

بررسی اثر نانو ذرات نقره پوشش دار شده با سیلیمارین بر رگ زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی آن

مریم حاج بابایی: کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی تکوین جانوری، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، مشهد، ایران. hajbabaei.h@gmail.com
*جواد بهار آرا: استاد، گروه سلولی تکوین جانوری، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران (*نویسنده مسئول). baharara78@gmail.com

علیرضا ایران بخش: استاد، گروه زیست شناسی فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، تهران، ایران. iranbakhshar@yahoo.com
طیبه رضانی: دانشجوی دکتری تکوین جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران، تهران، ایران. tayeberamezani@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: رگ زایی فرآیندی فعال است که در فرآیندهای فیزیولوژیک و شرایط پاتولوژیک نقش دارد. سیلیمارین ترکیبی فلانوئیدی است که دارای اثرات ضدالتهابی و آنتی اکسیدانی است. در پژوهش حاضر اثرات نانوذرات نقره پوشش دار شده با سیلیمارین بر رگ زایی روی پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه و خاصیت آنتی اکسیدانی این ماده بررسی شده است.

روش کار: تخم مرغ‌های نطفه دار نژاد ROSS به طور تصادفی و مساوی در ۶ گروه توزیع شدند. در روز دوم انکوباسیون روی تخم مرغ‌ها پنجره ایجاد و در روز هشتم تیمار انجام شد. روز دوازدهم از پرده کوریوآلانتوئیک نمونه‌ها عکس تهیه شد. تعداد و طول انشعابات عروقی با نرم افزار J Image اندازه گیری شد. آزمون درابکین برای تعیین سطح هموگلوبین انجام گرفت. فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره با آزمون DPPH و ABTS بررسی شد. اطلاعات باکمک نرم افزار SPSS و آزمون واریانس یک طرفه در سطح معنی داری $p < 0/05$ تحلیل گردید.

یافته‌ها: مقایسه میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی گروه شاهد با گروه تجربی ۲، ۳ و ۴ کاهش معنی‌دار نشان داد. مقایسه طول فرق سری-نشیمگاهی و وزن جنین‌های گروه شاهد با گروه‌های تجربی ۳ و ۴ و همچنین، میانگین غلظت هموگلوبین گروه تجربی ۳ و ۴ نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار نشان داد. نتایج نشان داد که این نانو ذرات بصورت وابسته به دوز منجر به مهار رادیکال‌های آزاد می‌گردند.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها بیانگر آن است نانو ذرات به صورت وابسته به دوز منجر به کاهش رگ‌زایی و افزایش حذف رادیکال‌های آزاد شد.

کلیدواژه‌ها: رگ‌زایی، نانوذرات نقره، پرده کوریوآلانتوئیک جوجه، آنتی اکسیدان

مقدمه

سرطان می‌باشد (۳). از این رو پیشرفت روش درمانی ضد رگ‌زایی گزینه مناسبی در انکولوژی است (۴). نانوذرات در مقایسه با داروهای شیمیایی مزایای متعددی دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به نیمه عمر افزایش یافته و کاهش میزان سمی بودن نسبت به داروها اشاره کرد (۵). این ذرات به صورت گسترده در توسعه و بهبود کیفیت بسیاری از محصولات زیستی و دارویی استفاده می‌شوند. از آنجا که میزان زیست سازگاری و سمیت ناشی از این ذرات بر میکروارگانیسم‌ها و انسان به طور کامل مشخص نشده است، لذا برآورد توانایی نانوذرات با توجه به نوع سیستم زیستی درگیر و درک مکانیسم واکنش حائز اهمیت خواهد بود (۶). امروزه از ترکیبات مختلف نقره در شیمی درمانی

آنژیوژنز یا رگ‌زایی به فرآیند جوانه زدن رگ‌های جدید از رگ‌های موجود در بافت اطلاق می‌گردد (۱). در بیماری‌هایی مانند سرطان، پسروریازیس و اندومتريوزیس، رگ‌زایی بیش از حد اتفاق می‌افتد. در این شرایط عروق خونی جدید بافت‌های بیمار را تغذیه و بافت‌های نرمال را تخریب می‌کنند و درمان‌های ضد رگ‌زایی که در جهت سرکوبی عروق خونی جدیدند، برای درمان این بیماری‌های مزمن در حال گسترش هستند (۲). از طرفی امروزه مهار رگ‌زایی در تومور به استراتژی مهمی در مبارزه با سرطان تبدیل شده است. مهار رگ‌زایی غیر طبیعی در تومور و متعاقب آن مهار متاستاز سلول‌های توموری روش مناسب و کارآمدی برای مقابله با

نقره با پوشش سیلیمارین با روش زیستی تهیه گردید و اثرات آن بر مهار رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه و حذف رادیکال های آزاد بود، مورد بررسی قرار داده شد.

روش کار

تهیه نانو ذرات نقره با پوشش دار شده با سیلیمارین: این پژوهش تجربی آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در سال ۱۳۹۴ انجام شد. برای انجام این تحقیق نانو ذرات نقره پوشش دار شده با سیلیمارین در مرکز تحقیقات تکوین جانوری سنتز شد. جهت سنتز نانو ذرات نقره به وسیله سیلیمارین ۱۰۰ میلی لیتر از محلول سیلیمارین با غلظت ۱۰ میلی مولار با ۱۰۰ میلی لیتر محلول نیترات نقره با غلظت ۱ میلی مولار اضافه گردید. سپس نانو ذرات در شرایط محیطی به مدت ۸ ساعت قرار داده شد تغییر رنگ محلول به قهوه ای نشانه ای از سنتز نانو ذرات نقره بود. نانوذرات سنتز شده با روش طیف سنجی نورماوراء بنفش-مرئی، طیف سنجی نورمادون قرمر، میکروسکوپ الکترونی گذاره شناسایی شد. غلظت نانو ذرات نقره پوشش دار شده با سیلیمارین با دستگاه جذب اتمی تعیین شد. نمونه های تخم مرغ مورد استفاده در این مطالعه از شرکت مرغداران طوس مشهد تهیه شدند.

روش انجام آزمون ضد رگ زایی با کمک پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه: برای انجام تجربیات از تخم مرغ های نطفه دار نژاد Ross (خریداری شده از مجتمع تولیدی مرغ فریمان) به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده شد. تعداد ۴۸ عدد تخم مرغ در ۶ گروه مساوی به طور تصادفی توزیع شد. گروه شاهد که در شرایط طبیعی نگهداری شد. گروه شاهد آزمایشگاهی که با حلال آب مقطر تیمار شد و ۴ گروه تجربی که با نانو ذرات نقره پوشش دار شده با سیلیمارین در غلظت های (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) تیمار شدند. تخم مرغ های نطفه دار در دستگاه جوجه کشی (۳۰۰ خانه ساخت شرکت دام دشت ایران) در دمای ۳۸ درجه

استفاده می شود (۷). نانو ذرات نقره توانایی مهار رگ زایی، در مرحله رشد تومور، تهاجم و متاستاز را دارند و نانوذرات نقره می توانند فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی (VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor) که سبب تکثیر سلولی، حرکت و تشکیل لوله شبه مویرگی سلول های اندوتلیال می شود را مهار کند. همچنین می توانند با هدف قرار دادن مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT به عنوان یک ترکیب ضد رگ‌زایی عمل کنند (۸). سیلیمارین یک ترکیب فلاونوئیدی است که از گیاه خارمریم استخراج می شود و این گیاه، یک ساله (*Silybum marianum*) یا دوساله از خانواده کاسنی است که در اروپا و برخی مناطق آمریکا رشد می کند (۹). سیلیبینین بخش عمده سیلیمارین یعنی حدود ۷۰ تا ۵۰ درصد آن را تشکیل می دهد (۱۰). سیلیمارین به هورمون های استروئیدی بسیار شبیه است و این هورمون ها از طریق افزایش تولید پروتئین بر میزان بیان ژن ها مؤثرند (۹). اثر ضدسرطانی سیلیمارین روی سلول های سرطانی پوست، کولون، تخمدان و دستگاه عصبی مطالعه شده است (۱۱). سیلیمارین از لیپوپروکسیداسیون و آسیب غشای سلولی جلوگیری می کند (۱۲). مطالعه روند رگ‌زایی و بررسی عوامل مؤثر بر آن مستلزم به کارگیری روش های متعدد در داخل بدن است و مدل های داخل بدن رایج شامل لاله گوش خرگوش، حفره گونه هامستر، حفره پوستی پستی، مدل کیسه هوا و پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه هستند (۱۳). سادگی، سرعت و قیمت پایین سنجش های مختلف که به کمک جنین جوجه صورت می گیرد؛ انگیزه استفاده از این مدل را در پژوهش های فارماکولوژی و پزشکی تقویت می کند (۱۴). آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که به طور مؤثر به طرق مختلف اثرزبان بخش رادیکال های آزاد را در سامانه بیولوژیکی و غذایی کم می کنند و موجب مسمومیت زدایی می شوند (۱۵). سیلیمارین ماده مؤثر گیاه خار مریم پلی فنول فلانولیگنان است که در سال های اخیر به دلیل دو خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۶). در این تحقیق نانو ذرات

ضرب در عدد ثابت ۳۶/۸، برای محاسبه غلظت هموگلوبین شد (۱۸).

بررسی های آماری: داده های کمی به کمک نرم افزار SPSS با آزمون ANOVA و آزمون دانکن در سطح معنی دار ۰/۰۵ < p تحلیل شد. نمودارها به کمک نرم افزار اکسل رسم شد.

روش انجام تست آنتی اکسیدان
اندازه گیری میزان خواص آنتی اکسیدانی به روش DPPH: پودر DPPH را در اتانول ۹۵٪ حل گردید و دور از نور نگهداری شد. جهت انجام آزمایش مقدار ۲ میلی لیتر از نانو ذره نقره پوشش دار شده با سیلیمارین، در غلظت های ۵۰، ۲۵، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد و این غلظت ها را با مقدار معادل از محلول DPPH مخلوط شدند و پس از گذشت ۳۰ دقیقه، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نمونه ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت و با استفاده از فرمول زیر، فعالیت به دام اندازی رادیکال های آزاد DPPH اندازه گیری شد. در این آزمون از BHA به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد به منظور مقایسه فعالیت نانو ذره نقره پوشش دار شده با سیلیمارین استفاده شد و از فرمول زیر مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی ارزیابی شد.

= درصد باز دارندگی

$$100 \times \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}}$$

در این رابطه: A control: میزان جذب کنترل و A sample: میزان جذب نمونه (۱۹).

اندازه گیری میزان خواص آنتی اکسیدانی با روش ABTS: محلول های پایه ABTS (۷/۴ میلی مولار) و پتاسیم پرسولفات (۲/۶ میلی مولار) تهیه شد و در ادامه محلول اصلی ABTS به وسیله مخلوط کردن دو محلول پایه به مقدار مساوی با یکدیگر تهیه شد و در دمای اتاق و محیط تاریک نگهداری شد. سپس محلول تهیه شده با آب مقطر رقیق شد. غلظت های ۵۰، ۲۵، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از نانو ذره نقره پوشش دار شده با سیلیمارین را با مقدار معادل از محلول ABTS مخلوط شدند و پس از گذشت ۵ دقیقه با

سانتی گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد قرارداد شد. روز دوم انکوباسیون در شرایط استریل و زیرهود لامینار (Telstar, Spain AV-100) به کمک پنس استریل در سمت پهلویی پنجره های به ابعاد ۵×۵ میلی متر مربع باز شد که به وسیله لامل و پارافین استریل پوشانده شد و تخم مرغ ها به دستگاه جوجه کشی برگردانده شدند. روز هشتم در شرایط استریل پنجره ها باز و یک اسفنج ژلاتینی که شامل آلومین، سفیده تخم مرغ و محلول آگار در نرمال سالین به نسبت مساوی تهیه شده بود، روی پرده کوریوآلانتویک همه نمونه ها قرار داده شد. در نمونه های تیمار مقدار ۱۰ میکرولیتر نانو ذرات نقره پوشش دار شده با سیلیمارین اضافه شد و در نمونه شاهد آزمایشگاهی به اسفنج ژلاتینی مقدار ۱۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس محل پنجره مجدد پوشانده شد و تخم مرغ ها نیز به انکوباتور برگردانده شدند. در روز دوازدهم از تمامی نمونه ها به کمک فوتوآستوئومیکروسکوپ تحقیقاتی (Ziess, Munich, Germany) تصاویری تهیه شد. اندازه گیری طول فوق سری - نشیمنگاهی (CR) باکولیس و وزن با ترازوی دیجیتال صورت گرفت. تعداد و طول انشعابات عروقی در مربع هایی به ابعاد ۲/۵×۲/۵ سانتی متر مربع در ۴ طرف اضلاع اسفنج ژلاتینی با نرم افزار Image J اندازه گیری شد (۱۷).

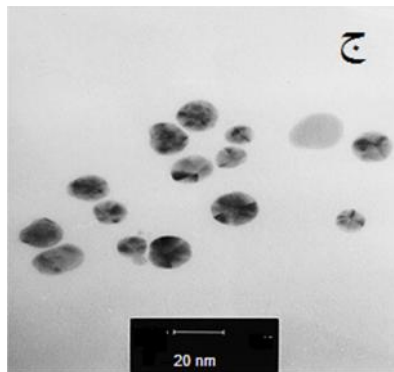
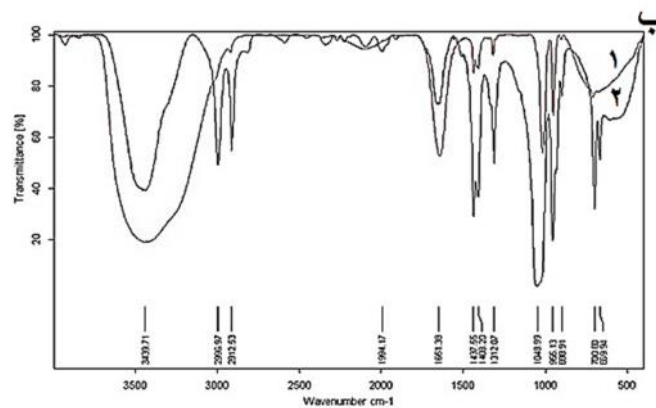
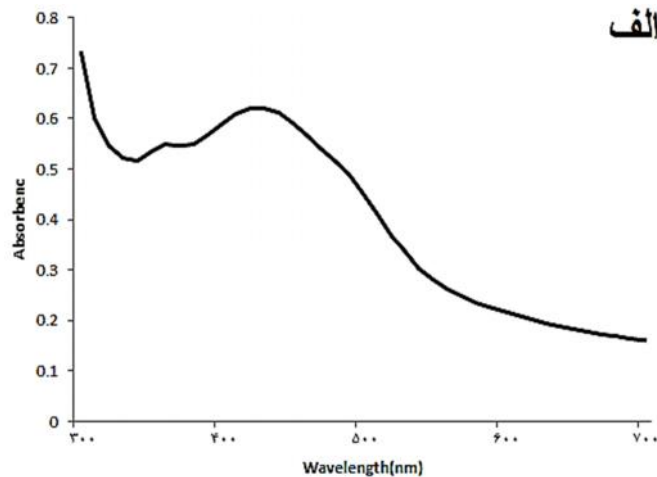
اندازه گیری غلظت هموگلوبین در پرده کوریوآلانتویک جنین جوجه با روش درابکین: برای تعیین سطح هموگلوبین پس از عکس برداری از پرده کوریوآلانتویک در روز دوازدهم، محتویات تخم مرغ ها به جز جنین و پوسته آهکی به یک ارلن انتقال یافتند. به مدت ۱۰ دقیقه توسط همزن مغناطیسی مخلوط و همگن شد. سپس ۲۴ مایکرولیتر از این مخلوط همگن به لوله آزمایش حاوی ۳ میلی لیتر معرف درابکلین اضافه و در آن حل شد. این ترکیب به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط باقی ماند تا واکنش معرف با هموگلوبین صورت پذیرد. در ادامه سانتریفیوژ انجام شد، آنگاه میزان جذب نوری مایع شفاف رویی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۶ نانومتر ثبت شد و عدد به دست آمده

شد و رسم نمودار انجام شد (۲۰).

یافته‌ها

نتایج حاصل از شناسایی نانو ذرات نقره با پوشش سیلیمارین: نتایج طیف سنجی ماوراء بنفش-مرئی نشان داد این نانو ذرات دارای ماکزیم جذب در ۴۳۰ نانومتر در منطقه نور مرئی

استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شدند. در این آزمون از BHA به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد به منظور مقایسه فعالیت نانو ذره نقره پوشش دار شده با سیلیمارین استفاده شد و درصد بازدارندگی با استفاده از فرمول بالا مجدداً محاسبه شد و آزمایش در سه تکرار انجام



شکل ۱- الف): اسپکتروفوتومتری UV از سنتز نانو ذرات نقره پوشش دار با سیلیمارین، (ب): (۱) طیف حاصل از نانو ذرات با پوشش سیلیمارین، (۲) طیف حاصل از سیلیمارین خالص، (ج): تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی گذاره.

فرابنفش بودند (شکل ۱ الف). بررسی طیف جذب نانوذرات نقره سنتز شده با سیلیمارین و ماده سیلیمارین در منطقه مادون قرمز نشان داد که سیلیمارین نانو ذره نقره را احاطه کرده است. این واقعیت به علت شباهت نمودارهای جذبی این دو ماده مشخص گردید (نمودار ۱) مربوط به طیف نانوذرات نقره و (نمودار ۲) طیف ماده سیلیمارین است (شکل ۱ ب). همچنین مطالعات با میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد این ذرات دارای اشکال کروی با ابعاد ۲۰ نانومتر می باشند (شکل ۱ ج).

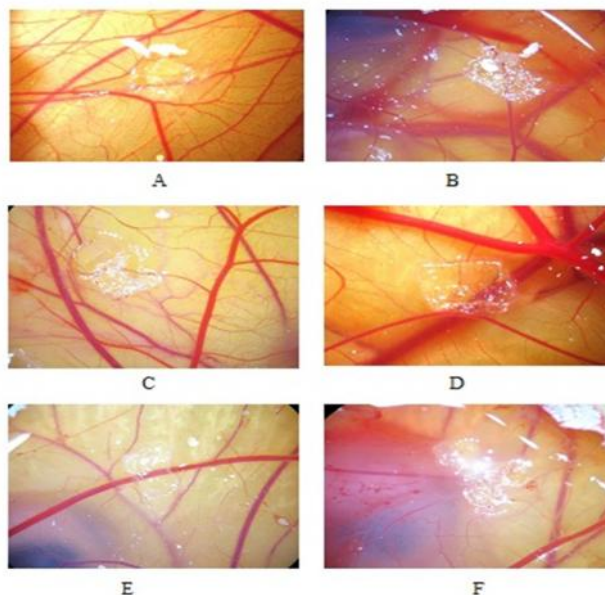
نتایج حاصل از بررسی میزان هموگلوبین خون توسط تست دراپکین: در تمامی یافته‌ها نمونه شاهد با شاهد آزمایشگاهی تغییر معنی داری نسبت به یکدیگر نداشتند ($p > 0.05$); بنابراین در مرحله بعدی نمونه های شاهد با نمونه های گروه های تجربی مقایسه شدند (نمودار جدول ۱).

نتایج حاصل وزن و طول فرق سری - نشیمنگاهی: در تمامی یافته‌ها نمونه شاهد با شاهد آزمایشگاهی تغییر معنی داری نسبت به یکدیگر نداشتند ($p > 0.05$); بنابراین در مرحله

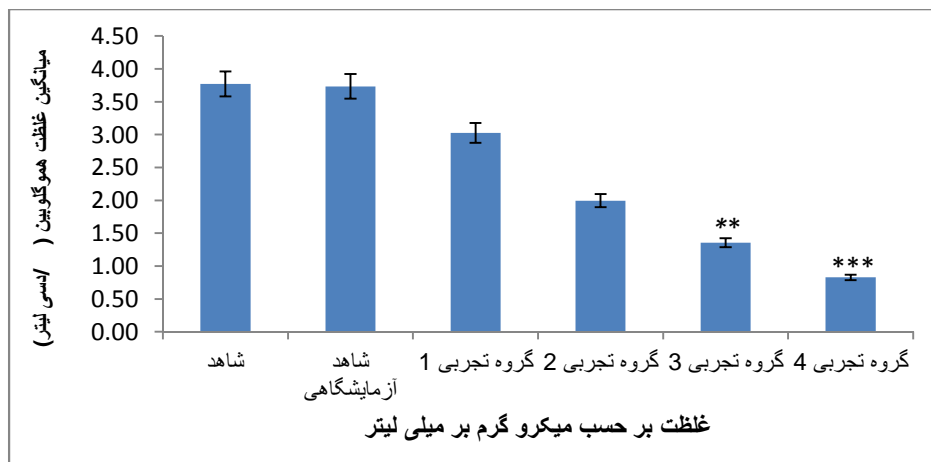
نتایج حاصل از بررسی طول و تعداد عروق: در تمامی یافته‌ها نمونه شاهد با شاهد آزمایشگاهی تغییر معنی داری نسبت به یکدیگر نداشتند

جدول ۱- میانگین تعداد و طول انشعابات عروق، در مورد تعداد و طول عروق در گروه های تجربی ۲، ۳ و ۴ در مقایسه با گروه شاهد معنی دار بودند (شکل ۲).

گروه های تجربی	میانگین تعداد عروق SD±(mm)	p	میانگین طول انشعابات عروقی SD±(mm)	p
کنترل	۲/۲۸±۵۲/۷۲	-	۰/۷۳±۲۲/۸۷	-
گروه تجربی ۱ (۲۵µg/ml)	۲/۳۸±۴۷/۵۳	$p > 0.05$	۱/۱۱±۱۹/۳۴	$p < 0.05$
گروه تجربی ۲ (۵۰µg/ml)	۲/۰۲±۳۴/۰۷	$p < 0.001$	۰/۹۲±۱۶/۵۶	$p < 0.001$
گروه تجربی ۳ (۱۰۰µg/ml)	۲/۰۱±۲۴/۳۰	$p < 0.001$	۰/۵۵±۱۰/۲۵	$p < 0.001$
گروه تجربی ۴ (۲۰۰µg/ml)	۱/۸۸±۱۶/۵۴	$p < 0.001$	۰/۶۷±۶/۸۱	$p < 0.001$



شکل ۲- تصویر فتواسترئومیکروسکوپ از پرده کوریوآلاتنتوتیک جنین جوجه در نمونه های تیمار نانوذرات نقره a: نمونه شاهد (در شرایط آزمایشگاهی فاقد هرگونه تیمار) b: گروه شاهد آزمایشگاهی c, d, e, f: تیمار نانوذره نقره به ترتیب (از چپ به راست) با غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر



نمودار ۱- نمودار میانگین غلظت هموگلوبین در گروه های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تجربی
 $P < 0/01$ ** و $P < 0/001$ *** نسبت به گروه شاهد

جدول ۲- میانگین وزن و طول فرق سری - نشیمنگاهی، در مورد وزن و طول فرق سری - نشیمنگاهی در گروه های تجربی ۳ و ۴ در مقایسه با گروه شاهد معنی دار بودند

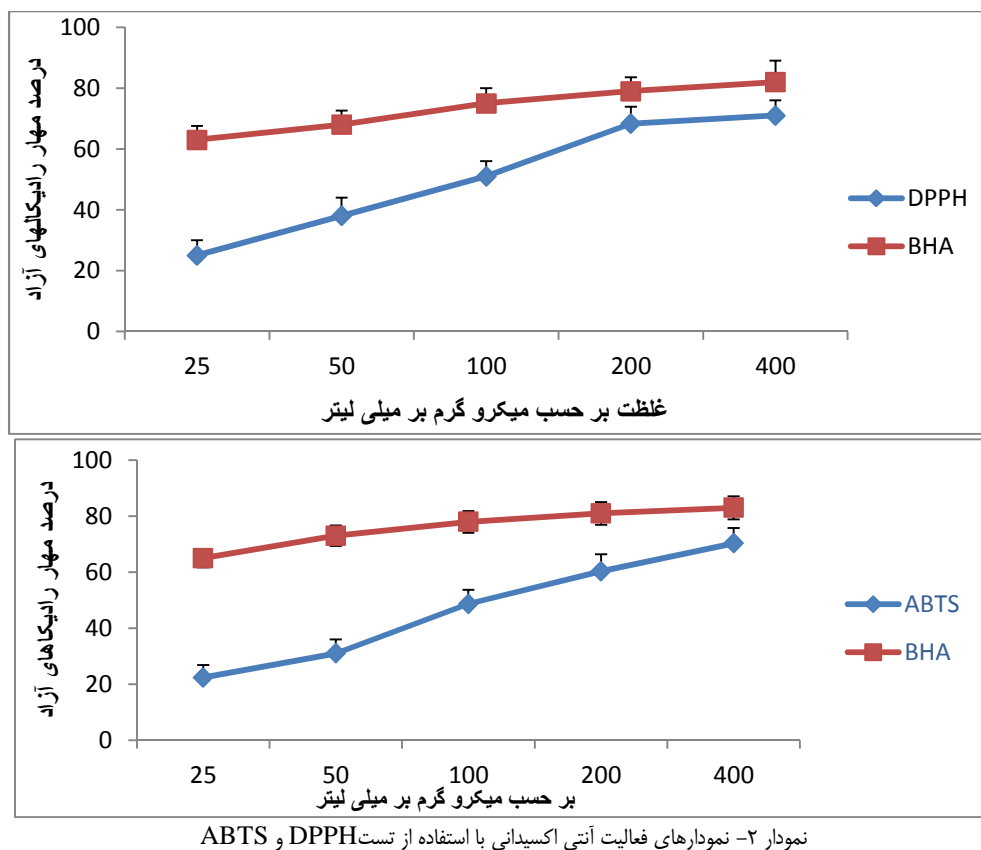
گروه های تجربی	میانگین وزن (g)	p	میانگین طول فرق - سری نشیمنگاهی SD±(mm)	p
کنترل	۰/۲±۳/۰۴	-	۰/۱±۳/۴۳	-
گروه تجربی ۱ (۲۵μg/ml)	۰/۱۹±۲/۹۸	$p > 0/05$	۰/۰۸±۳/۳۲	$p > 0/05$
گروه تجربی ۲ (۵۰μg/ml)	۰/۱۸±۲/۶۴	$p > 0/05$	۰/۲۳±۳/۰۱	$p > 0/05$
گروه تجربی ۳ (۱۰۰μg/ml)	۰/۸۶±۲/۵۳	$p < 0/05$	۰/۱۳±۲/۶۰	$p < 0/01$
گروه تجربی ۴ (۲۰۰μg/ml)	۰/۱۶±۲/۳۴	$p < 0/01$	۰/۱۳±۲/۵۲	$p < 0/01$

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر اثرات نانو ذرات نقره با پوشش سیلیمارین بر رگ زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه مورد بررسی قرار گرفت. سرطان یکی از مهم ترین چالش های علم پزشکی در سال های اخیر محسوب می شود که سالانه جان تعداد زیادی از افراد را در سراسر جهان می گیرد (۲۱). دستیابی به روش های پیشگیری کننده و درمانی سرطان ها و نیز شناسایی مکانیزم های دخیل در روند پیشرفت آن ها با توجه به گسترش این دسته از بیماری ها در سال های اخیر توسعه چشمگیری یافته است (۲۲). رگ زایی فرآیند پیچیده ای است که در آن سلول های اندوتلیال، سلول های ماهیچه صاف، پری سیت ها، فیبرو بلاست، ماتریکس خارج سلولی و انواعی از عوامل رشد نقش دارند. این پدیده در تومورها به سلول های سرطانی اجازه رشد و متاستاز را به سایر ارگان ها می دهد (۲۳). مهار رگ زایی یکی از روش های مورد توجه در مبارزه با سرطان می باشد. از طرفی

بعدی نمونه های گروه های تجربی با نمونه های شاهد مقایسه شدند (جدول ۲).

نتایج حاصل از بررسی درصد مهار رادیکال های آزاد: فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS توسط نانو ذره نقره پوشش دار شده با سیلیمارین مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر قادر به مهار حدود ۵۱ درصد از رادیکال های آزاد DPPH می باشد. در مقایسه با BHA به عنوان یک ترکیب استاندارد که اثر مهاری حدود ۸۰٪ دارد می توان بیان نمود که نانو ذره نقره پوشش دار شده با سیلیمارین اثر مهاری بر رادیکال آزاد DPPH دارد و همچنین نانوذره نقره توسط مهار رادیکال ABTS با (IC50) حدود ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر فعالیت ضد رادیکالی بر علیه رادیکال های آزاد ABTS اعمال نمود. یافته ها بیانگر آن است این نانو ذرات بصورت وابسته به دوز منجر به مهار رادیکال های آزاد شدند و با افزایش غلظت فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش یافته است (نمودار ۲).



آلانتوئیک جنین جوجه به طور معنی داری در نمونه های تیمار نسبت به نمونه های شاهد کاهش داده است ($p > 0.05$).

مطالعات بیانگر این است که سیلیمارین و سیلی بینین بیان فاکتور محرک رگ زایی VEGF را در سلول های سرطانی روده کاهش می دهد. براساس نتایج مقایسه ای سیلیمارین و سیلی بینین معتقدند که اثر ضد رگ زایی سیلیمارین از سیلی بینین بیشتر است (۲۶). Jiang و همکاران در سال ۲۰۰۰ اثرات سیلیمارین را به عنوان یک عامل ضد رگ زایی برای سلول های اندوتلیال سپاهرگ ناف و سلول های سرطانی سینه و پروستات مورد ارزیابی قرار دادند، مواجهه ۵ تا ۶ ساعته سلول های سرطانی سینه و پروستات با سیلیمارین منجر به کاهش ترشح سیتوکین رگ زایی اصلی (VEGF) می شود و بازدارندگی سریع سیلیمارین را نشان داد. نتایج این تحقیق از این فرضیه حمایت می کند که سیلیمارین دارای پتانسیل ضد رگ زایی است که باعث اثر بخشی آن در درمان شیمیایی سرطان می شود (۲۷). نتایج مذکور مبنی

به نظری رسد درمان هایی که مستقیماً رگ زایی را هدف گیری می کنند، خطر کمتری از نظریا جاد مقاومت به داروها در پی دارند و از این لحاظ مشکل مقاوم شدن تومور نسبت به

درمان ها بر طرف می گردد (۲۴). روش های زیست سازگار سنتز نانوذرات نقره و دستیابی به دانش سنتز نانوساختارها با استفاده از روش های دوستدار محیط زیست و به اصطلاح روش های سبز بسیار مهم می باشد. به تازگی روش های بیوسنتزی که از میکروارگانیسم هایی مثل باکتری ها و قارچ ها و یا از عصاره های گیاهان استفاده می کنند به عنوان روش های جایگزین برای سنتز شیمیایی برخی از نانوساختارها مورد توجه قرار گرفتند (۲۵). در این پژوهش اثرات ضد رگ زایی نانو ذرات نقره پوشش دار شده با سیلیمارین در مدل پرده کوریو آلانتوئیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از نانو ذرات نقره پوشش دار شده با سیلیمارین تعداد و طول عروق خونی، غلظت هموگلوبین، وزن جنین و طول فرق سری- نشیمنگاهی در پرده کوریو

سیلیمارین به طرز چشمگیری مهار شد. این ترکیب احتمالاً از طریق مهار VEGF در سلول‌های اندوتلیال عروقی از رگ زایی ممانعت کرده است.

یافته‌های حاصل در بررسی رگ زایی در مدل پرده کوریوآلانتویک ویژگی‌های ضد رگ زایی ماده فوق الذکر را به خوبی نشان داد. برخی از مطالعات حاکی از این است که سیلیمارین واسطه القاء آنزیم‌های سمزدایی و آنتی اکسیدانی است. Nrf2 یک فاکتور رونویسی است در سم زدایی نقش محوری داشته که می‌تواند در سمیت ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی: گلوتاتیون (GSH) و در تخلیه و اختلال میتوکندری مقاومت نماید و سیلیمارین به طور چشمگیری از سمیت سلولی جلوگیری کرده و سیلیمارین به عنوان یک مجری محافظ عمل نموده و این امر از طریق القای مؤثر آنتی اکسیدانی ژن‌های مرتبط اعم از Ho-1, Nrf2 انجام می‌شود. پس سیلیمارین یک فلانوئید پلی فنلی است که به طور اثربخش از طریق Nrf2 که به واسطه مهار ROS و القاء آن قادر است در برابر مسمومیت A549 مقاومت کند (۳۰). همچنین Koyyati و همکارانش، به ارزیابی آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی نانو ذرات نقره ساخته شده از طریق احیای گیاهی *Morinda pubescens* روی سلول‌های کارسینومای کبد پرداختند. نتایج این پژوهش پتانسیل بالای نانو ذرات نقره در کاهش ۱۶/۳۹ درصدی زنده ماندن رده سلولی سرطان کبد را نشان داد و همچنین باعث کاهش رادیکال‌های آزاد شدند (۳۱). همسو با مطالعات قبلی پژوهش حاضر نشان داد که نانو ذره نقره پوشش دار شده با ماده سیلیمارین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است. یافته‌های ما مزایای بالقوه نانو ذرات نقره را به عنوان عوامل ضد رگ‌زایی در مدل پرده کوریوآلانتویک جنین جوجه نشان داد و احتمالاً می‌توان این نانو ذرات نقره پوشش دار را برای درمان در شرایط مختلف رگ‌زایی غیر نرمال به عنوان جایگزین درمانی جذاب و ارزان ارائه نمود. لذا، به نظر می‌رسد انجام مطالعات بیشتر در زمینه مکانیسم‌های بیان ژنتیکی و مسیرهای سیگنال دهی نانو ذره نقره پوشش دار شده با

بر اثرات ضد رگ زایی سیلیمارین با نتایج حاصل از پژوهش حاضر هم سو بود و مطالعات مشابه، اثرات مهاری سیلیمارین را بر عروق تایید کرده اند؛ بنابراین با توجه به اثرات مهاری سیلیمارین در رگ‌زایی احتمال می‌رود مقداری از اثرات مهاری نانو ذرات نقره به دلیل پوشش سیلیمارین بوده باشد. خاصیت ضدسرطانی نانو ذرات نیز در پژوهش‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته شده است. محققین پس از سنتز سبز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاهی، بیان نمودند که این نانو ذرات منجر به کشندگی ۸۵ درصدی رده سلولی سرطانی شدند (۲۸).

پژوهشگران در سال ۲۰۱۴ اثر نانو ذرات نقره سنتز شده با گیاه بومادران را بر رگ زایی بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که نانو ذرات نقره باعث کاهش پنجاه درصدی طول و تعداد انشعابات عروق خونی در مقایسه با کنترل می‌شود. این پژوهش نشان داد که نانو ذرات نقره بر سلول‌های اندوتلیال اثرات سمی دارند (۲۹). تحقیق دیگر بیانگر این است که نانو ذرات نقره توانایی مهار رگ زایی، در مرحله رشد تومور، مهاجم و متاستاز را دارند و نشان دادند که نانو ذرات نقره می‌توانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی که سبب تکثیر سلولی، حرکت و تشکیل لوله شبه مویرگی سلول‌های اندوتلیال شبکیه گاو می‌شود و همچنین PEDF را نیز مهار کنند، به علاوه، نانو ذرات نقره به طور موثری، شکل گیری رگ‌های میکروسکوپی جدید ناشی از VEGF را مهار می‌کنند، برای درک مکانیسم اساسی نانو ذرات نقره بر روی تأثیر مهاری رگ زایی، بیان نمودند که نانو ذرات نقره می‌تواند از فعال شدن PI3K/Akt جلوگیری کنند. از مجموع این مطالب نتیجه گرفتند که نانو ذرات نقره می‌تواند با مورد هدف قرار دادن فعالیت مسیرهای سیگنالینگ PI3K/Akt، به عنوان یک مولکول ضد رگ زایی عمل کند (۸).

نتایج در محدوده مطالعه انجام شده نشان داد که افزایش غلظت نانو ذره نقره پوشش دار شده با سیلیمارین منجر به کاهش رگ زایی شده است تکثیر و گسترش سلول‌های اندوتلیال عروقی پس از تیمار با نانو ذره نقره پوشش دار شده با

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. Sangiliy G, Kyung J, Kalimuthu K, Sardarpasha S, Vaidyanathan R, Eom SH. Antiangiogenic properties of silver nanoparticle. *Biomaterials* 2009;30:6341-50.

9. Dixit D, Baboota S, Kohli K, Ahmad S. Silymarin: A review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approaches. *Indian J Pharmacol* 2007;39(4):120-34.

10. Ramasamy K, Agarwal R. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Letters* 2008; 269:352-62.

11. Radko L, Cybulski W. [Application of silymarin in human and animal medicine]. *JPCCR* 2007;1(1):220-26. Persian.

12. Parish RC, Doering PL. Treatment of amanita mashroom poisoning: a review. *Vet Hum Toxicol* 1998;28:318-22.

13. Hendrix M, Seftor E, Seftor R. Vasculogenic mimicry: angiogenesis in disguise. In: Frough R. *New frontiers in angiogenesis*. Netherlands: Springer Netherlands; 2006. p: 97-109.

14. 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):62-76.

15. Shrififar F, Moshafi M, Mansouri S. [Invitro evaluation of anti bacterial an antioxidant of the essential oil and methanol extract of endomic *zataria multiflora boiss*]. *Food Control* 2007;18:800-5. Persian.

16. Mahmoodi N, Motamed N, Paylakhi SH. [Survey the effect of silybin on herbin2 in skbr3 breast cancer cell line]. *GUMS* 2012;84:34-41. [Persian]

17. Ruggiero M, Bottaro DP, Liguri G, Gulisano M, Peruzzi B, Pacini S.T magnetic field inhibits angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane. *Bioelectromagnetics Jul* 2004;25(5): 390-6.

18. Viji Ri, Kumar VB, Kiran MS, Sudhakaran PR. Angiogenic response of endothelial cells to heparin-binding domain of fibronectin. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(2):215-26.

19. Rajamanikandan S, Sindhu T, Durgapriya D, Sophia D, Ragavendran P, Gopalakrishnan VK. Radical scavenging and antioxidant activity of ethanolic extract of *Mollugo nudicaulis* by invitro assays. *Ijper*. 2011 1;45(4):310-6.

20. Li P, Huo L, Su W, Lu R, Deng C, Liu L, et al. Free radical scavenging capacity, antioxidant activity and phenolic content of *pouzolzia zylanica*. *J.Serb.chem.Soc* 2011;76:709-17.

21. Japp A, Gielen GH, Becker AJ. Recent aspects

سیلیمارین و تحقیق بر روی اثرات ضد سرطانی نانو ذرات نقره پوشش دار شده با سیلیمارین ضروری است.

محدودیت این پژوهش تهیه تخم مرغ های نطفه دارای قابلیت ایجاد جنین بود.

نتایج بیانگر آن است که نانو ذرات نقره پوشش دار شده با سیلیمارین به صورت وابسته به دوز و غلظت باعث کاهش تعداد عروق و طول انشعابات عروقی می شود. همچنین نانو ذره نقره پوشش دار شده با سیلیمارین به صورت وابسته به دوز منجر به افزایش مهار رادیکال های آزاد می شود. لذا، می توان نتیجه گیری کرد این نانو ذرات قادر به مهار رگ زایی اندوهمچنین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی هستند.

تقدیر و تشکر

از همکاران و کارشناسان محترم بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی که در اجرای این طرح صمیمانه همکاری داشتند سپاسگزاری می نمایم.

منابع

1. Baharara J, Namvar F, Mousavi M, Ramezani T, Rosfarzin M. Anti-angiogenesis effect of biogenic silver nanoparticles synthesized using saliva officinalis on chick chorioalantoic membrane (CAM). *Molecules* 2014;19(9):13498-508.

2. Fan T, Yeh J, Leung K, Yue P. Angiogenesis: from plants to blood vessels. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27(6):297-309.

3. 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.

4. Aybike O, Achim A, udo B. A chorioallantoic membrane model for the determinatioof anti-angiogenic effects of imatinib. *J. Pharm. Biopharm* 2013;85:711-5.

5. Deboshri B, Rania H, Shiladitya S. Nanotechnology-mediate targeting of tumor angiogenesis. *Vascular Cell* 2011;3: 1-13.

6. Martirosyan A, Bazes Y Schneider. In vitro toxicity assessment of silver nanoparticles in the presence of phenolic compounds – preventive agents against the harmful effect? *Nanotoxicology* 2014;8(5):573-82.

7. Palaniappan P, Sathishkumar G, Sankar R.

of classification and epidemiology of epilepsy-associated tumors. *Epilepsia* 2013;5-11.

22. Kaefer CM, Milner JA. The role of herbs and spices in cancer prevention. *J Nutr Biochem* 2008. 19(6): 347-61.

23. GAO P, Yang JL, Wang H, Wu XD, Jiao SC. A two-dimensional model for studying tumor angiogenesis inhibitors. *Cancer Invest* 2013. 31(5): 346-58.

24. Mousavi M, Baharara J, Zafar-balanezhad S, Shaheokh-abadi K. The effect of saffron aqu extract on angiogenesis in chick chorioalantoic membrane. *Zjrms* 2014; 16(3):55-8.

25. Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram positive and gram-negative bacteria. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2010;6(1):103-9.

26. Yang J, Wang H, Wang Z, Tan X, Song C, Zhang R, et al. Interaction between antitumor drug and silver nanoparticles: combined fluorescence and surface enhanced Raman scatter in study. *Chin Opt Lett* 2009;7(10):894-97.

27. Jiang Ch, Agarwal R, Junxuan L. Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive Flavonoid antioxidant, silymarin: inhibition of key attributes of vascular endothelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cell. *Biochem. Biophys. R* 2000;276:371-8.

28. Sulaiman GM, Mohammed WH, Marzoug TR, Al-Amiery AA, Kadhum AA, et al. Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013;3(1):58-63.

29. Baharara J, Namvar F, Ramezani T, Hosseini N. Green synthesis of silver nanoparticles using *Achilleabiebersteinii* flower extract and its anti-angiogenic properties in the rat aortic ring model. *Molecules* 2014;19:4624-34.

30. Biswajit P, Yong-sik K, Tamanna Z, Ho-Yean S. Antioxidant effect of silymarin on paraquat induced human lung adenocarcinoma A549 cell line. *FCT* 2012;50:3206-14.

31. Koyyati R, Nagati V, Ramchander M, Manthurpafigya P. Biological synthesis of silver nanoparticles using *Raphanussativus* var. *Longipinnatus* leaf extract and evaluation of their antioxidant and antibacterial activity. *IJMPS* 2013;3(4):89-100.

Investigation of the angiogenesis effect of silver nanoparticles coated with silymarin on chick embryo chorioalantoic membrane and evaluation of its antioxidant activity

Maryam Hajbabaie, MSc in Cell and Developmental Biology, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran. hajbabaie.H@gmail.com

***Javad Baharara**, PhD, Professor of Cell and Developmental Biology, Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University University, Mashhad, Iran (*Corresponding author). baharara78@gmail.com.

Alireza Iranbakhsh, PhD, Professor of Plant Physiology, Department of Biology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. iranbakhshar@yahoo.com.

Tayebe Ramezani, PhD Student in Cell and Developmental Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. tayeberamezani@gmail.com.an Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran (*Corresponding author). s_sobhan@iauh.ac.ir

Abstract

Background: Angiogenesis is a complex, active phenomenon, which plays a significant role in physiologic and pathologic processes. Silymarins are combination of flavonoids that have antioxidant and anti-inflammatory effects. In the current research, the effects of silver nanoparticles coated with silymarin on the angiogenesis of the chorioalantoic membrane of chicken fetal and its antioxidant property have been explored.

Methods: Ross Fertilized Chicken eggs were distributed randomly and equally in control group, laboratory control group, and four experimental groups with different densities. In the second day of incubation, some windows were formed on the eggs and, on the eighth day, they were treated. On the twelfth day, some photographs were taken from the subjects' chorioalantoic membranes, the number and length of the vessels were measured, using the Image J software. Also the Drabkyn test was executed to determine the level of hemoglobin and the obtained results were analyzed as significant ($P < 0.05$), using SPSS software and T-Test. Further, to evaluate the antioxidant activities of silver nanoparticles coated with silymarin, DPPH and ABTS tests were used.

Results: The comparison between the average of the number and length of the vessels in control group and the experimental groups 2, 3, and 4 showed significant reduction. The comparison between the fetal crown-rump length and weight in control group and the experimental groups 3 and 4 showed significant reduction. Also, the average amount of hemoglobin density in the experimental group 4 showed significant reduction, in comparison to the control group. According results from antioxidant assay, the nanoparticles showed dose dependent radical inhibited activity.

Conclusion: In addition, the nanoparticles lead to dose dependent reduction in angiogenesis and increase the removal of free radicals.

Keywords: Angiogenesis, Silver nanoparticles, Chorioalantoic membrane, Chicken, Antioxidant