. Dubey و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ عنوان نمودند که نانوذرات نقره با مهار فاکتور رشد اندوتلیال عروق موجب مهار رگزایی می شوند [۱۶]. نتایج

نماید [۱۳]. 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 [۱۴]، 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 منجر به مهار رگزایی در مدل پرده کوریو آلانتوئیک جنین جوجه می شود.



نشان داد که اسکوپولتین با افزایش آپوپتوز و مهار چرخه سلولی منجر به مهار سلول‌های اندوتلیال می‌شود [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 اثرگذاری و هم چنین کاهش اثرات جانبی، غلظت‌های 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 در گروه هم افزایی براساس شاخص تعداد، طول انشعابات عروق و غلظت هموگلوبین، بیشترین میزان مهار رگ‌زایی نسبت به گروه شاهد در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه رخ می‌دهد. لازم به ذکر است در گروه هم افزایی (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 می‌توان نتیجه گرفت ترکیب این دو ماده مهار رگ‌زایی را به طور قابل توجهی نسبت به کاربرد هر ماده به تنهایی افزایش می‌دهد. از طرفی بر اساس یافته‌های پژوهش Asgar و همکارانش در سال ۲۰۱۵ که از روش هم‌افزایی ترکیب اسکوپولتین با داروی معروف شیمیایی سیس پلاتین استفاده کردند، هر ماده به تنهایی موجب مهار رشد سلول‌ها در فاز G1 و G0 شده است، اما در گروه هم‌افزایی درصد بالاتری از سلول‌ها 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 می‌شود [۳]. در این مطالعه نیز به اثرات توأم اسکوپولتین به همراه یک ماده ی طبیعی

پژوهش حاضر، با مطالعات سایر پژوهشگران سازگاری دارد و به نظر می‌رسد نانو ذرات 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 سلول‌های اندوتلیال می‌شود. ماده دیگری که اثرات ضد رگ‌زایی 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 کومارین‌ها است که تا به امروز خواص ضد رگ‌زایی 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 سلول‌های اندوتلیال اعمال می‌کند و در نهایت باعث آغار روند آپوپتوز در سلول‌های اندوتلیال می‌شود [۱۶]. مطابق نتایج Pan و همکارانش در سال ۲۰۰۹ اسکوپولتین بدون اثر سیتوتوکسیک موجب مهار مهاجرت و تشکیل لوله در سلول‌های اندوتلیال می‌شود، و از طریق فسفوریلاسیون مسیر ERK1/2 و MAPK2 اثرات ضد رگ‌زایی خود را اعمال می‌کنند [۱۰]. همچنین بر اساس نتایج Pan و همکاران در سال ۲۰۱۱ اسکوپولتین از طریق مهار FGF و قطع فسفوریلاسیون گیرنده VEGF قادر به کاهش رگ‌زایی می‌باشد [۱۷]. در مطالعه Khuda-Bukhsh و همکارانش در سال ۲۰۱۰ با استفاده از رده سلولی A375 ملانوما، خواص ضد سرطانی اسکوپولتین مورد بررسی قرار گرفت، آن‌ها گزارش نمودند که اسکوپولتین باعث مهار سایکلین D1 و Stat3 و تنظیم فاکتور P53 و کاسپاز ۳ در جهت پیش برد فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده می‌شود، در واقع نتایج این گروه

- myeloid leukemia (CML) cell line K562. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(21): 1561-1567.
- [2]. Alikhanzadeh M., Tehranipour M., Khayyatizade 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]
- [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 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 Sali & Boujedaini N. 2010, Polymetric nanoparticle encapsulation of a naturally occurring plant scopoletin and its

دیگر پرداخته شد. بر اساس پژوهش‌های انجام شده قبلی نانو ذرات سنتز شده به روش زیستی، اثرات مهاری بیشتری نسبت به نانو ذرات تجاری بر روی رده‌ی سلول‌های سرطانی معده و فیروپلاست ریه داشته است [۱۸]. در پژوهش حاضر نیز احتمالاً بخشی از اثرات مهاری نانو ذرات نقره به علت سنتز زیستی آنها می‌باشد. همچنین استفاده از نانو ذرات نقره سنتز شده به روش سبز با پوشش داروی سیلیمارین منجر به افزایش اثرات مهاری ضد رگزایی آن بر پرده کوریو آلاتوئیک جنین جوجه گردیده است [۸]، که با نتایج مطالعه‌ی حاضر همسو می‌باشد. نتایج نشان داد که پتانسیل ضد رگزایی اسکوپولتین و نانو ذرات نقره در صورت استفاده هم زمان افزایش می‌یابد، لذا استفاده هم زمان این دو ترکیب با منشاء گیاهی می‌تواند کاندید مناسبی در مطالعات بیماری‌های وابسته به آنژیوژنز از جمله سرطان قرار گیرد.

### نتیجه‌گیری:

نتایج حاکی از آن بود، نانو ذرات نقره با اسکوپولتین در یک الگوی وابسته به غلظت باعث مهار رگزایی افزایش می‌یابد و نانو ذرات نقره در غلظت‌های پایین و غیرسمی به همراه اسکوپولتین اثرات ضد رگزایی بهتری دارند. لذا کاندیدای مناسبی جهت انجام مطالعات بیشتر در بیماری‌های وابسته به رگزایی نظیر سرطان می‌باشند.

### منابع

- [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

- effects on human elanoma 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, The Effect of Saffron aqua Extract on Angiogenesis in Chick Chorioalantoic Membrane. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(3): 55-58.
- [14]. [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., X. Xia., 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 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 review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 3(2): 109-138.