ارزیابی کمی و مورفومتریک اثرات آنژیوژنیک نانوذره نقره سنتز شده از ریشه گیاه انجبار بر پرده کوریوآلانتوییک جوجه

ریحانه شالی[۱]، علی نعمتی*[۲]، پوران اردلان[۳]

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش ۱۳۹۷/۰۲/۰۹

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: آنژیوژنز (رگ زایی) یک رویداد کلیدی در طول رشد تومور محسوب می‌گردد. ازآنجاکه سلول‌های توموری اکسیژن و گلوکز بیشتری نسبت به سلول‌های طبیعی نیاز دارند، در طول زمان رشد تومورهای جامد، عروق خونی جدید به‌سرعت در جهت برآورده ساختن نیازهای مواد مغذی افزایش می‌یابد. ازاین‌رو هدف قرار دادن و مهار تشکیل رگ‌های خونی جدید می‌تواند سبب کاهش تغذیه و دسترسی سلول‌های توموری به اکسیژن گردد و همین امر سبب مهار رشد تومور می‌شود. در مطالعه حاضر، اثر نانو ذرات نقره سنتز شده به روش سبز با استفاده از ریشه گیاه *Persicaria bistorta* بر فرایند رگ زایی بر روی پرده کوریوآلانتوییک جوجه موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار: برای این منظور ۶۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار نژاد Ross تهیه شد و در شش گروه به‌صورت تصادفی تقسیم‌بندی شدند. دو گروه به‌عنوان شاهد و شاهد آزمایشگاهی (تیمار شده با حلال) دو روز پس از انکوباسیون در هر تخم‌مرغ پنجره ایجاد و روز هشتم نمونه‌ها با غلظت‌های مختلف (۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰ و ۴۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذره نقره سنتز شده از گیاه انجبار تیمار شدند. درنهایت در روز دوازدهم تصاویر پرده کوریوالانتوییک با استفاده از استریومیکروسکوپ تهیه و سپس با استفاده از نرم‌افزار Image J شمارش و اندازه‌گیری طول رگ‌ها انجام شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آنالیز آماری یک‌طرفه ANOVA در سطح معنی‌داری $P <0.05, 0.01, 0.001$ انجام شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج به‌دست‌آمده نانوذره نقره موردبررسی در غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، طول و تعداد رگ‌های خونی را در مقایسه با گروه شاهد به میزان قابل‌توجهی ($P<0.001$) کاهش داد. نتایج حاصل از بررسی اثر نانوذره بر وزن جنین‌ها تغییر چشمگیری را در مقایسه با شاهد نشان نداد اما قد جنین‌ها از گروه‌های تیمار شده با غلظت ۲۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره کاهش معنی‌داری ($P<0.01$) را نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: بر این اساس، استفاده از نانو ذرات نقره می‌تواند به‌عنوان یک درمان بالقوه علیه آنژیوژنز پاتولوژیک و تومورهای جامد باهدف قرار دادن عروق خونی موردتوجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آنژیوژنز، نانوذره نقره، کوریوآلانتوییک جنین جوجه، گیاه انجبار

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و نهم، شماره سوم، ص ۲۱۶-۲۰۸، خرداد ۱۳۹۷

آدرس مکاتبه: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی، تلفن: ۰۵۱-۳۸۴۳۵۰۵۰

Email: neamati.ali@gmail.com

مقدمه

آنژیوژنز فرایندی طبیعی در رشد و ترمیم به شمار می‌آید، به معنی تشکیل عروق خونی جدید از قبلی می‌باشد و حاصل تعادل پیچیده بین عوامل تحریک‌کننده و مهارکننده است. آنژیوژنز فرایند حیاتی در رشد جنین، چرخه تولیدمثل و بهبود زخم است(۱) اما افزایش بیش‌ازحد آن اغلب به شرایط پاتولوژیک مانند آرتریت روماتوئید، رتینوپاتی دیابتی، تومور جامد و پسوریازیس منجر می‌شود. برای غلبه بر آنژیوژنز پاتولوژیک، چندین درمان با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مانند ویتاکسین (۲) ، مهارکننده‌های آنژیوژنیک (۳)، مهارکننده‌های سیگنال داخل سلولی سلول اندوتلیال (۴) و غیره توسعه یافته است.

[۱] گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

[۲] گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران (نویسنده مسئول)

[۳] گروه شیمی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

سرطان یکی از مهم‌ترین و کشنده‌ترین بیماری‌ها می‌باشد که ممکن است درنتیجه بر هم خوردن تعادل فاکتورهای آنژیوژنیک و درنتیجه افزایش رگ زایی ایجاد گردد (۵). جستجوی پیوسته‌ای برای کشف مهارکننده‌های آنژیوژنز وجود دارد، با این امید که این عوامل باعث جلوگیری از رشد و گسترش سرطان شوند (۶).

گیاهان منبع اصلی محصولات جدید طبیعی هستند که اخیراً موردتوجه بسیاری قرار گرفته‌اند و می‌توانند به‌عنوان داروها یا واسطه‌های دارویی مورداستفاده قرار گیرند. به گفته سازمان بهداشت جهانی، بیش از ۸۰ درصد جمعیت جهان در کشورهای درحال‌توسعه بیشتر به داروهای گیاهی مبتنی بر نیازهای بهداشتی اولیه نیاز دارند(۷) .

استفاده از گیاهان دارویی به دلیل خواص و ویژگی‌های منحصربه‌فردشان در داروسازی و نانوتکنولوژی سبب ورود گیاهان به عرصه‌های تخصصی درمان شده است. نانو بیوتکنولوژی در حال حاضر یکی از پویاترین رشته‌های تحقیق در علوم مواد است. بررسی‌های مختلف تاکنون نقش برخی نانو ذرات را در پروسه رگ زایی تأیید کرده‌اند. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که نانو ذرات مس، دارای اثرات القاکننده رگ زایی می‌باشند (۸) درحالی‌که نانو ذرات طلا (۹)، نانو ذرات فلوئوروکربن (۱۰)، آلوتروپ‌های کربن و غیره اثرات ضد آنژیوژنیک دارند.

بیشتر نانو ذرات نقره اثرات ضد رگ زایی دارند و به‌احتمال‌زیاد این اثرات مربوط به ساختار منحصربه‌فرد شبکه‌ای کریستال‌های نقره (Ag) می‌باشد. این ساختار سبب ذخیره و به دام انداختن اکسیژن در داخل حفره‌های هشت‌ضلعی از Ago می‌گردد که احتمالاً همین امر سبب کاهش سطح اکسیژن در محیط و به دنبال آن کاهش رگ زایی می‌شود (۱۱). روش‌های مختلفی برای ساخت نانو ذرات وجود دارند و تاکنون نانو ذرات مختلفی ازجمله Pt (پلاتین)، Ag (نقره)، Au (طلا)، PBS (سولفید سرب) با استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی سنتز شده‌اند. امروزه گزارش‌های زیادی مبنی بر سنتز نانو ذرات با استفاده از فنّاوری سبز، یعنی استفاده از گیاهان (۱۲، ۱۳) و پروبیوتیک وجود دارد (۱۴).

سنتز نانو ذرات نقره‌ای سبز با استفاده از عصاره‌های گیاهی یک روش بسیار ساده و کم‌هزینه است که امکان بروز خطرات زیست‌محیطی را از بین می‌برد (۱۵).

در این مطالعه، نانو ذرات نقره با روش سبز با استفاده از عصاره ریشه انجبار (Persicaria bistorta) تهیه شد و نانو ذرات حاصل از آن‌ها به‌منظور بررسی آنژیوژنز در مدل غشای کوریوآلانتوییک جنین جوجه (CAM) موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

تهیه نانوذره نقره از گیاه انجبار:

به‌منظور انجام مطالعه حاضر ابتدا عصاره آبی ریشه انجبار تهیه شد، به‌این‌ترتیب که میزان ۱۰ گرم از پودر ریشه انجبار تهیه و با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر یونیزه مخلوط گردید به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن صاف گردید و نانوذره نقره به روش سبز (استفاده از عصاره گیاهی به‌منظور سنتز نانو ذرات) تهیه گردید. سپس سایز ذرات اندازه‌گیری شد و با استفاده از روش‌های تصویربرداری و XRD سنتز نانوذره موردنظر تأیید گردید(۱۶). در ادامه بررسی فعالیت‌های ضد رگ زایی نانوذره انجام شد.

مواد:

تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار از شرکت توس مشهد خریداری شد. آگار و آنتی‌بیوتیک با مارک سیگما تهیه شد. پارافین و لامل از شرکت ایران فرا-تهران خریداری شد.

تست آنژیوژنز:

۶۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار نژاد Ross تهیه شد. تخم‌مرغ‌ها با الکل ۷۰ درصد تمیز شدند و به‌طور تصادفی به شش گروه تقسیم شدند: گروه شاهد، شاهد آزمایشگاهی (تیمار شده با حلال) و گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و ۴ تحت درمان با غلظت ۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰ و ۴۸۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر نانوذره نقره (AgNPs). در ادامه تخم‌مرغ‌ها در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۵٪ -۶۵٪ با چرخش خودکار در داخل انکوباتور قرار گرفتند. در روز دوم انکوباسیون یک پنجره در تخم‌مرغ در شرایط استریل (جریان هود لمینار) باز شد، برای این منظور، بخشی از پوسته حذف و پنجره کوچک باز شد تا در روزهای آتی از این مکان تیمار و تزریق صورت گیرد که در ادامه با لامل و پارافین بسته شد. سپس تخم‌مرغ‌ها به انکوباتور منتقل شدند و به‌صورت دستی دو بار در روز برای رشد طبیعی جنین‌ها چرخانده شدند. در روز ۸ انکوباسیون، اسفنج ژلاتین ساخته‌شده از ژلاتین حل‌شده در نرمال سالین و آلبومین همراه با ۲۰۰ میکرولیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین، بر روی غشای کوریوآلانتوییک قرار داده شد و گروه‌های آزمایشی با ۱۰ میکرولیتر AgNPتیمار شدند و به انکوباتور برگردانیده شدند. در روز ۱۲ انکوباسیون، پنجره‌ها مجدد باز شدند و میزان رگ زایی در تخم‌مرغ‌ها با استفاده از استریومیکروسکوپ پژوهشی بررسی شد. متغیرها شامل تعداد و طول رگ‌های خونی است و در تمام نمونه‌ها در اطراف اسفنج ژلاتین با استفاده از نرم‌افزارImageJ اندازه‌گیری شد. طول و وزن نمونه‌ها به‌عنوان صفات مورفومتری به‌منظور بررسی رشد نرمال و هر نوع اختلال در رشد ثبت گردید. به‌منظور بررسی آماری از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و تست LSD استفاده گردید(۱۷).

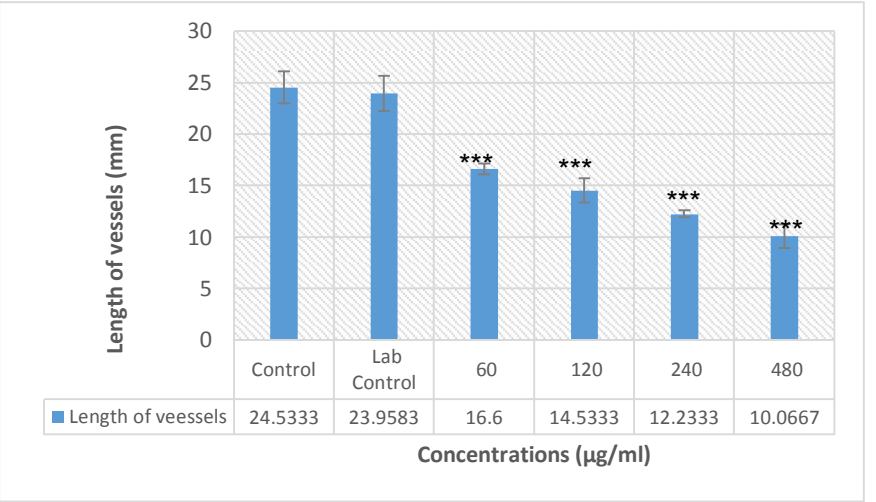
یافته‌ها

اثرات ضد آنژیوژنز:

آزمایش غشای کوریوآلانتوییک (CAM) جنین مرغ به‌عنوان یک مدل in vivo رایج و کارآمد برای مطالعه آنژیوژنز ثابت شده است و تاکنون بسیاری از مهارکننده‌ها و تحریک‌کننده‌های رگ زایی با این روش بررسی شده‌اند(۱۸).

۱-۱. اثر نانوذره نقره بر طول رگ‌های خونی:

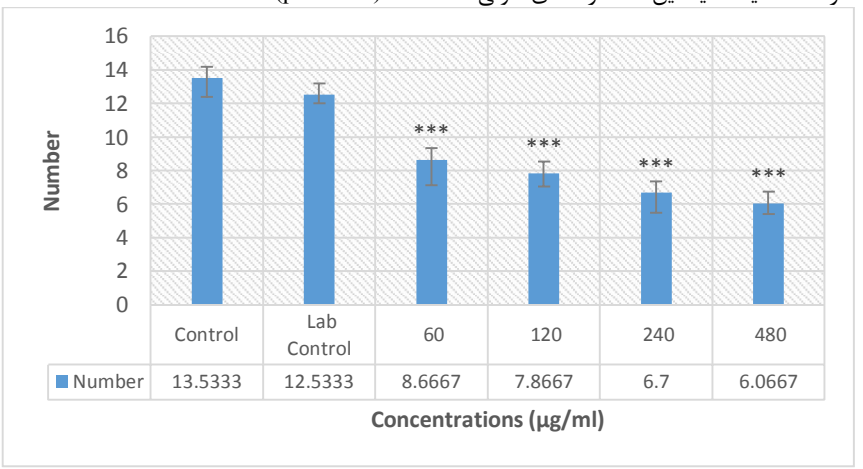
مقایسه میانگین طول رگ‌های خونی در گروه شاهد (۰/۹ ± ۲۴/۵۳)(mm) با شاهد آزمایشگاهی (۰/۹۹ ± ۲۲/۳۶) تفاوت معنی‌داری ($p <0.05$) را نشان نداد همچنین مقایسه میانگین طول در گروه شاهد با نمونه‌های تحت درمان باAgNPs در غلظت ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (۰/۳±۱۶/۶)، ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۰/۶۷±۱۴/۵۳)، ۲۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۰/۲±۱۲/۲۳) و ۴۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۰/۶۶±۱۰/۰۶) کاهش قابل‌توجهی را ازنظر آماری نشان داد ($p <0.001$).



شکل (۱): میانگین طول عروق خونی ($p <0.05^{*}$، $p <0.001^{***}$)

۱-۲. اثر نانوذره نقره بر تعداد رگ‌های خونی:

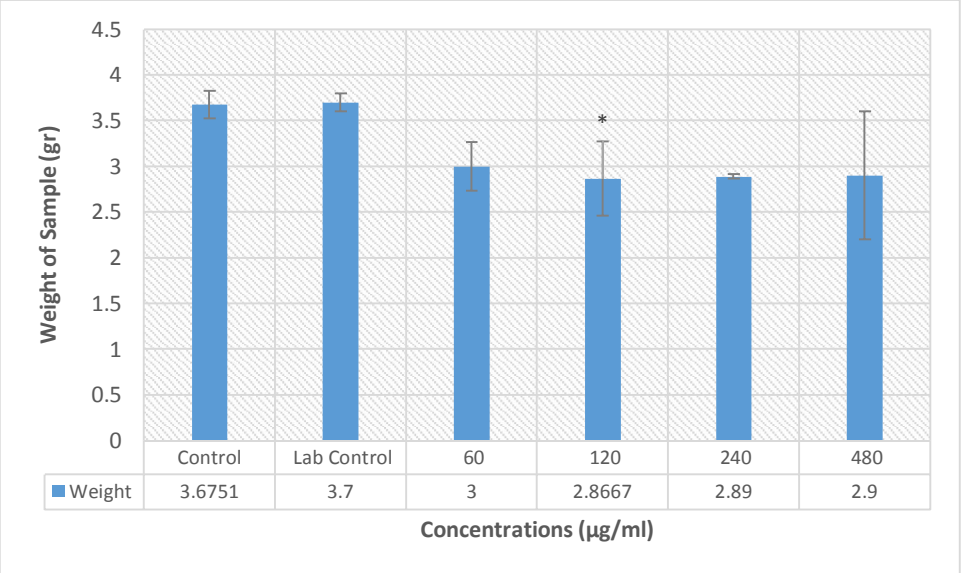
بررسی میانگین تعداد رگ‌های خونی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین شاهد (۰/۶۶±۱۳/۵۳) و شاهد آزمایشگاهی (۰/۲۹±۱۲/۰) وجود ندارد. اما مقایسه میانگین تعداد رگ‌های خونی در نمونه‌های شاهد با نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۶۰ (۰/۸±۸/۶)، ۱۲۰ (۰/۴۶±۷/۸)، ۲۴۰ (۰/۷±۶/۷) و ۴۸۰ (۰/۳۸±۶/۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p <0.001$).



شکل (۲): میانگین تعداد رگ‌های خونی در گروه‌های شاهد و شاهد آزمایشگاهی و ۴ گروه تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذره ($p <0.001$ ***)

۳-۱. اثر نانوذره نقره بر وزن جنین‌های تحت درمان:

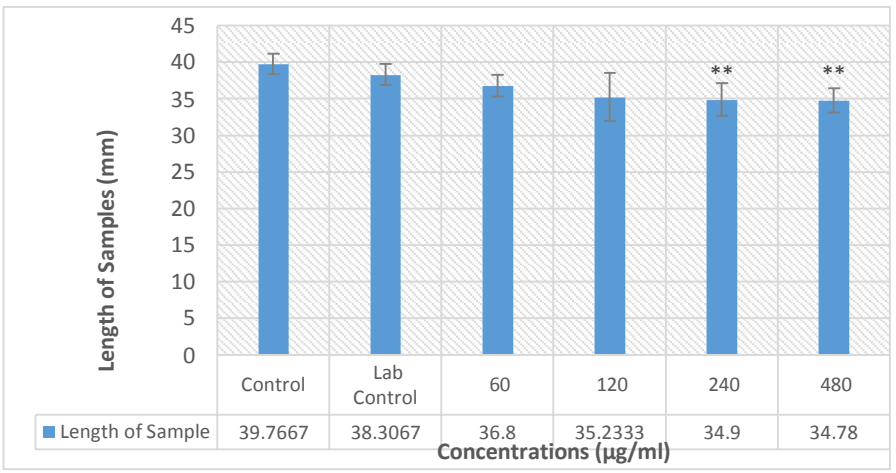
میانگین وزن جنین در گروه شاهد و شاهد آزمایشگاهی اختلاف معنی‌داری ندارد، مقایسه میانگین وزن جنین‌های تحت درمان با غلظت‌های مختلف نانوذره در مقایسه با گروه شاهد تفاوت چندانی را نشان نداد. بنابراین می‌توان گفت که نانوذره موردنظر بر وزن کلی جنین اثر نداشته است.



شکل (۳): میانگین وزن جنین‌های موردمطالعه در گروه‌های شاهد و شاهد آزمایشگاهی و ۴ گروه تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذره (× $p < 0.05$)

۴-۱. اثر نانوذره نقره بر قد جنین‌های تحت درمان:

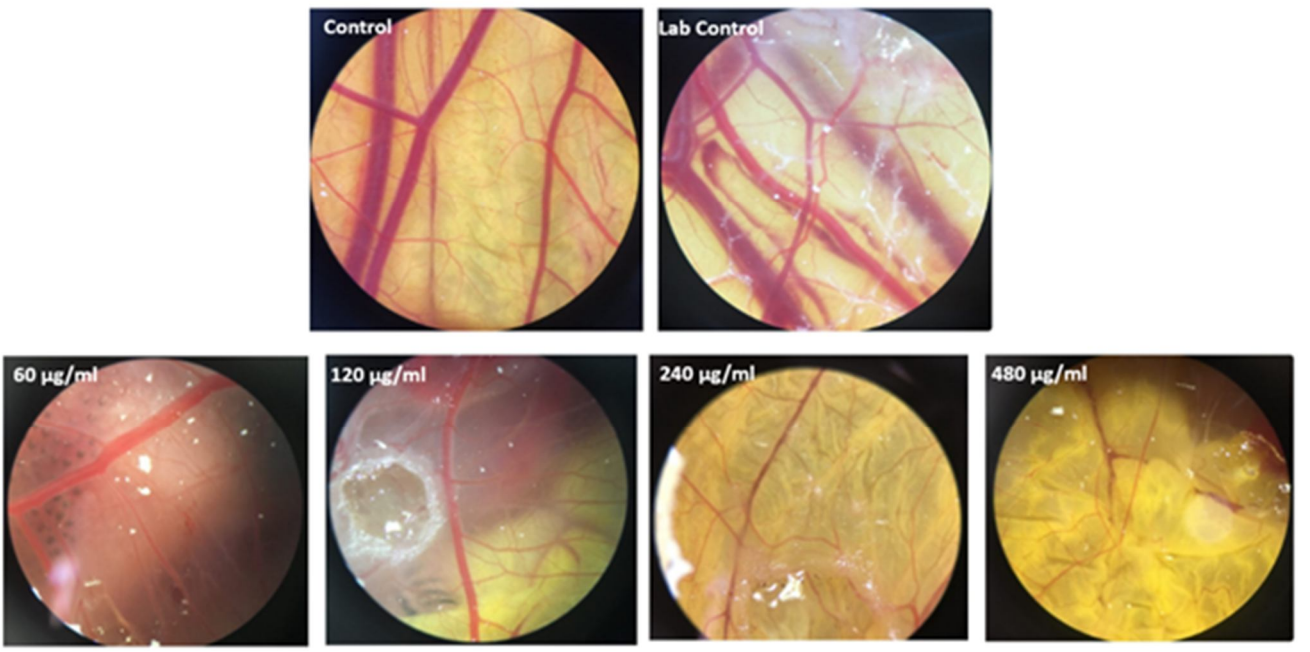
بررسی میانگین قد جنین‌های تیمار شده در گروه شاهد و شاهد آزمایشگاهی تفاوت آماری نشان نمی‌دهد. مقایسه قد جنین‌های گروه شاهد (۰/۸۲±۷/ ۳۹) با نمونه‌های تحت درمان تفاوت معنی‌داری را در غلظت‌های ۲۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱/۳±۳۴/۹) و ۴۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۰/۹۴±۳۴/۷) نشان می‌دهد ($p < 0.001$).



شکل (۴): میانگین قد جنین‌های موردمطالعه در گروه‌های شاهد و شاهد آزمایشگاهی و ۴ گروه تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذره (** $p < 0.01$)

۵-۱. بررسی مورفولوژی رگ‌های خونی:

با توجه به تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، نمونه‌هایی که با AgNPs درمان می‌شدند، کاهش وابسته به دوز را نشان دادند که در شکل ۵ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است در گروه کنترل میزان رگ‌ها و قطر و اندازه رگ‌ها نسبت به نمونه‌های تیمار شده بیشتر می‌باشد. بطوریکه با افزایش غلظت ماده موردنظر از ۶۰ تا Mg/ml۴۸۰ تعداد رگ‌ها کاهش چشمگیری را در شکل‌ها نشان می‌دهد. بیشترین کاهش تعداد رگ‌ها در غلظت Mg/ml ۴۸۰ قابل‌مشاهده می‌باشد.



شکل (۵): بررسی مورفولوژی تغییر میزان رگ‌های خونی در تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت، میزان رگ‌ها کاهش‌یافته و قطر رگ‌ها نیز کاهش نشان می‌دهد، تعداد و طول رگ‌ها نیز کاهش یافته است.

بحث

بررسی‌های in vitro و ex vivo به ما کمک می‌کند تا پاسخ‌های اصلی سلول‌ها را بدون هیچ‌گونه تداخلی بررسی کنیم، درحالی‌که مدل‌های in vivo معتبر از پاسخ‌های بازدارنده و التهابی در فرایند رگ زایی استفاده می‌کنند. فیبروبلاست و سلول‌های اندوتلیال عناصر کلیدی در فرایند آنژیوژنز است که توسط آزمایش اصلاح‌شده CAM موردتوجه قرار گرفته است. مطالعات انجام‌شده نشان داده‌اند که نانو ذرات نقره اگر در غلظت مناسب مصرف شوند برای انسان مؤثر و بدون خطر و عوارض جانبی هستند (۱۹).

لذا در این بررسی اثرات ضد رگ زایی نانوذره نقره سنتز شده از ریشه گیاه انجبار بر روی پرده کوریوآلانتوییک جوجه مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد نانوذره موجب کاهش طول (شکل ۱) و تعداد (شکل ۲) عروق خونی شد. ازآنجاکه در طی فرایند رشد و نمو نیاز به رگ زایی به‌منظور تغذیه و اکسیژن‌رسانی به بافت می‌باشد لذا کاهش اندازه و وزن جنین نیز معقول به نظر می‌رسد. در این بررسی وزن جنین تغییر قابل‌توجهی را نسبت به کنترل نشان نداد (شکل ۳)، اما قد جنین در غلظت‌های ۲۴۰ و ۴۸۰ نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان داد (شکل ۴). مطالعات دیگر نیز اثرات ضد رگ زایی نانو ذرات نقره را در رگ زایی جنین جوجه نشان داده‌اند(۱۷، ۲۰).

در مطالعه حاضر، مرگ جنین‌های مرغ در مدل Invivo مشاهده شد. رگ‌های خونی منبع تغذیه و عرضه اکسیژن هستند، ازاین‌رو برای زندگی ضروری هستند و در طول روند رشد و توسعه نقش مهمی ایفا می‌کند. عروق کوچک در گروه‌های تیمار شده با نانو ذرات Ag ممکن است به دلیل کاهش عرضه مواد غذایی و اکسیژن مسئول مرگ جنین‌ها باشد. فرایند رگ زایی (Neovascularization) در بزرگ‌سالان نادر است و تنها در طی ترمیم زخم یا چرخه قاعدگی در زنان و یا در موارد دیگر در شرایط پاتولوژیک ظاهر می‌شود(۱۱).

تحقیقات نشان می‌دهد که نانو ذرات Ag نه‌تنها باعث مرگ جنین شدند بلکه اثرات دیگری همچون کاهش طول و تعداد رگ‌های خونی را در تخم‌مرغ‌های درمان شده سبب شدند که نشان‌دهنده کاهش آنژیوژنز می‌باشد. نانو ذرات طلا از دیگر مهارکننده‌های رگ زایی می‌باشند که با کاهش آنژیوژنز، مهار تکثیر، مهاجرت و ایجاد لوله و احتمالاً با مسدود کردن سیگنالینگ مرتبط با رگ زایی سبب کاهش رگ زایی می‌گردند (۲۱).

در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۰۹ انجام شد اثر ضد رگ زایی نانو ذرات سنتز شده نقره نشان داده شد. نتایج بررسی‌های مزبور نشان می‌دهد که نانوذره قادر است با مهار بیان ژن VEGF سبب کاهش رگ زایی گردد(۲۲).

در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۱۵ توسط khandia و همکاران صورت گرفت اثرات ضد رگ زایی نانوذره نقره سنتز شده از گیاه Azadirachta indica بر تعداد و طول رگ‌های پرده کوریوآلانتوییک جوجه نشان داده شد (۱۱).

Sheikpranbabu و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که نانو ذرات نقره‌ای سنتز شده توسط Bacillus licheniformis، نفوذپذیری سلول‌های اندوتلیال را تحت تأثیر قرار می‌دهند. نانو ذرات نقره به‌طور کامل نفوذپذیری سلول‌های اندوتلیال را مهار کردند و منجر به مهار آنژیوژنز ناشی از فاکتور رشد اندوتلیال عروق (VEGF)در سلول‌های اندوتلیالی شبکیه گاو شد(۲۱).

در بررسی دیگری در سال ۲۰۱۱ اثرات نانوذره نقره بر پرده کوریوآلانتوییک جوجه موردبررسی قرار گرفت و اثرات مهار رگ زایی نشان داده شد(۱۹).

با توجه به اثرات ضد آنژیوژنز نانو ذرات نقره موردمطالعه در این تحقیق ضرورت دارد جهت تعیین سهم نانوذره و تأثیر عصاره گیاه مطالعات تکمیلی صورت پذیرد.

نتیجه‌گیری

درنتیجه، خواص کاهش‌دهنده آنژیوژنز نانو ذرات نقره‌ای که در تحقیق حاضر در مدل جنین مرغ نشان داده شده است، در شرایط پاتولوژیک، آنژیوژنز پاتولوژیک و به‌ویژه برای درمان تومورهای جامد، در مواقعی که آنژیوژنز غیرطبیعی و بیش‌ازحد باعث رشد تومور شود، می‌تواند اثرات درمانی داشته باشد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق اثرات نانوذره نقره سنتز شده از ریشه گیاه انجبار به‌ویژه در دوزهای ۶۰mg/ml تا ۴۸۰mg/ml مورد تأیید قرار گرفته‌اند. لذا پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی در این زمینه انجام گردد تا از اثرات درمانی آن، مبتلایان به بیماری‌های مرتبط با رگ زایی ازجمله سرطان در آینده بهره‌مند گردند.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد خانم ریحانه شالی می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از کارکنان گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References:

1. Abdolmaleki Z, Arab H-A, Amanpour S, Muhammadnejad S. Anti-angiogenic effects of ethanolic extract of Artemisia sieberi compared to its active substance, artemisinin. Revista Brasileira de Farmacognosia 2016;26(3):326-33.
2. Krämer I, Lipp HP. Bevacizumab, a humanized anti-angiogenic monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. J Clin Pharm Ther 2007;32(1):1-14.
3. Jänne PA, von Pawel J, Cohen RB, Crino L, Butts CA, Olson SS, et al. Multicenter, randomized , phase II trial of CI-1033, an irreversible pan-ERBB inhibitor, for previously treated advanced non–small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2007;25(25):3936-44.
4. Sonpavde G, Hutson TE, Sternberg CN. Pazopanib, a potent orally administered small-molecule multitargeted tyrosine kinase inhibitor for renal cell carcinoma. Expert Opin Investig Drugs 2008;17(2):253-61.
5. Cao Y, Arbiser J, D'Amato RJ, D'Amore PA, Ingber DE, Kerbel R, et al. Forty-year journey of angiogenesis translational research. Sci Transl Med 2011;3(114):114rv3–114rv3.
6. Joy A, Appavoo M, Mohesh M. Antiangiogenic activity of Strychnos nux vomica leaf extract on chick chorioallantoic membrane model. J Chem Parm Res 2016;8:549-52.

7. Jahan D, Begum W, Roqaiya M. Review on Beekhe Anjbar (root of Polygonum bistorta L.) with unani perspective and modern pharmacology. World J Pharm Sci 2015;4(7):314-23.
8. Mroczek-Sosnowska N, Sawosz E, Vadalasetty KP, Łukasiewicz M, Niemiec J, Wierzbicki M, et al. Nanoparticles of copper stimulate angiogenesis at systemic and molecular level. Int J Mol Sci 2015;16(3):4838-49.
9. Arvizo RR, Rana S, Miranda OR, Bhattacharya R, Rotello VM, Mukherjee P. Mechanism of anti-angiogenic property of gold nanoparticles: role of nanoparticle size and surface charge. Nanomedicine 2011;7(5):580–7.
10. Schmieder A, Pan D, Senpan A, Caruthers S, Wickline S, Lanza G, et al. A nanoparticle based therapy to target bronchial angiogenesis. Am J Respir Crit Care Med 2013;187:A5919.
11. Khandia R, Munjal A, Bangrey R, Mehra R, Dhama K, Sharma N. Evaluation of silver nanoparticle mediated reduction of neovascularisation (angiogenesis) in chicken model. Adv Anim Vet Sci 2015;3(7):372-6.
12. Banerjee P, Satapathy M, Mukhopahayay A, Das P. Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. Bioresour Bioprocess 2014;1(1):3.
13. Okafor F, Janen A, Kukhtareva T, Edwards V, Curley M. Green synthesis of silver nanoparticles, their characterization, application and antibacterial activity. Int J Environ Res Public Health 2013;10(10):5221-38.
14. Nithya R, Ragunathan R. Synthesis of silver nanoparticles using a probiotic microbe and its antibacterial effect against multidrug resistant bacteria. Afr J Biotechnol 2012;11(49):11013-21.
15. Shukla VK, Pandey S, Pandey AC, editors. Green synthesis of silver nanoparticles using neem leaf (Azadirachta indica) extract. AIP Conference Proceedings; 2010: AIP.
16. Namvar F, Azizi S, Mohamad R, Moghaddam AB , Soltani M, Moshfegh F. Nanosized silver–palm pollen nanocomposite, green synthesis, characterization and antimicrobial activity. Res Chem Intermed 2016;42(3):1571-81.
17. 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 (Basel, Switzerland). 2014;19(9):13498-508.
18. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo assay to study antiangiogenesis. Pharmaceuticals 2010;3(3):482-513.
19. Will SEA, Favaron PO, Pavez MA, Florentino LC, Soares D, Oliveira FC, et al. Bactericidal silver nanoparticles present an antiangiogenic effect in the Chorioallantoic Membrane Model (CAM). Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances 2011;1:219–27.
20. 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. Toxicol Lett 2011;205(3):227–34..
21. Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, BarathManiKanth S, Haribalaganesh R, Ramkumarpandian S, Gurunathan S. Gold nanoparticles inhibit vascular endothelial growth

22. Gurunathan S, Lee K-J, Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, Vaidyanathan R, Eom SH. Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. Biomaterials 2009;30(31):6341-50.

factor-induced angiogenesis and vascular permeability via Src dependent pathway in retinal endothelial cells. Angiogenesis 2011;14(1):29–45.

Original Article

QUANTITATIVE ASSESSMENT AND MORPHOMETRIC INVESTIGATION OF ANTI-ANGIOGENIC PROPERTIES OF SILVER NANOPARTICLES SYNTHESIZED USING PERSICARIA BISTORTA EXTRACTS ON CHICK CHORIOALLANTOIC MEMBRANE

Reyhaneh Shali[1], Ali Neamati[2]*, Pouran Ardalan[3]

Received: 02 Feb, 2018; Accepted: 29 Apr, 2018

Abstract

Background & Aims: Angiogenesis is a key event during tumor growth. Since tumor cells require more oxygen and glucose than normal cells and due to tumors quick growth, new blood vessels rapidly increase to meet the nutritional requirements. Hence, targeting and inhibiting the formation of new blood vessels can reduce the nutrition and access of tumor cells to oxygen, which also inhibits tumor growth**.** In the present study, the effects of coated silver nanoparticles with *Persicaria bistorta* on chick embryo *chorioallantoic* membrane and its antioxidant properties have been investigated.

***Materials & Methods*:** The fertilized Ross eggs were distributed randomly and equally into 6 groups. Two groups were considered as control and laboratory control (treated with solvent). In the second day of incubation, a window was created on the eggs, and then in the 8th day after incubation, samples were exposed with various doses (60, 120, 240, 480 µg/ml) of the Ag-NPs. On the 12th day, photographs were taken and the length and number of vessels were measured using Image J software. The length and weight of embryos were measured and compared. The data were analyzed by SPSS software and one way ANOVA at the significance level of $p < 0.05$.

***Results*:** Based on the results, the silver nanoparticles at a concentration of 60 µg / ml reduced the length and number of blood vessels significantly ($P<0.001$) compared with the control group. The results of the study on the effect of nanoparticles on the weight of the embryos did not significantly change compared with the control but, the height of the embryos showed a significant decrease in the treated groups at a concentration of 240 µg / ml nanoparticles ($P<0.01$).

***Conclusion*:** Accordingly, the use of silver nanoparticles can be considered as a potential treatment against pathological angiogenesis and solid tumors targeting blood vessels.

***Keywords*:** Angiogenesis, Silver nanoparticles, Chicken Chorioallantoic membrane, *Persicaria bistorta*

Address: Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
Tel: (+98) 051 38435050
Email: neamati.ali@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2018: 29(3): 2016 ISSN: 1027-3727

[1] *Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran*
[2] *Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Department of Chemistry, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran*