

## **Evaluation of Anti-angiogenic Activity of Silver Nanoparticle Synthesis by *Rubina tinctorum* L (Ru-AgNPs) Using Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay**

Sara Ghandehari<sup>1</sup>, Masoud Homayouni Tabrizi<sup>2\*</sup>, Pouran Ardalan<sup>3</sup>

1. MSc Student, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

2. Assistant Professor in Biochemistry, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

3. Assistant Professor in Physical Chemistry, Department of Chemistry, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Received: 17 Dec 2017, Accepted: 26 Feb 2018

### **Abstract**

**Background:** Angiogenesis occurs in physiologic (wound healing) and pathological conditions and plays an important role in tumor growth, progression and metastasis. Therefore, the inhibition of angiogenesis can be an important approach to treat cancer diseases. In recent years, the use of nanoparticles has been developed to control cancer cells and prevent tumor growth. Various studies have shown the role of nanoparticles in reducing angiogenesis and inhibition of cancer cells. So, in this study, the anti-angiogenic effect of silver nanoparticle synthesis by *Rubina tinctorum* L (Ru-AgNPs) on Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM) was investigated.

**Materials and Methods:** In an experimental study, 60 eggs were randomly divided into 6 groups including control, laboratory control and 4 treatment groups (10 eggs/group). On the second day of incubation, a window was created on the eggs. On the 8th day, the chorioallantoic membrane of samples was treated with different concentrations of nanoparticles and on the 12th day, the image was taken from all samples. Finally, the number and length of vessels on the chorioallantoic membrane and following that weight and length of the embryo from crown to squattiest were measured. Quantitative data were analyzed using LSD-test.

**Results:** The results showed that the Ru-AgNPs significantly reduced the length and number of blood vessels in the treated groups compared to the control group. Also, the comparison of length and weight of embryos in treated samples with control group showed that the Ru-AgNPs had an inhibitory effect on the length of the embryos, but the weight did not differ significantly in the treatment with the control group.

**Conclusion:** Considering the inhibitory effect of the Ru-AgNPs on the angiogenesis of the chorioallantoic membrane, with further studies, this compound can be used to control and inhibit pathological angiogenesis in many diseases such as cancers.

**Keywords:** Angiogenic, Chicken chorioallantoic membrane, *Rubia tinctorum*, Silver nanoparticles

\*Corresponding Author:

Address: Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Email: mhomayouni6@gmail.com

## ارزیابی فعالیت ضد رگ زایی نانوذرات نقره سنتز شده از گیاه روناس با استفاده از آزمون غشای کوریوالانتوییک جوجه (CAM)

سارا قندهاری<sup>۱</sup>، مسعود همایونی تبریزی<sup>۲\*</sup>، پوران اردلان<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۲. استادیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۳. استادیار شیمی فیزیک، گروه شیمی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۲۶، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** آنژیوژنز هم در شرایط فیزیولوژیک (بهبود زخم، رشد جنین و غیره) و هم پاتولوژیک (بیماری هایی از جمله سرطانی) رخ می دهد و نقش کلیدی در رشد تومور، تهاجم و متاستاز سرطان ایفا می کند. بنابراین مهار آنژیوژنز می تواند یک رویکرد مهم درمانی در بیماری های سرطانی باشد. در سال های اخیر، استفاده از نانوذرات برای کنترل سلول های سرطانی و جلوگیری از رشد تومور بسیار مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات مختلف نقش نانوذرات را در کاهش آنژیوژنز و مهار سلول های سرطانی به خوبی نشان می دهد. بنابراین، در این مطالعه اثر ضد رگ زایی نانو ذره نقره سنتز شده از گیاه *Rubina tinctorum L* (Ru-AgNPs) بر روی پرده کوریوالانتوییک جوجه (CAM) مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش ها:** در یک مطالعه تجربی، ۶۰ عدد تخم مرغ به طور تصادفی به ۶ گروه شامل کنترل، کنترل آزمایشگاهی و ۴ گروه درمان تقسیم شدند. در روز دوم انکوباسیون یک پنجره روی تخم ها ایجاد شد. در روز هشتم، غشای کوریوالانتوییک نمونه ها با غلظت های مختلف نانوذرات تحت درمان قرار گرفت و در روز دوازدهم، تصویر برداری از نمونه ها انجام گرفت و تعداد و طول عروق در غشای کوریوالانتوییک اندازه گیری شد. در نهایت وزن و طول جنین از ناحیه فرق سر تا نشیمنگاه اندازه گیری شد و داده های کمی با استفاده از آزمون LSD مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

**یافته ها:** نتایج نشان داد که نانوذره به طور معنی داری طول و تعداد رگ های خونی را در گروه های تیمار شده نسبت به گروه کنترل کاهش می دهد. هم چنین بررسی طول و وزن جنین های تیمار شده با گروه شاهد نشان داد که نانوذره اثر کاهشی بر قد جنین ها داشته، اما وزن جنین ها در گروه تیمار با گروه کنترل تفاوت چندانی را نشان نداد.

**نتیجه گیری:** با توجه به اثرات کاهش نانوذره بر رگ زایی پرده کوریوالانتوییک می توان با بررسی های بیشتر از این ترکیب در جهت کاهش و مهار رگ زایی پاتولوژیک در بسیاری بیماری ها از جمله سرطان استفاده نمود.

**واژگان کلیدی:** نانوذره نقره، گیاه روناس، رگ زایی، غشای کوریوالانتوییک جوجه

\*نویسنده مسئول: ایران، مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی

Email: mhomayouni6@gmail.com

## مقدمه

سرطان یکی از کشنده ترین بیماری‌ها به شمار می‌آید که هر ساله در جهان باعث مرگ و میر بسیاری می‌شود (۱). در شرایط طبیعی سلول‌های بدن با سرعتی خاص تکثیر و سپس دچار مرگ سلولی می‌شوند. تعادل در ایجاد و حذف سلول‌ها برای سلامت بافت و در نهایت موجود زنده ضروری می‌باشد. برهم خوردن تعادل سبب بروز بسیاری بیماری‌ها می‌شود. سرطان بر اثر افزایش تکثیر سلولی و کاهش مرگ سلولی اتفاق می‌افتد و به دنبال آن تشکیل رگ‌های جدید و خون‌رسانی و غذا رسانی به سلول‌های تشکیل شده منجر به پیشرفت سرطان و در نهایت متاستاز و مرگ می‌گردد (۲).

آنژیوژنز به معنی تشکیل رگ‌های جدید از رگ‌های قدیمی است که هم در شرایط فیزیولوژیک (برای بهبود زخم و رشد بافت‌ها) و هم پاتولوژیک (در بیماری‌هایی از جمله سرطان و متاستاز، آرتریت روماتوئید، پسوریازیس و غیره) رخ می‌دهد (۳). از آن جا که رشد تومور و متاستاز سیستمیک بسیار وابسته به آنژیوژنز است (۴)، بنابراین مهار رگ‌زایی، هدف اولیه به منظور مهار رشد تومورهای جامد به شمار می‌آید (۵).

عوامل فعال کننده (فاکتورهای رشد اندوتلیال عروق خونی و فاکتورهای رشد فیبروبلاست) و مهارکننده (فاکتور رشد تبدیل شونده (TGF) و اندوستاتین) بسیاری برای کنترل روند آنژیوژنز شناخته شده اند (۶) (۷) و بررسی‌ها نشان می‌دهد که تعادل فعال کننده‌ها و مهارکننده‌ها باعث رشد عروق خون در شرایط طبیعی می‌شود (۸). بنابراین، می‌توان حدس زد که اختلال در این تعادل برای حفظ پیشرفت تومور مورد نیاز است. برای جلوگیری از مراحل مختلف آنژیوژنز در فرآیندهای رشد تومور، چندین عامل ضد آنژیوژنز شناسایی شده است که این عوامل اغلب در شیمی درمانی ترکیبی موثر هستند و روشی جذاب برای درمان برخی بیماری‌های سرطانی را ایجاد نموده اند (۹).

چنین درمان‌هایی سودمندتر بوده و اثرات جانبی کمتری نسبت به شیمی درمانی و داروهای شیمیایی دارند و هدف آن‌ها، تخریب و جلوگیری از تشکیل عروق خونی و به دنبال آن جلوگیری از پیشرفت سرطان می‌باشد (۱۰).

بنابراین شناسایی استراتژی‌های درمانی جهت کاهش رگ‌زایی و سنتز داروهای جدید برای اهداف درمانی در حال انجام است و محصولات طبیعی هنوز هم منبع مهمی جهت توسعه داروها به شمار می‌آیند. استفاده از داروهای گیاهی به عنوان ترکیبی درمانی توسط محققین مختلف برای مهار آنژیوژنز در بیماران مبتلا به تومورهای جامد پیشنهاد شده است. استفاده از نانوذرات سنتز شده از روش سبز با استفاده از گیاهان می‌تواند رویکردی جدید با کمترین اثرات جانبی در درمان بسیاری از بیماری‌ها به شمار آید (۱۱). نانو تکنولوژی می‌تواند فرصت‌هایی را برای طراحی و توسعه روش‌ها و تجهیزاتی به منظور رسیدن به هدف، تشخیص و درمان بیماری‌هایی از جمله سرطان فراهم کند. بنابراین مطالعه اثرات نانوذرات بر فرآیندهایی مانند آپوپتوز و آنژیوژنز امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۱). استفاده از مدل‌های حیوانی، یک ابزار مهم برای غربال‌گری عوامل فعال کننده یا مهار کننده آنژیوژنز به شمار می‌آید (۱۲). تخم مرغ‌های جنین دار در مراحل ابتدایی رشد و نمو بستر مناسبی را هم جهت بررسی آنژیوژنز در شرایط آزمایشگاهی فراهم نموده و هم امکان مطالعه رگ‌زایی در شرایط رشد تومور را میسر می‌سازد. غشای کوریوالانتوییک جوجه (CAM) یک بافت تنفسی نازک برای جنین جوجه در حال رشد است که از یک شبکه متراکم و بسیار سازمان یافته از رگ‌های خونی تشکیل شده است. پاسخ‌های فیزیولوژیکی پرده کوریوالانتوییک را می‌توان به پاسخ‌های ایجاد شده از بافت‌های پستانداران در برابر تیمارهای مشابه تعمیم داد. با توجه به این که غشاء کوریوالانتوییک (CAM) از رشد تومور انسانی پیروی می‌کند (۱۱)، از این رو، این تست برای مطالعه آنژیوژنز به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. این روش برای

تخم مرغ های هر گروه تلقیح گردید. پس از تیمار، مجدداً پنجره ها بسته شده و تخم مرغ ها به انکوباتور منتقل شدند. در روز دوازدهم، تخم مرغ ها جهت بررسی تغییرات رگ زایی مورد بررسی قرار گرفتند. به این ترتیب که پنجره ها برداشته شد و میزان رگ زایی با استفاده از تصویر برداری از ناحیه اسفنج حاوی ماده تیمار شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### آنالیز و بررسی فاکتورهای کمی

برای اندازه گیری طول و تعداد عروق خونی، ابتدا نمونه ها در زیر استریومیکروسکوپ قرار گرفت و سپس تصاویری از ناحیه تیمار شده گرفته شد و سپس تصاویر توسط نرم افزار Image J به منظور شمارش و اندازه گیری تعداد و طول عروق خونی بررسی گردید.

#### آنالیز و بررسی ویژگی های مورفومتریک

از آنجا که میزان خون رسانی در جنین می تواند بر روی بسیاری فاکتورها از جمله قد و وزن جنین تاثیر داشته باشد، از این رو، در این بررسی قد جنین یعنی فاصله از فرق سر تا نشیمنگاه توسط کولیس اندازه گیری شد. در ادامه وزن جنین با استفاده از ترازو با دقت ۰/۰۰۱ ثبت گردید.

#### تحلیل آماری

داده های به دست آمده از نرم افزار Image J و نتایج مربوط به قد و وزن جنین ها با استفاده از نرم افزار SPSS و تحلیل واریانس یک طرفه و با استفاده از تست LSD تجزیه و تحلیل گردید و میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شد. در این بررسی، میزان معناداری به صورت  $p \leq 0.001$ \*\*\*،  $p \leq 0.01$ \*\* و  $p \leq 0.05$ \* نشان داده شد.

#### یافته ها

##### بررسی زیستایی جنین ها

پس از باز کردن پوسته تخم مرغ ها، در گروه کنترل تمامی جنین ها زنده و فعال بودند و برای یک ساعت زنده ماندند، سیستم عروقی به خوبی در آن ها توسعه یافته بود

اولین بار توسط دکتر جوزف لیتون طراحی شده است و یکی از روش های متداول بافت شناسی است که با مشاهده مستقیم، تعداد عروق خونی را می شمارد (۱۳). بنابراین در این بررسی، اثرات ضد رگ زایی نانوذره سنتز شده به روش سبز از گیاه روناس با استفاده از آزمون غشای کریوالانتویئیک (CAM) انجام شد که این بررسی بر پایه استفاده از محصولات و فرآورده های طبیعی و بهینه سازی آن ها برای ساخت درمان های جدید به منظور مهار سرطان می باشد.

#### مواد و روش ها

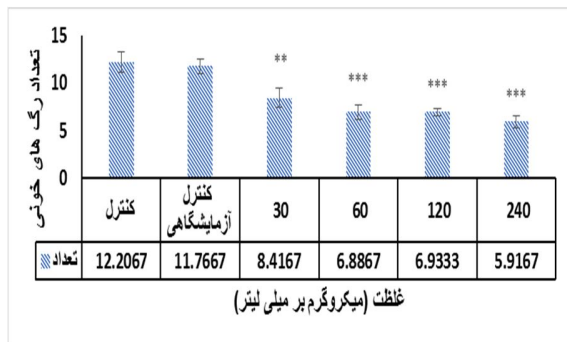
##### سنتز نانوذرات نقره از گیاه روناس به روش سبز

برای این منظور، محلول نیترات نقره با غلظت ۰/۱ مولار حل شده در آب دیونیزه با عصاره آبی تهیه شده از روناس ترکیب شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار داده شد. نانوذرات تشکیل شده برای انجام روش های تایید سنتز مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت.

##### تست CAM

در ابتدا تخم مرغ های نطفه دار نژاد Ross از کمپانی توس مشهد خریداری شده و به صورت کاملاً تصادفی در ۶ گروه شامل کنترل و کنترل آزمایشگاهی و چهار گروه تیمار تقسیم شدند (۱۰ عدد در هر گروه). قبل از قرار دادن در انکوباتور، تخم ها به دقت با پنبه و الکل ۷۰ درصد تمیز شدند و در ادامه به مدت ۴۸ ساعت در انکوباسیون تحت دمای ۳۷/۶ درجه سانتی گراد و رطوبت ۷۰ و چرخش اتوماتیک قرار گرفتند. در روز دوم پس از انکوباسیون، بخشی از پوسته تخم برداشته شد و سپس پنجره ایجاد شده با استفاده از چسب مخصوص و پارافین مسدود گردید و تخم مرغ ها به انکوباتور برگردانیده شدند. ۸ روز پس از انکوباسیون ها، تخم مرغ ها از انکوباتور خارج شدند و به زیر هود منتقل گردیدند. پنجره موجود در پوسته تخم مرغ ها باز شد و سپس اسفنج مخصوص به منظور انجام تیمار در روی پرده کوریوالانتویئیک قرار گرفت. در ادامه غلظت های مختلف نانوذره تهیه شد و ۱۰ میکرولیتر از هر غلظت بر روی اسفنج های موجود بر روی

بررسی اثر نانوذره بر تعداد عروق خونی در نمونه های تست شده نشان داد که تغییر قابل توجهی در نمونه شاهد ( $1/04 \pm 12/2$ ) و شاهد آزمایشگاهی ( $0/7 \pm 11/76$ ) وجود ندارد، بنابراین وجود نرمال سالین و اسفنج به تنهایی نقشی در مهار رگ زایی ندارد و نتایج حاصل از آزمون را می توان به نانوذره مورد بررسی نسبت داد. نتایج نشان داد که تعداد رگ های خونی در گروه اول ( $1/02 \pm 8/41$ ) نسبت به نمونه کنترل کاهش معنی داری را در حد  $p \leq 0/01$  \*\* نشان می دهد، حال آن که با افزایش غلظت نانوذره اثر مهاری آن بر رگ زایی افزایش پیدا کرد و میزان معنی داری در غلظت 60 و بالاتر از آن به  $p \leq 0/001$  \*\*\* رسید (شکل ۲).



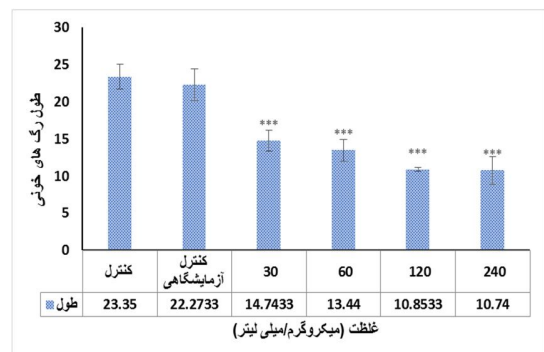
شکل ۲. میانگین تعداد رگ های خونی تحت درمان با نانوذره در مقایسه با شاهد بدون درمان ( $p \leq 0/001$  \*\*\*)،  $p \leq 0/05$  \*

اثر تیمار با نانوذره بر قد جنین های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل بررسی قد جنین ها (فاصله از فرق سر تا نشیمنگاه) نشان داد که تفاوت معنی داری بین قد جنین های تیمار شده با گروه کنترل وجود ندارد. مقایسه گروه کنترل ( $0/8 \pm 41/23$ ) با گروه های تیمار شده با غلظت 30 میکروگرم بر میلی لیتر ( $0/3 \pm 35/86$ )، 60 میکروگرم بر میلی لیتر ( $0/9 \pm 35/53$ )، 120 میکروگرم بر میلی لیتر ( $0/6 \pm 35/25$ ) و 240 میکروگرم بر میلی لیتر ( $0/7 \pm 35/9$ ) کاهش معنی داری را در قد جنین ها نشان داد (شکل ۳).

و تمام رگ های خونی از خون پر شده بودند و رنگ قرمز داشتند. در گروه تحت درمان با نانوذرات برخی از جنین ها مرده بودند و بقیه آن ها به خوبی به محرک لمس پاسخ نمی دادند که این نشان دهنده وضعیت قبل از مرگ است. هم چنین عروق خونی کوتاه تر و با تعداد کمتر مشاهده شد.

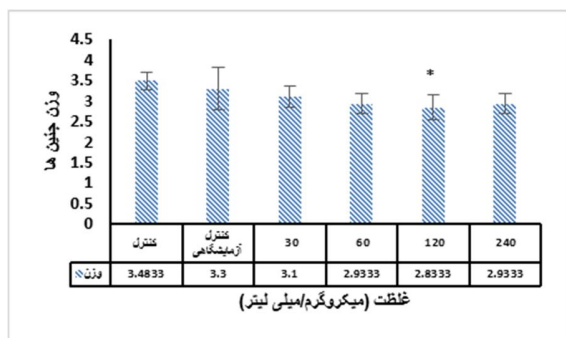
تغییر طول رگ های خونی در تیمار با نانوذره طول عروق خونی یکی از فاکتورهایی است که به صورت مستقیم تحت تاثیر تیمار قرار می گیرد و اثرات مهار کننده و یا القا کننده ماده مورد نظر بر پروسه رگ زایی را نشان می دهد. مقایسه میانگین طول عروق خونی در نمونه های شاهد ( $0/9 \pm 23/35$ ) و شاهد آزمایشگاهی ( $1/2 \pm 22/27$ ) تغییرات قابل توجهی نشان نداد، در حالی که تغییرات ایجاد شده در گروه اول ( $0/8 \pm 14/74$ )، دوم ( $0/8 \pm 13/44$ )، سوم ( $0/1 \pm 10/85$ ) و چهارم ( $1/08 \pm 10/74$ ) نسبت به شاهد قابل توجه بود ( $p \leq 0/001$  \*\*\*).

نتایج نشان می دهد که تیمار با نانوذره در غلظت 30 میکروگرم بر میلی لیتر قادر است طول عروق خونی را به میزان معناداری نسبت به نمونه شاهد کاهش دهد ( $p \leq 0/001$  \*\*\*) که این نشان دهنده اثرات ضد رگ زایی نانوذره مورد بررسی می باشد (شکل ۱).

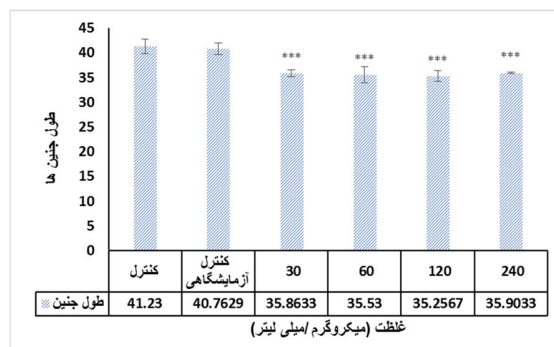


شکل ۱. میانگین طول رگ های خونی تحت درمان با نانوذره در مقایسه با شاهد بدون درمان ( $p \leq 0/001$  \*\*\*)،  $p \leq 0/05$  \*

تغییر تعداد رگ های خونی در تیمار با نانوذره



شکل ۴. میانگین وزن جنین های تحت درمان با نانوذره در مقایسه با شاهد بدون درمان ( $p \leq 0.05^*$ ،  $p \leq 0.001^{***}$ )

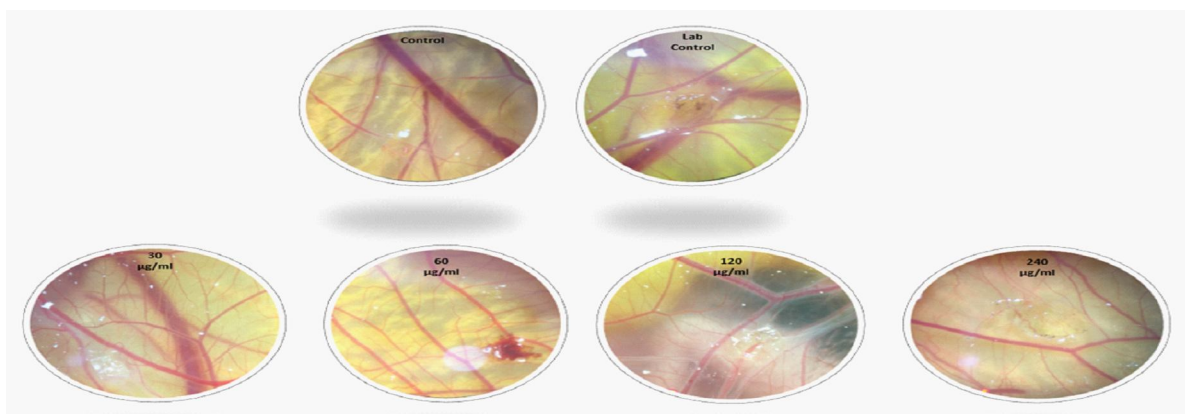


شکل ۳. میانگین قد جنین های تحت درمان با نانوذره در مقایسه با شاهد بدون درمان ( $p \leq 0.05^*$ ،  $p \leq 0.001^{***}$ )

#### بررسی های مورفومتریک

تصاویر تهیه شده با استفاده از استریومیکروسکوپ کاهش قابل توجهی را در گروه کنترل با نمونه های تیمار شده نشان داد. همان طور که شکل ۵ نشان می دهد با افزایش غلظت نانوذره میزان رگ های موجود کاهش می یابد.

اثر تیمار با نانوذره بر وزن جنین های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل بررسی وزن جنین های تیمار شده در گروه کنترل و درمان تغییر قابل توجهی را نشان نداد (شکل ۴).



شکل ۵. عکس برداری از CAM در نمونه های شاهد و تحت درمان. کاهش آنژیوژنز در نمونه های تحت درمان با غلظت های مختلف نانوذره در مقایسه با کنترل

#### بحث

زایی با استفاده از مدل تحلیل CAM مورد آزمایش قرار گرفت.

مدل تست CAM به عنوان یکی از مدل های حیوانی مهم برای درک ویژگی های ضد سرطان مواد مختلف به شمار می آید (۱۵).

نتایج این بررسی نشان داد که نانوذرات Ag به شدت منجر به مرگ جنین شدند و همچنین به طور قابل توجهی طول (شکل ۱) و تعداد عروق خونی (شکل ۲) را

سازمان بهداشت جهانی گزارش می دهد که ۸۰ درصد از جمعیت جهان به طور عمده به داروهای گیاهی برای مراقبت های بهداشتی خود متکی هستند (۱۴). در سال های اخیر شاهد افزایش میزان بروز سرطان در جهان بوده ایم و بنابراین تلاش در جهت جستجوی داروهای ضد سرطان روز به روز در حال افزایش می باشد. در این مقاله، اثر نانوذره نقره سنتز شده از گیاه روناسی به منظور بررسی اثرات ضد رگ

در مطالعه دیگری نشان داده شد که این نانوذرات می توانند مانع تکثیرالقا شده توسط فاکتور رشد اندوتلیال عروق خونی گردیده و مهاجرت و تشکیل لوله را در شبکیه گوسفندی مهار نمایند (۲۰).

علاوه بر این، مطالعات مختلف نشان داده اند که نانوذرات نقره، تشکیل رگ های خونی جدید ناشی از VEGF را به طور مؤثر مهار می کنند. مطالعات مشابه نیز اثر مهاری نانوذرات را بر نفوذپذیری عروقی ناشی از VEGF و اینترلوکین  $1\beta$  - (IL) در سلول های اندوتلیال شبکیه تأیید کرده اند (۲۰، ۲۱).

بررسی های مختلفی بر روی نانوذرات دیگر نیز انجام شده و اثرات ناشی از تیمار نانوذرات گزارش شده است. برای مثال، بررسی اثرات ضد رگ زایی نانوذرات طلا در سال ۲۰۱۱ انجام شد و نتایج نشان داد که این نانو ذرات سبب کاهش میزان رگ زایی شدند و این اثر آن ها احتمالاً به دلیل مهار VEGF به عنوان یک فاکتور رشد عروقی می باشند که سبب کاهش تکثیر، مهاجرت و تشکیل لوله می گردد (۲۲).

همان گونه که مطالعات بالا نشان می دهد، نانوذرات می توانند نقش موثری در کاهش میزان رگ زایی ایفا نمایند که قابل مقایسه با نتایج حاصل از مطالعه حاضر می باشد.

نتایج بررسی حاضر بر روی نانوذره نقره سنتز شده از روناس در مدل CAM نشان می دهد که این نانوذره می تواند به عنوان عاملی بر روند آنژیوژنز پاتولوژیک و به ویژه برای درمان تومورهای جامد که در آن رشد غیر طبیعی و بیش از حد آنژیوژنز باعث رشد تومور می شود، نقش درمانی داشته باشد.

### نتیجه گیری

به نظر می رسد Ag-NPs یک نانوذره با ویژگی ضد سرطان است که می تواند به منظور استفاده بالقوه به عنوان یک داروی ضد سرطان بیشتر مورد بررسی قرار گیرد. استفاده

کاهش داده که نشان دهنده کاهش آنژیوژنز است. از آن جا که رگ های خونی منبع تغذیه و عرضه اکسیژن هستند، از این رو برای زندگی ضروری هستند و نقش مهمی را در روند رشد و توسعه ایفا می کنند. بنابراین عروق کوچک در گروه درمان شده با نانوذرات Ag ممکن است به خاطر کاهش تغذیه و عرضه اکسیژن مسئول مرگ جنین ها و یا کاهش قد (شکل ۳) و وزن جنین (شکل ۴) باشند.

در بررسی های مختلفی نقش نانوذرات نقره در کاهش عروق گزارش شده است (۱۶). در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۱ انجام شد، اثر سیتوتوکسیک و آنتی آنژیوژنیک نانوذره نقره مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که این نانوذره قادر به مهار سلول های سرطانی و هم چنین مهار رگ زایی در پرده کوریوآلانتوییک جوجه می باشد که این بررسی از نظر مهار تعداد و طول عروق خونی مشابه مطالعه حاضر می باشد (۱۷).

نتایج مشابه در تست ماتریزل، اثرات ضد رگ زایی نانوذره نقره را در مطالعه ای دیگر تایید نمود و هم چنین اثرات ضد رگ زایی نانوذرات نقره در پرده کوریوآلانتوییک جوجه را نیز تایید نمود. مطابق با مطالعه حاضر، این اثرات با کاهش میزان رگ زایی همراه بود (۱۸).

در بررسی انجام شده در سال ۲۰۱۴ توسط بهارآرا و همکاران، اثرات ضد رگ زایی نانوذره نقره سنتز شده از *Saliva Officinalis* بر روی پرده کوریوآلانتوییک جوجه مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که تعداد و طول رگ های خونی و هم چنین CR و وزن جنین ها به طور معنی داری نسبت به کنترل کاهش می یابد ( $p < 0/05$ ) (۱۹) که مقایسه نتایج این بررسی با بررسی حاضر نشان می دهد که طول، تعداد و قد جنین ها در هر دو بررسی کاهش معنی داری نشان داده، اما مقایسه وزن جنین ها نشان می دهد که نانوذره تنها قادر بوده در غلظت های بالا تاثیر معنی داری ( $p < 0/05$ ) بر وزن جنین اعمال نماید.

Cellular and molecular life sciences. 2008;65(5):700-12.

8. Daniele G, Corral J, Molife LR, de Bono JS. FGF receptor inhibitors: role in cancer therapy. Current oncology reports. 2012;14(2):111-9.

9. Schmidt C. Why do tumors become resistant to antiangiogenesis drugs? : Oxford University Press; 2009.

10. Lin S-P, Lee Y-T, Yang S-H, Miller SA, Chiou S-H, Hung M-C, et al. Colon cancer stem cells resist antiangiogenesis therapy-induced apoptosis. Cancer letters. 2013;328(2):226-34.

11. Sowmya S, Viswanathan G. ANALYSIS OF SILVER NANOPARTICLE BY TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY (TEM) AND EVALUATION OF NANOPARTICLES UPTAKE IN TUMORS BY USING CHICK CHORIOALLANTOIC MEMBRANE (CAM) ASSAY. 2015.

12. Boller C, Prado MRM, de Toledo MdGT, Garbelini MCDL, Ortolani-Machado CF, Nakashima T, et al. The Anti-angiogenic Effect of Chamomila recutita Aqueous Extract Determined Using a Modified Chicken Chorioallantoic Membrane ex ovo assay. Int J Curr Microbiol App Sci. 2015;4(8):231-43.

13. Quigley JP, Armstrong PB. Tumor cell intravasation alu-cidated: the chick embryo opens the window. Cell. 1998;94(3):281-4.

14. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular aspects of Medicine. 2006;27(1):1-93.

15. Joy AM, Appavoo MR, Mohesh MG. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2016, 8 (1): 549-552. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2016;8(1):549-52.

16. Kang K, Lim D-H, Choi I-H, Kang T, Lee K, Moon E-Y, et al. Vascular tube formation and angiogenesis induced by polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles. Toxicology letters. 2011;205(3):227-34.

17. Will S, Favaron P, Pavez M, Florentino L, Soares D, Oliveira F, et al. Bactericidal silver nanoparticles present an antiangiogenic effect in the Chorioallantoic Membrane Model (CAM). Science against Microbial Pathogens:

از مدل‌های حیوانی دیگر و همچنین مطالعات مولکولی قطعاً می‌تواند یافته‌های حاصل از این مطالعه را بیشتر تأیید نماید.

## تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد با عنوان بررسی فعالیت ضد رگ زایی نانوذرات نقره سنتز شده با گیاه روناس با استفاده از آزمون غشای کوریوالانتوییک جنین جوجه می‌باشد. این کار توسط آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد حمایت گردید. بدین وسیله از کلیه کارشناسان آزمایشگاه که در انجام این پژوهش همکاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

- Gong C, Deng S, Wu Q, Xiang M, Wei X, Li L, et al. Improving antiangiogenesis and anti-tumor activity of curcumin by biodegradable polymeric micelles. Biomaterials. 2013;34(4):1413-32.
- Wu QJ, Gong CY, Luo ST, Zhang DM, Zhang S, Shi HS, et al. AAV-mediated human PEDF inhibits tumor growth and metastasis in murine colorectal peritoneal carcinomatosis model. BMC cancer. 2012;12(1):129.
- Folkman J. Angiogenesis. Annu Rev Med. 2006;57:1-18.
- Zhang J, Zhang Y, Shan Y, Li N, Ma W, He L. Synthesis and preliminary biological evaluation of novel taspine derivatives as anticancer agents. European journal of medicinal chemistry. 2010;45(7):2798-805.
- Sri Devi M, Vinothini K, Veronica Shalini KM, Dharini Sivakumar AP. Angiosuppressive activity of Leucas aspera (Willd) Linn. using Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM) assay. IJIRSET. 2013;2:6327-33.
- Cao Y, Cao R, Hedlund E-M. R Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways. Journal of molecular medicine. 2008;86(7):785-9.
- Kazerounian S, Yee K, Lawler J. Thrombospondins: from structure to therapeutics.



- Communicating Current Research and Technological Advances. 2011;1:219-27.
18. Gurunathan S, Lee K-J, Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, Vaidyanathan R, Eom SH. Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. *Biomaterials*. 2009;30(31):6341-50.
19. 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.
20. Sheikpranbabu S, Kalishwaralal K, Venkataraman D, Eom SH, Park J, Gurunathan S. Silver nanoparticles inhibit VEGF-and IL-1 $\beta$ -induced vascular permeability via Src dependent pathway in porcine retinal endothelial cells. *Journal of nanobiotechnology*. 2009;7(1):8.
21. Wierzbicki M, Sawosz E, Grodzik M, Prasek M, Jaworski S, Chwalibog A. Comparison of anti-angiogenic properties of pristine carbon nanoparticles. *Nanoscale research letters*. 2013;8(1):195.
22. Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, BarathManiKanth S, Haribalaganesh R, Ramkumarpandian S, Gurunathan S. RETRACTED ARTICLE: Gold nanoparticles inhibit vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability via Src dependent pathway in retinal endothelial cells. *Angiogenesis*. 2011;14(1):29-45.