بررسی خصوصیات سمیت و ضد رگزایی نانو ذرات نقره سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره آبی گرده گیاه کلزا

سحر حاجبی[۱]، مسعود همایونی تبریزی*[۲]، محبوبه نخعی مقدم[۳]

تاریخ دریافت ۱۳۹۷/۱۱/۱۹ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۰۳/۰۶

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: در این مطالعه از عصاره گرده گیاه کلزا برای سنتز نانوذره نقره به روش سبز استفاده شد و مهار رگزایی و سمیت سلولی آن موردسنجش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: سنجش سمیت سلولی توسط روش MTT بر سلول‌های نرمال رده Huvec و سلول‌های سرطان کبد رده HepG2 و سلول‌های سرطان کولون رده HT-29 با طراحی یک مطالعه آزمایشگاهی (test-tub Lab) انجام شد. همچنین ارزیابی آنژیوژنز توسط روش CAM بر روی تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار موردمطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج سنجش سمیت نانوذره نقره سنتز شده نشان می‌دهد این نانوذره در غلظت‌های بسیار پایین به‌صورت معنی‌داری توانایی مهار سلول‌های سرطانی کبد و کولون را دارد ($p \leq ۰/۰۰۱$). در ۲۴ ساعت IC_{50} سلول‌های سرطانی کبد و کولون به ترتیب حدود ۰/۳ و ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. این غلظت از نانوذره روی سلول‌های نرمال اثر کشندگی ندارد IC_{50} آن ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. نتایج تست CAM نشان داد که نانوذره در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث کاهش قابل‌توجهی در میانگین تعداد عروق، انشعابات عروق، کاهش میزان قد و وزن جنین‌ها در قیاس با جنین‌های شاهد می‌شود ($p \leq ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نانو ذرات در غلظت‌های پایین سلول‌های سرطانی کبد و کولون را مهار می‌نماید. همین موضوع بیان می‌کند این نانوذره گزینه‌ای مناسب برای مهار کردن سلول‌های سرطانی باشد. این نانوذره دارای توانایی‌های زیادی در رابطه با مهار رگزایی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنژیوژنز، نانو ذرات نقره، پرده‌ی کوریوآلانتوئیک

مجله پزشکی ارومیه، دوره سی‌ام، شماره چهارم، ص ۲۸۰-۲۶۸، تیر ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: مشهد، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، تلفن: ۰۹۱۵۴۵۰۵۸۹۴

Email: mhomayouni6@gmail.com

مقدمه

رگزایی فرآیندی است که به‌وسیله رشد و افزایش تکامل رگ‌های خونی جدید اتفاق می‌افتد که این فرآیند از طریق جوانه زدن سلول‌های اندوتلیال عروق به انجام می‌رسد. در دوران مراحل جنینی هر دو فرآیندهای رشد و تکامل در تشکیل رگ‌های خونی دخیل هستند. رگزایی در شرایط طبیعی و نرمال عبارت است از تشکیل رگ‌های خونی از عروقی که از قبل وجود داشته که در شرایط تنظیم‌شده این عمل صورت می‌گیرد و تشکیل این رگزایی به‌صورت نرمال و طبیعی باعث ایجاد چند واکنش فیزیولوژی ازجمله زخم، رشد جنین و تشکیل جفت می‌شود(۱). در بسیاری از بیماری‌ها ازجمله سرطان، سلول‌هایی که دچار بیماری شده‌اند مقدار زیادی فاکتورهای رگزایی مثل VEGF وFGF-2 و همچنین فاکتورهای رشد هپاتوسیت تولید می‌کنند که این فرآیند، فرآیندی کاملاً غیرطبیعی می‌باشد. درنتیجه این عمل‌های غیرطبیعی آنژیوژنز رخ می‌دهد(۲). تومورها و غدد سرطانی که به دودسته تومورهای سفت (سرطان مثانه، مغز، سینه و ....) و تومورهای نرم و شل (افزایش تراکم مغز استخوان) طبقه‌بندی می‌شود. این تومورها و غدد سرطانی برای رشد و متاستاز وابسته به آنژیوژنز می‌باشد(۳).

[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 زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

سلول‌های سرطانی و همچنین غدد سرطانی با استفاده از رگزایی و تشکیل عروق خونی جدید می‌توانند با عمل متاستاز به دیگر مناطق نیز گسترش یافته و به سایر نقاط انتقال پیدا کنند. رگزایی می‌تواند باعث گسترش یا به عبارتی متاستاز تومورها را شدت بخشد و همچنین رگزایی در بیماری‌هایی ازجمله بیماری‌هایی که اکسیژن رگ‌ها را کاهش می‌دهد دخیل باشد. تحقیقات و مطالعات نشان می‌دهد که برای رشد و متاستاز یا به عبارتی گسترش تومورها نیاز به ایجاد رگ‌های جدید دارد. در گذشته تصور بر این بود که سلول‌های سرطانی از خود موادی را مترشح می‌کنند که باعث گشادشدن رگ‌ها می‌شود به این صورت مواد غذایی به تومورها می‌رسد. ولی امروزه این‌گونه بیان می‌شود که این موادی که ترشح می‌شود از سلول‌های سرطانی باعث جوانه زدن رگ‌ها می‌شود و ایجاد رگزایی می‌کند(۴). تحقیقات انجام‌گرفته توسط دانشمندان نشان می‌دهد که نانو ذرات، ذرات جامد کلوئیدی هستند که اندازه‌ی آن‌ها بین ۱ تا ۱۱۱ نانومتر می‌باشد. در این میان نانو ذرات نقره به علت دارا بودن خاصیت ضد باکتریایی دارای کاربردهای وسیعی می‌باشند. نانو ذرات نقره به علت انواع کاربردهای خواص فیزیکی و سیستم زنده دارای سایزها و اشکال متفاوتی می‌باشند. نانو ذرات نقره در صورت مصرف در بیوسنسورها به‌منظور شناسایی و درمان بیماری‌هایی مانند سرطان نیز بسیار حائز اهمیت می‌باشند. تحقیقات صورت گرفته نشان‌دهنده‌ی این است که ۵۶درصد از کل نانو ذرات دنیا به نانو ذرات نقره اختصاص یافته است(۵). نانوذره‌ی نقره در مقابل با حرارت مقاوم می‌باشد و از پایداری زیادی برخوردار می‌باشد. نانوذره‌ی نقره با استفاده از روش‌های متفاوتی نظیر روش‌های شیمیایی، روش‌های فیزیکی و روش‌های بیولوژیکی (از طریق قارچ‌ها و باکتری‌ها) سنتز و ساخته می‌شود(۶). تحقیقات صورت گرفته بیان می‌کند که گیاه کلزا جزء گیاهان گلدار نمی‌باشد و در راسته‌ی کلم‌سانان و در تیره‌ی شب‌بویان و در سرده‌ی کلم‌ها قرار گرفته است. کلزا جزء گیاهان دانه روغنی مهم در مناطق معتدله محسوب می‌شود و دارای طیف نسبتاً وسیعی از سازگاری اقلیمی این گیاه است. دانه‌ی کلزا دارای ۲۵ تا ۵۵درصد روغن ، ۱۸ تا ۲۴درصد پروتئین و ۱۲ تا ۲۰درصد پوست است. کلزا که امروزه کانولا نام گرفته است و از مقدار کمتری اروسیک اسید و گلوکوزینولات برخوردار می‌باشد و چون دارای محتوای کمتر مواد ضد تغذیه‌ای برای مصرف انسان و تک معده‌ای‌ها نسبت به رقم غیر اصلاح شده یا همان کلزا مناسب‌تر است(۷). هدف از مطالعه حاضر سنتز سبز نانو ذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره آبی گرده گیاه کلزا ، بررسی اثرات سمیت و ضد سرطانی آن‌ها روی رده‌های سلولی سرطانی کولون و کبد انسان در مقایسه با رده‌های نرمال سلولی و شناسایی خواص ضد رگزایی نانو ذرات بر پرده‌ی کوریوآلانتوئیک جوجه بوده است.

مواد و روش کار

تست MTT:

با طراحی یک مطالعه آزمایشگاهی (test-tub Lab) تست MTT دو لاین سلول سرطانی شامل:HepG2(سلول سرطانی کبد)، HT-29 (سلول سرطانی کولون) و یک لاین سلول نرمال HUVC (بند ناف جنین انسان) انجام شد. رده‌های سلولی از پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد و همچنین از محیط کشت RPMI و DMEM، سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰ درصد برای کشت سلول بهره گرفته شد.

بررسی زیستایی سلولی:

برای بررسی میزان سمیت نانو ذرات نقره از آزمون MTT (-3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)استفاده شد. این آزمون سمیت القاء شده بر روی سلول‌های سرطانی را مشخص می‌کند و همچنین توان حیاتی سلول‌ها و میزان بقاء آن‌ها را تعیین می‌کند. روش انجام این آزمایش به این‌گونه است که در مرحله‌ی اول پلیت ۹۶ خانه‌ای درون هر یک از چاهک‌های آن به میزان ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مربوطه را اضافه می‌نماییم و سپس از سلول مورد نظر که درون فلاسک می‌باشد سوسپانسیون سلولی را تهیه می‌کنیم و از این سوسپانسیون سلولی به میزان ۱۰ ماکرولیتر درون هر چاهک سید می‌کنیم و بعد از اتمام کار پلیت را به انکوباتور انتقال می‌دهیم. بعد از گذشت ۲۴ ساعت پلیت را از انکوباتور خارج نموده به زیر هود انتقال می‌دهیم تمامی محیط کشت‌ها را به آرامی تخلیه می‌نماییم که این عمل را به دقت انجام می‌دهیم تا سلول‌ها کنده نشود و مجدد درون هریک از چاهک‌ها را از محیط کشت پر می‌کنیم و سپس از غلظت‌های مختلف نانوذره‌ی نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره‌ی آبی گرده‌ی گیاه کلزا به سلول‌ها تیمار می‌کنیم که تمامی این مراحل را در سه پلیت جداگانه به انجام رسانیم برای مدت زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت که در این مدت زمان‌ها انکوبه شد موردسنجش و بررسی قرار می‌دهیم. به طور نمونه بعد از پایان زمان ۲۴ ساعت از گذشت مرحله‌ی تیمار پلیت را از درون انکوباتور خارج می‌کنیم تمامی محتویات درون چاهک‌ها را به آرامی تخلیه می‌کنیم تا به سلول‌ها صدمه‌ای وارد نشود و بعد از اتمام این کار به میزان ۱۵ میکرو لیتر از محلول MTT به درون هر یک از چاهک‌ها اضافه کردیم و مجدد پلیت را به درون انکوباتور قرار دادیم در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت زمان ۴ ساعت که در ادامه بعد از پایان یافتن زمان مورد نظر پلیت را از انکوباتور خارج تمامی محتویات MTT را از درون چاهک‌ها خارج کرده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر

به درون چاهک‌ها DMSO اضافه شد در این مرحله میزان رنگ ایجاد شده را با استفاده از دستگاه الایزا پلیت ریدر که در طول موج ۵۷۰ نانو متر تنظیم شده است ارزیابی شد. اساس و پایه‌ی این آزمایش بر این مبنا است که سلول‌های زنده، بلورهای تترازولیوم به‌وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی احیا می‌شود و سبب می‌شود کریستال‌های فورمازان ایجاد گردد. این کریستال‌های آبی رنگ تنها دارای توانایی حل شدن در حلال‌های آلی مثل ایزوپروپانول و DMSO را دارا می‌باشند. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب نوری خوانده می‌شود و تعداد سلول‌های زنده که دارای فعالیت آنزیمی سوکسینات دهیدروژناز هستند، تعیین می‌شود.

تست CAM:

برای انجام این تست ۶۰ عدد تخم مرغ که نطفه‌دار هستند و از نژاد ROSS می‌باشند از شرکتی به نام مرغداران توس مشهد خریداری کردیم و آن‌ها را به ۶ گروه که در هر گروه ۱۰ عدد تخم مرغ وجود داشت تقسیم نمودیم که از این ۶ گروه، ۲ گروه شامل شاهد و شاهد آزمایشگاهی نام گذاری کردیم و ۴ گروه دیگر تیمار شده در غلظت‌های مختلف محلول بودند. بعد از مرحله‌ی خریداری کردن تخم مرغ‌ها کاملاً همه‌ی تخم‌ها را با پنبه و الکل ۹۶درصد ضدعفونی کردیم و آن‌ها را درون دستگاه انکوباسیون که دارای دمای ۳۷/۶ درجه سانتی گراد و رطوبت ۷۰ تنظیم شده بود قرار داده‌ایم به مدت ۴۸ ساعت و چرخش خودکار دستگاه را نیز فعال نمودیم. بعد از گذشت ۴۸ ساعت تمامی تخم مرغ‌ها را در روی آن‌ها پنجره‌ای باز نمودیم با استفاده از سوراخی که در اتاقک هوای آن ایجاد کردیم. سپس بر روی پنجره‌ی باز شده بر روی سطح تخم مرغ چسب مخصوص را قرار دادیم و دورتادور آن را با استفاده از پارافین دارای دمای متعادل مسدود نمودیم که هیچگونه آلودگی به آن منتقل نشود. سپس تخم مرغ‌ها را به درون دستگاه انکوباسیون مخصوص خود انتقال دادیم و چرخش خودکار دستگاه را نیز خاموش می‌نماییم. پس از گذشت ۸ روز تمامی تخم مرغ‌ها را از دستگاه انکوباسیون خارج می‌نماییم و آن‌ها را به زیر هود انتقال می‌دهیم چسب و پارافین روی پوسته تخم‌ها را برمیداریم سپس اسفنج حاضر شده که به‌منظور مشخص شدن محل تیمار ما می‌شود را به درون تخم مرغ از پنجره‌ی آن انتقال می‌دهیم و از محلول تیمار خود به میزان ۱۰ میکرولیتر از هر غلظت بر روی اسفنج داخل تخم مرغ تلقیح می‌نماییم. بعد از اتمام تیمار تمامی تخم مرغ‌ها را مجدداً روی پنجره‌ی باز شده را با چسب مخصوص و پارافین که با دمای متعادل آماده سازی شده است را می‌پوشانیم و تخم‌ها را به درون دستگاه انکوباسیون مخصوص خود قرار می‌دهیم. در روز ۱۲ تخم‌ها حاضر هستند جهت بررسی تغییراتی که به‌منظور رگزایی موردمطالعه قرار گرفته بود. به این صورت که چسب و پارافین از روی پوسته‌ی تخم‌ها برداشته شد و سوراخ پنجره‌ی باز شده گشادتر می‌شود و با استفاده از عکس برداری از ناحیه اسفنجی که دارای ماده تیمار است مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز و بررسی فاکتورهای کمی:

برای اندازه گیری طول و تعداد عروق خونی، ابتدا نمونه‌ها را در زیر استرئومیکروسکوپ قرار دادیم و سپس عکس‌هایی از ناحیه‌ای که تیمار را انجام دادیم گرفتیم و در ادامه عکس‌ها را توسط نرم افزار Image J برای شمارش و اندازه گیری تعداد و طول عروق خونی بررسی کردیم.

آنالیز و بررسی ویژگی‌های مورفومتریک:

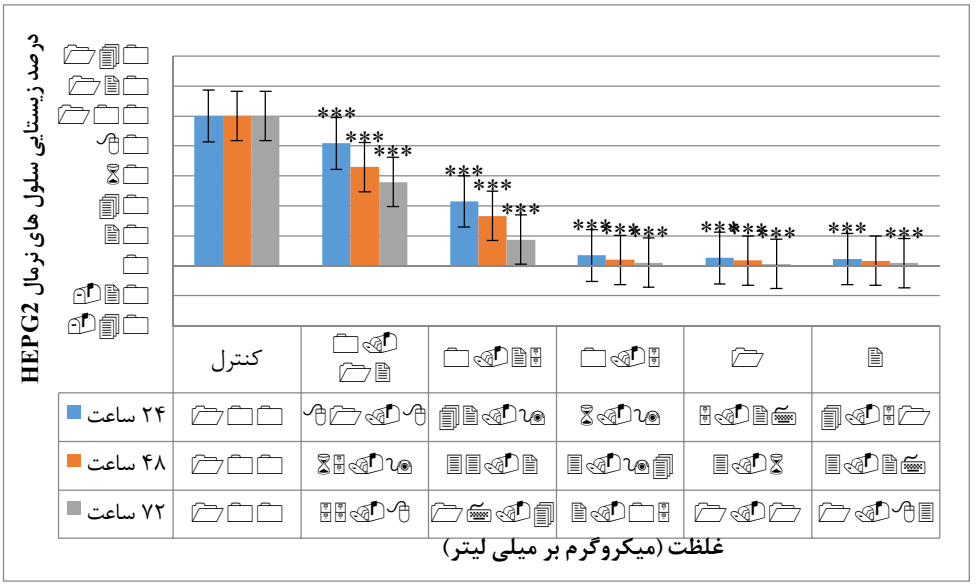
میزان خون رسانی در جنین می‌تواند بر روی فاکتورهایی ازجمله وزن جنین و قد جنین تأثیر داشته باشد به همین دلیل در این تحقیق قد جنین جوجه که منظور از فرق سر تا نشیمنگاه جنین می‌باشد را توسط کولیس اندازه گیری کردیم و سپس وزن جنین را با استفاده از ترازو با دقت ۰/۰۰۱ ثبت کردیم.

تحلیل آماری: داده‌هایی را که به دست آوردیم را در نرم افزار Image J قرار دادیم و نتایج حاصل از آن را که مربوط به قد و وزن جنین‌های جوجه را توسط نرم افزار SPSS و تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه و با بهره گیری از آزمون LSD تجزیه و تحلیل گردید و میانگین ±انحراف معیار را بیان کردیم. در این تحقیق انجام گرفته میزان معناداری به‌صورت $p < ۰/۰۰۱$، $P < ۰/۰۱$، $p<۰/۰۵$ مشخص کردیم.

یافته‌ها

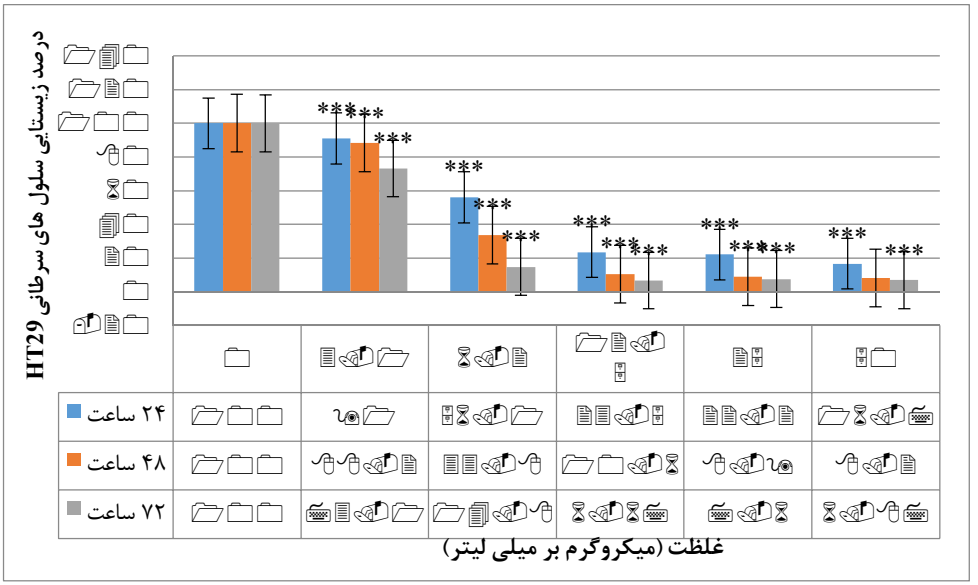
بررسی میزان سمیت نانوذره بر سلول‌های HepG2، HT-29 وHUVC :

آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد که نانوذره نقره اثر مهاری بر روی سلول‌های سرطانی کبد انسانی داشته است و آن توانایی را دارد که این سلول‌ها را در غلظت‌های متفاوت مهار نماید. نتیجه‌های به دست آمده نشان می‌دهد که میزان مهار نانوذره بر روی سلول‌های سرطانی بستگی به غلظت نانوذره تیمار شده بر روی سلول‌ها دارد. به این صورت می‌باشد که با افزایش پیدا کردن غلظت نانوذره زیستایی سلول‌ها کاهش پیدا می‌کند و در مقابل آن سمیت نانوذره افزایش می‌یابد. در ۲۴ ساعت بعد از تیمار نانوذره (۰/۱۵) میکروگرم بر میلی‌لیتر غلظتی می‌باشد که در این غلظت حدوداً ۵۰درصد سلول‌ها کشته شده‌اند. بررسی میزان سمیت نانوذره بر سلول‌های HepG2 بیان می‌کند که نانوذره نقره اثر مهاری زیادی بر روی سلول‌ها دارد و همچنین این توانایی را دارد که رشد سلول‌ها را در غلظت‌های پایین مهار کند.



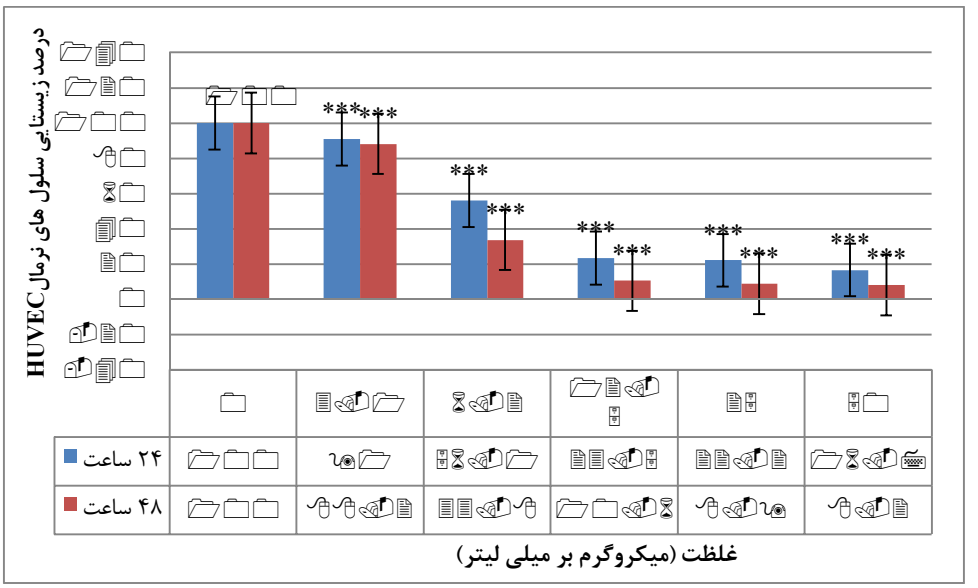
نمودار (۱): بررسی درصد زیستایی سلول‌های سرطان کبد انسانی در تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره در زمان‌های متفاوت که نشان‌دهنده‌ی اثر سمیت بالا نانوذره سنتز شده بر سلول‌ها می‌باشد (p ≤ ۰/۰۰۱ = ***).

نمودار ۲ اثر سمیت نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره آبی گرده گیاه کلزا را بر روی سلول‌های سرطانی کولون نشان می‌دهد. همانطوری که نمودار نشان می‌دهد این نانوذره توانایی آن را دارد که در غلظت‌های متفاوتی سلول‌های سرطانی کولون را مهار نماید. نتیجه‌های به دست آمده بیانگر آن است که میزان مهار نانوذره بر روی سلول‌های سرطانی بستگی به غلظت نانوذره تیمار شده بر روی سلول‌ها دارد به این صورت که با افزایش غلظت نانوذره زیستایی سلول‌ها کاهش یافته است. IC_{50} غلظتی که در این غلظت حدود ۵۰درصد سلول‌ها مردند ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. بررسی میزان سمیت نانوذره بر سلول‌های HT-29 بیان می‌کند که نانوذره نقره اثر مهاری زیادی بر روی سلول‌ها دارد و همچنین این توانایی را دارد که رشد سلول‌ها را در غلظت‌های پایین مهار کند.



نمودار (۲): بررسی درصد زیستایی سلول‌های سرطان کولون انسانی (HT-29) در تیمار با غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (p ≤ ۰/۰۰۱ = ***).

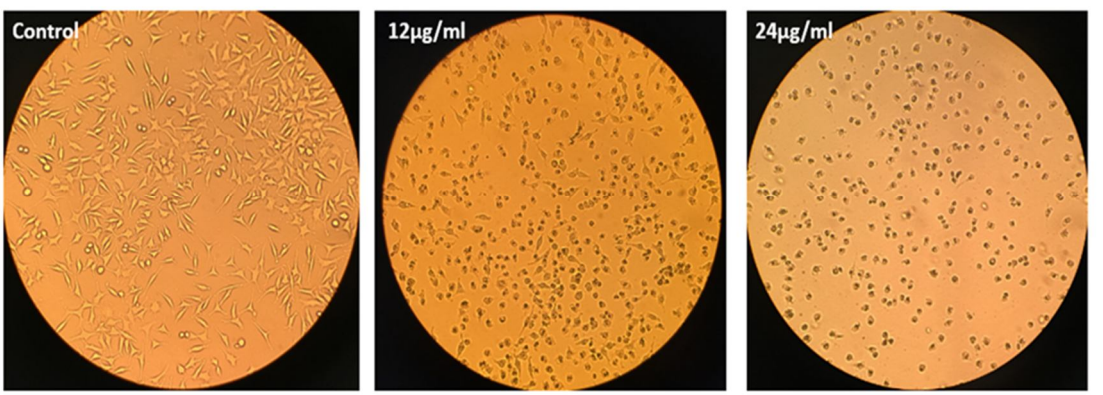
نمودار ۳ اثر سمیت نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره آبی گرده گیاه کلزا را بر روی سلول‌های نرمال بند ناف جنین انسان نشان می‌دهد. همان گونه‌ای که نمودارها نشان می‌دهند سلول‌های نرمال در مقایسه با سلول‌های سرطانی در تیمار نانوذره مقاوم هستند و همچنین زیستایی بیشتری را نشان می‌دهند. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره آبی گرده گیاه کلزا سلول‌های سرطانی را نسبت به سلول‌های نرمال در غلظت پایین‌تر و همچنین توان قدرتی بیشتر مهار می‌نماید که وجود همین موضوع باعث می‌شود این نانوذره برای درمان سرطان مناسب‌تر و کارآمدتر باشد.



نمودار (۳): بررسی درصد زیستایی سلول‌های نرمال انسانی ((HUVEC در تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذره (p- ≤۰/۰۰۱ = ***).

بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌های تیمار شده با نانوذره:

تأثیر سمیت نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره آبی گرده گیاه کلزا باعث ایجاد تغییراتی در مورفولوژی سلول‌ها می‌شود. همانگونه ای که در تصاویر زیر مشاهده می‌شود سلول‌هایی که بر روی آن‌ها تیمار صورت نگرفته است مورفولوژی به‌صورت دوکی شکل و در ابعاد یکسان می‌باشند تمامی سلول‌ها و همچنین سلول‌ها دارای هسته مشخص می‌باشند ولی مورفولوژی سلول‌هایی که بر روی آن‌ها تیمار صورت گرفته است با افزایش پیدا کردن غلظت نانوذره سایز سلول‌ها کاهش پیدا کرده است و شکل آن‌ها تغییر پیدا کرده و همچنین سلول‌ها به‌صورت چین خورده و جوانه زدن سیتوپلاسم ظاهر می‌شوند که تمامی این نتیجه‌ها نشان‌دهنده‌ی آن است که نانوذره نقره اثر سمیت آن بر روی سلول‌های سرطانی اعمال شده است.



شکل (۴): بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های سرطانی تیمار شده با غلظت‌های متفاوتی از نانوذره در مقایسه با گروه کنترل

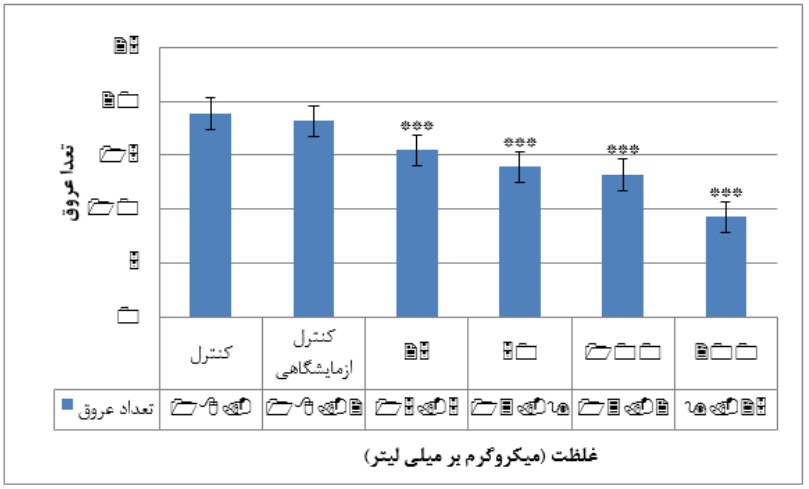
بررسی زیستایی جنین‌ها:

بعد از باز کردن چسب و پارافین قسمت پنجره‌ی باز شده را گسترش می‌دهیم و پوسته‌ی تخم مرغ‌ها را برداشته مشاهده می‌کنیم در گروه کنترل که تمامی جنین‌های جوجه زنده هستند و در درون تخم دارای حرکت می‌باشند و این زنده بودن و حرکت جنین‌ها تا ۱ ساعت ادامه دارد و زنده می‌مانند. مشاهده می‌شود که سیستم عروقی آنها توسعه پیدا کرده و کل رگ‌های درون تخم‌ها از خون پر شده هستند و تمامی این رگ‌ها رنگ قرمز داشتند. در تخم‌مرغ‌هایی که تحت درمان با نانوذره‌ی مشخص شده بودند (نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره آبی گرده‌ی گیاه کلزا) بعضی از جنین‌های جوجه مرده بودند و یا نیمه جان بودند به طور مثال نسبت به محرک‌هایی مانند لمس کردن پاسخی نشان نمی‌دادند و در این تخم‌ها مشاهده کردیم که عروق خونی یا همان رگ‌ها تعدادشان بسیار کم می‌باشد و طول رگ‌ها کوتاه‌تر می‌باشد.

تغییر تعداد رگ‌های خونی در تیمار با نانوذره:

یکی از گزینه‌هایی که تحت تأثیر درمان با نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره‌ی آبی گرده‌ی گیاه کلزا بر روی جنین‌های جوجه مشخص می‌شود تعداد رگ‌های خونی می‌باشد که در این مرحله اثرهای مهارکننده و یا القاء کننده‌ی ماده مورد نظر سنتز شده را بر رگزایی مشخص می‌کند. نتایج حاصل از بررسی تعداد رگ‌های خونی تفاوت معناداری را در میان گروه‌های کنترل و کنترل آزمایشگاهی نشان نداد. همانطور که نتایج نشان می‌دهد تعداد رگ‌های خونی در گروه‌های تیمار شده با غلظت ۲۵(۱۵.۴۵±۱.۳)، ۵۰(۱۳.۹±۲.۳)، ۱۰۰(۱۳.۲±۱.۱) و ۲۰۰(۹.۲۵±۱.۳) میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری را نشان می‌دهد.

آزمایش انجام شده مشخص کرد که که اثر نانوذره‌ی مشخص شده با غلظت (۲۰۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی تخم مرغ‌ها می‌تواند تعداد رگ‌های خونی را به میزان معناداری نسبت به مقایسه‌ی نمونه‌ی کنترل کاهش دهد. که می‌توان نتیجه گرفت که در این غلظت از نانوذره‌ی مورد نظر اثرهای ضد رگزایی وجود دارد. و همچنین در این آزمایش مشخص شد که تعداد رگ‌های خونی در گروه‌های کنترل (۱۸.۸۵±۱.۲) و کنترل آزمایشگاهی (۱۸.۲± ۰.۹) تغییر قابل‌توجهی پیدا نکرده است پس می‌توان این چنین بیان کرد که حضور نورمال سلین و اسفنجی که در این دو گروه استفاده کرده‌ایم نقشی در مهار کردن رگزایی ندارد.

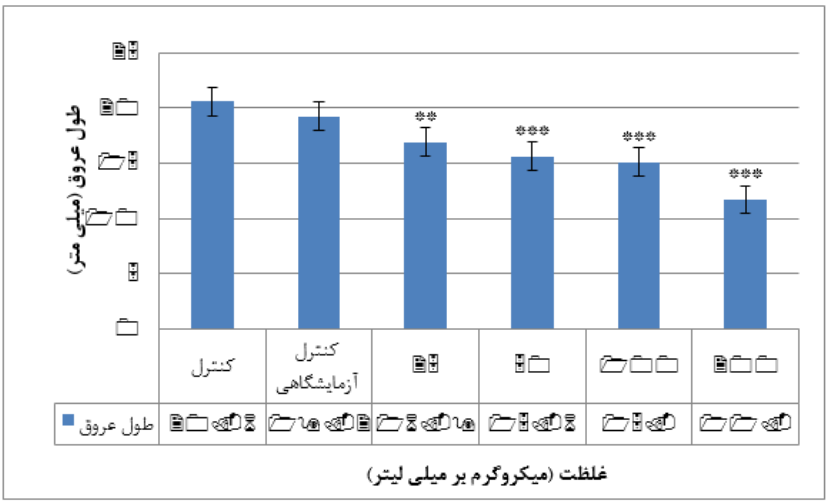


شکل (۵): میانگین تعداد رگ‌های خونی که تیمار شده‌اند با نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره آبی گرده گیاه کلزا در مقایسه‌ی گروه کنترل و کنتر آزمایشگاهی (۰/۰۰۱≥ p = ***).

تغییر طول رگ‌های خونی در تیمار با نانوذره:

دیگر گزینه‌ای که تحت تأثیر درمان با نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره‌ی آبی گرده گیاه کلزا قرار می‌گیرد طول رگ‌ها می‌باشد و اثرهای مهارکننده و یا القا کننده‌ی ماده‌ی مورد نظر بر رگزایی را مشخص می‌کند. نتایج حاصل از بررسی طول رگ‌ها تفاوت معنی‌داری را در بین نمونه‌ی کنترل و کنترل آزمایشگاهی نشان نداد. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد طول رگ‌ها در گروه‌های تیمار شده با نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره‌ی آبی گرده‌ی گیاه کلزا با غلظت‌های ۲۵(۱۶.۸۹±۱.۳)، ۵۰(۱۵.۶±۲.۱)، ۱۰۰(۱۵.۱۳±۱.۲) و ۲۰۰(۱۱.۷۱±۱.۳) میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه گروه کنترل (۲۰.۶±۲.۲) نیز تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد.

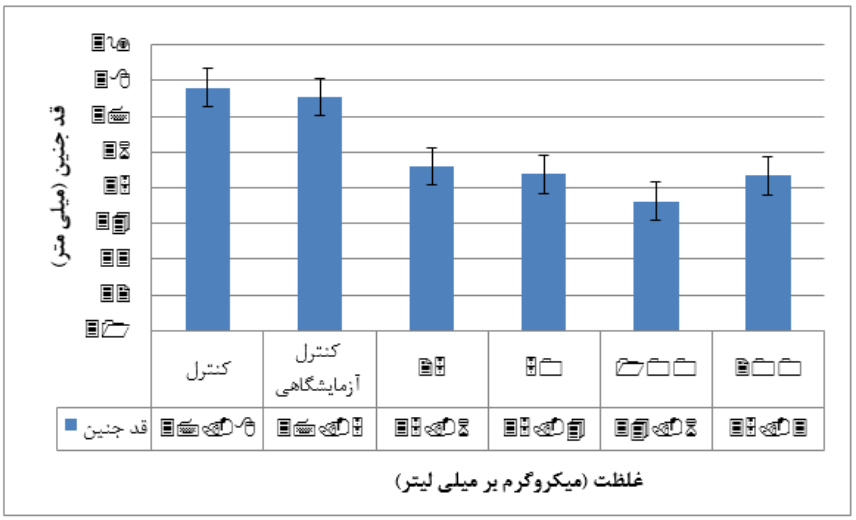
آزمایش انجام شده مشخص کرد که که اثر نانوذره‌ی مشخص شده با غلظت ۲۰۰ (۱۱.۷۱±۱.۳) میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی تخم مرغ‌ها می‌تواند طول رگ‌های خونی را به میزان معناداری نسبت به مقایسه‌ی نمونه‌ی کنترل کاهش دهد. که می‌توان نتیجه گرفت که در این غلظت از نانوذره‌ی مورد نظر اثرهای ضد رگزایی وجود دارد. و همچنین در این آزمایش مشخص شد که طول رگ‌های خونی در گروه‌های کنترل (۲۰.۶±۲.۲) و کنترل آزمایشگاهی (۱.۶±۱۹.۲۳) تغییر قابل‌توجهی پیدا نکرده است پس می‌توان این چنین بیان کرد که حضور نرمال سلین و اسفنجی که در این دو گروه استفاده کرده‌ایم نقشی در مهار کردن رگزایی ندارد.



شکل (۶): میانگین طول رگ‌های خونی که تیمار شده‌اند با نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره آبی گرده گیاه کلزا در مقایسه‌ی گروه شاهدی که تیمار روی آنها انجام نگرفته است ((*** = p ≤۰/۰۰۱) (** = p ≤۰/۰۱).

اثر تیمار با نانوذره بر قد جنین‌های تیمار شده در قیاس با گروه کنترل:

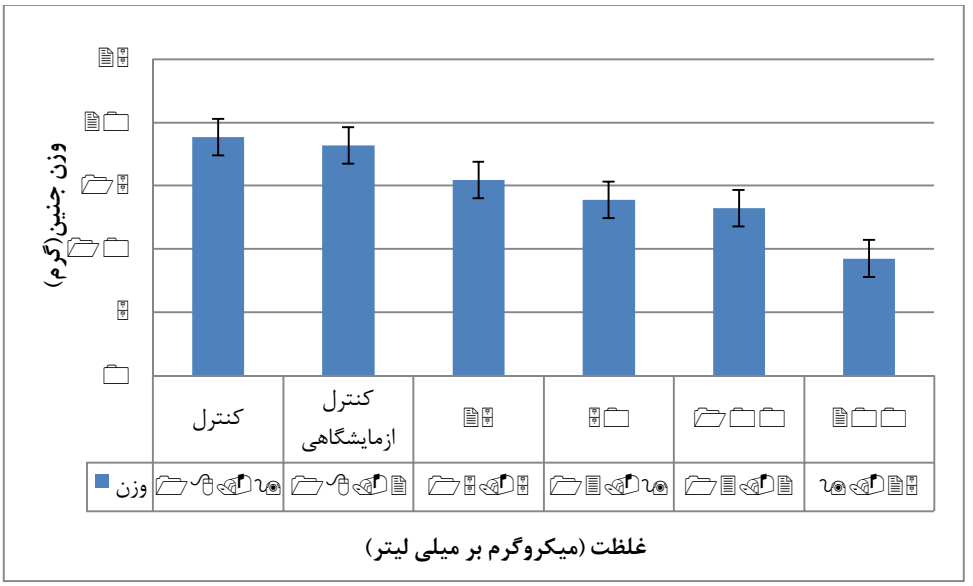
نتایج حاصل از بررسی طول جنین‌ها (فاصله فرق سر تا نشیمنگاه)، تفاوت معنی‌داری را بین نمونه‌های کنترل (۱.۷±۳۷.۸) و کنترل آزمایشگاهی (۴.۸±۳۷.۵) نشان نداد. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد قد جنین‌ها در گروههای تیمار شده با غلظت‌های ۲۵ (۱.۴±۳۵.۶)، ۵۰ (۰.۷±۳۵.۳)، ۱۰۰ (۱.۴±۳۴.۶) و میکروگرم بر میلی‌لیتر ۲۰۰(۱.۹±۳۵.۳) در مقایسه گروه کنترل (۱.۷±۳۷.۸) نیز تفاوت معنی‌داری ندارد.



شکل (۷): میانگین قد (فاصله میان سر تا نشیمنگاه) که تیمار شده‌اند با نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره آبی گرده گیاه کلزا در مقایسه‌ی گروه کنترل و کنترل آزمایشگاهی که تیمار روی آنها انجام نگرفته است.

اثر درمان با نانوذره بر وزن جنین‌های درمان شده در مقیاس با گروه کنترل:

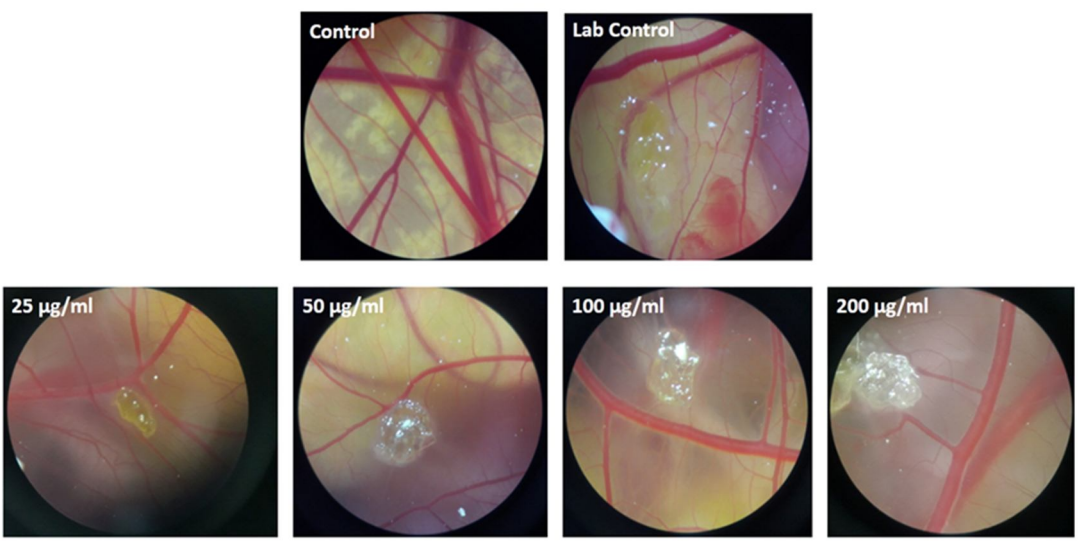
وزن جنین‌های درمان شده با نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره‌ی آبی گرده‌ی گیاه کلزا در گروه کنترل و کنترل آزمایشگاهی درمان تغییر قابل‌توجهی را نشان نداد.



شکل (۸): میانگین وزن جنین‌هایی که تیمار شده‌اند با نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره آبی گرده گیاه کلزا در مقایسه‌ی گروه کنترل و کنترل آزمایشگاهی که تیمار روی آنها انجام نگرفته است.

بررسی‌های مورفومتریک:

عکس‌های گرفته شده با استفاده از استریومیکروسکوپ کاهش قابل‌توجهی را در نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل و کنترل آزمایشگاهی که تیمار نشده است را نشان می‌دهد. همان طوری که در تصویر مشاهده می‌کنیم با افزایش غلظت نانوذره میزان و وجود رگ‌های خونی موجود کاهش می‌یابد.



شکل (۹): مقایسه مورفولوژی رگ‌های خونی پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه در نمونه‌های تیمار شده توسط غلظت‌های مختلف ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانو ذرات نقره سنتز شده با عصاره آبی گرده گیاه کلزا و کنترل و کنترل آزمایشگاهی

بحث

با بررسی‌های انجام گرفته در مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران با استفاده از نانوذره‌ی نقره سنتز شده با عصاره آبی گیاه کلزا موفق به کاهش معنی دار در رشد سلول‌های سرطانی کبد و کولون به‌صورت اختصاصی در مقایسه با رده‌های سلولی نرمال شدیم ($p=<0.001$). علاوه بر این با به‌کارگیری نانو ذرات فوق الذکر شاهد توقف متاستاز و مهار آنژیوژنز (رگ زایی) در پرده‌ی کوریوالانتوئیک جوجه بودیم. در این خصوص، نتایج حاصل از تست CAM نشان داد که نانوذره در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث کاهش قابل‌توجهی در میانگین تعداد عروق، انشعابات عروق، کاهش میزان قد و وزن جنین‌ها در قیاس با جنین‌های شاهد می‌شود ($p = <0.05$).

سرطان، دومین علت مرگ در کشورهای در حال توسعه و اولین علت مرگ درکشورهای توسعه یافته به شمار می‌رود. گستردگی و تنوع شیوع سرطان در طول ادوار پیشین منجر به پیشرفت روش‌های متنوع درمانی شده است که بسته به میزان پیشرفت، نوع، وسعت بیماری و وضعیت بیمار، ترکیبی از روش‌های مختلف جهت مبارزه و درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد. با وجود تلاش‌های فراوان در زمینه پیشگیری و درمان سرطان، این بیماری رشد فزآینده‌ای داشته و همچنان یک عامل کشنده‌ی جهانی محسوب می‌شود(۸). امروزه از روش‌های مختلفی جهت درمان سرطان استفاده می‌شود، که شامل جراحی، شیمی درمانی و اشعه درمانی می‌باشد که در اغلب موارد سلول‌های سالم نیز از بین می‌روند و این می‌تواند باعث اثرات سمی و عوارض جانبی در بیمار شود. بنابراین یافتن روش‌های نوین درمان سرطان با کاهش عوارض جانبی ضروری به نظر می‌رسد(۹). در این مقاله، اثر نانوذره نقره سنتز شده از گیاه کلزا به‌منظور بررسی و تحقیق اثرهای ضد رگزایی با استفاده و بهره گیری از مدل تحلیل CAM مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج این بررسی حاکی از آن بود که نانوذره‌ی نقره به شدت منجر به مرگ جنین‌های جوجه می‌شود و همچنین طول و تعداد رگ‌های خونی را کاهش می‌دهد که این موضوع نشان‌دهنده‌ی کاهش آنژیوژنز ویا کاهش رگزایی می‌باشد به این نتیجه رسیدیم که عروق خونی باعث تبادل اکسیژن هستند و منبع خوبی برای تغذیه می‌باشد. این خصوصیات نقش بسیار مهمی برای ادامه‌ی رشد و توسعه دارد. با این بررسی‌ها رگ‌های کوچک که در درمان با نانوذره‌ی نقره هستند به خاطر کاهش عرضه اکسیژن و تغذیه باعث مرگ جنین‌های جوجه می‌شود و همچنین باعث می‌شود که قد و وزن جنین کاهش پیدا می‌کند. تحقیقات نشان می‌دهد که تومورهای خوش خیم رگزایی یا به عبارتی آنژیوژنز آن‌ها کم می‌باشد و سرعت آن‌ها بسیار زیاد می‌باشد و با قدرت عمل متاستاز رابطه‌ای مستقیم دارند (۱۰). هیپوکسی یکی از عامل‌هایی می‌باشد که باعث القاء آنژیوژنز می‌شود. آنژیوژنز در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک ازجمله رشد تومور دخالت دارد. بنابراین رگ‌زایی درمانی می‌تواند روش کارآمدی برای درمان سرطان محسوب گردد(۱۱). سلول‌های توموری در ابتدای عمل با قرار گرفتن در اطراف عروق و رشد کردن نیاز به ایجاد و تشکیل آنژیوژنز ندارند و این سلول‌های توموری و غدد سرطانی می‌توان از راه‌های مختلفی منبع خونی مورد نیاز خودشون را تامیین کنند به طور مثال در طول عمل آنژیوژنز باعث تغییر شکل رگ‌های خونی می‌شوند(۱۲). خاصیت ضد سرطانی نانو ذرات نقره در بسیاری از مطالعات مشخص شده است. بنابراین می‌توان آن‌ها را به عنوان یک کاندیدای مناسب جهت درمان سرطان در نظر داشت. نانو ذرات نقره انتقال پیام سلولی را مختل می‌کنند و به این صورت سبب به وجود آمدن اختلال در شبکه ارتباطی سلولی می‌شوند. به علاوه، نانو ذرات نقره در آسیب به DNA و القاء مرگ برنامه ریزی شده‌ی سلولی (آپوپتوز) نقش دارند که این امر در درمان سرطان دارای اهمیت بسیاری است(۱۳). در تحقیقات جدید گزارش شده است که نانو ذرات نقره و تولید شده به روش سبز نسبت به نانو ذرات تجاری، اثرات مهاری بیشتری بر روی سلول‌های سرطانی از خود نشان می‌دهند(۱۴). در طول سال‌های گذشته با وجود تحقیق‌های صورت گرفته مشخص شده است که نانوذره‌ها به طور خلاقانه برای جهت گیری و درمان تومورها طراحی شده‌اند. این نانوذره‌ها به علت کاربردهای موثبت و مفیدی که دارا هستند در علوم‌های مختلفی مانند علم پزشکی مورد توجه قرار گرفته‌اند(۱۵). راه‌ها و روش‌های مختلفی همانند روش‌های شیمیایی و زیستی برای سنتز کردن این نانوذره‌ی نقره وجود دارد. به این صورت که قارچ‌ها هم این توانایی را دارند که سنتز نانوذره‌ی نقره را انجام دهند که این نانو ذرات سنتز شده به کمک قارچ‌ها فوایدی زیادی را دارد ازجمله این فایده‌ها این است که مقداری که تولید می‌شود از این نانو ذرات بسیار زیاد می‌باشد و همچنین سازگاری محیطی دارند و همچنین این نانوذره‌های نقره بر علیه میکروارگانیسم‌هایی که ایجاد بیماری می‌کنند به عنوان عامل ضد میکروب می‌توانند عمل کنند(۱۶). در حال حاضر علم اینگونه بیان می‌کند که تمایل به ایجاد و بهره گیری از مواد با اندازه‌ی نانومتری به طور قابل‌توجهی به سمت زیاد شدن می‌باشد(۱۷). در مطالعه‌ای خصوصیت سمیت نانوذره نقره سنتز شده توسط گیاه eaDodona Viscosa بر روی سلول‌های سرطانMCF7 مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از آن نشان داد که نانوذره نقره سنتز شده در غلظت ۱۰۰ میلی گرم این توانایی را دارد که ۵۰درصد سلول‌های سرطانی MCF7 را مهار نماید در صورتی که نتایج حاصل از خاصیت سمیت نانوذره نقره سنتز شده توسط عصاره گرده گیاه کلزا

بر روی سلول‌های سرطان کبد HepG2 نشان داد که نانوذره نقره سنتز شده توسط عصاره گرده گیاه کلزا در غلظت ۰/۱۵ ماکرو گرم بر میلی‌لیتر توانایی آن را دارد که ۵۰درصد سلول‌های سرطانی کبد را مهار نماید پس در این بررسی به این نتیجه دست یافتیم که نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره گرده گیاه کلزا اثر بهتری برای مهار کردن سلول‌های سرطانی دارد زیرا در غلظت کمتر تأثیر بیشتری را روی مهار سلول‌های سرطانی دارند(۱۸). در مطالعه‌ای دیگر خصوصیت سمیت نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط میوه Longum Piper بر روی سلول‌های سرطان سینه MCF7 در مقایسه با خصوصیت سمیت نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره گرده گیاه کلزا بر روس سلول‌های سرطانی کبد HepG2 قرار گرفت و این چنین بیان شد که نانوذره نقره سنتز شده توسط میوه Longum Piper در غلظت ۶۷ ماکرو گرم بر میلی‌لیتر بر روی سلول‌های سرطانیMCF7 توانسته ۵۰درصد سلول‌های سرطانی را مهار نماید در صورتی که نانوذره نقره سنتز شده توسط عصاره گرده گیاه کلزا این توانایی را دارد که در غلظت ۰/۱۵ ماکروگرم بر میلی‌لیتر ۵۰درصد سلول‌های سرطانی کبد را نیز مهار نماید پس می‌توان این چنین نتیجه گرفت که نانوذره نقره سنتز شده توسط عصاره گرده گیاه کلزا اثر بهتری برای مهار سلول‌های سرطانی دارد چون در غلظت کمتری این توانایی را دارد که سلول‌های سرطانی را مهار نماید(۱۹). مطالعه‌ای انجام شد بر روی خصوصیت سمیت نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط گیاه زیتون تلخ بر روی سلول‌های سرطانی Hela در مقایسه با خصوصیت سمیت نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره گرده گیاه کلزا بر روی سلول‌های سرطان کولون انسانی HT-29 قرار گرفت و این چنین بیان شد که نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط گیاه زیتون تلخ در غلظت ۳۰۰ ماکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی سلول‌های سرطان Hela توانسته است ۵۰درصد سلول‌های سرطانی را مهار نماید در صورتی که نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره گرده گیاه کلزا در غلظت ۶ماکرو گرم بر میلی‌لیتر توانسته است ۵۰درصد سلول‌های سرطانی کولون را مهار نماید که این چنین مشخص می‌شود که نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره گرده گیاه کلزا توانسته در غلظت پایین‌تری سلول‌های سرطانی را مهار نماید و به همین دلیل دارای کارایی بهتری نیز می‌باشد(۲۰). مطالعه‌ای صورت گرفته درباره خصوصیت سمیت نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط گیاه مرزنجوش در مقایسه با خصوصیت سمیت نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره گرده گیاه کلزا که این مطالعه این چنین بیان می‌کند که این نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط گیاه مرزنجوش بر روی سلول‌های سرطانی ریه A549 توانسته در غلظت ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر ۵۰درصد سلول‌های سرطانی ریه را مهار نماید در صورتی که نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره گرده گیاه کلزا بر روی سلول‌های سرطانی کبد HepG2 توانسته در غلظت بسیار پایین‌تر ۰/۱۵ماکروگرم بر میلی‌لیتر ۵۰درصد سلول‌های سرطانی کبد را مهار نماید و این مطالعه این چنین بیان می‌کند که نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره گرده گیاه کلزا کارآمدتر و بهتر می‌باشد برای استفاده چون در غلظت پایین توانسته نیمی از سلول‌های سرطانی را مهار نماید(۱۳). مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵ بر روی پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه انجام گرفت به این صورت که در این مطالعه نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز را بر روی پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه تلقیح کردند و به این نتیجه رسیدند که این نانوذره نقره سنتز شده این توانایی را دارد که تعداد و طول عروق خونی و همچنین عمل رگزایی را کاهش می‌دهد که این نتایج به دست آمده از این مطالعه همانند نتایج به دست آمده از نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره گرده گیاه کلزا بر روی پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه بود که در این مطالعه نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره گرده گیاه کلزا باعث می‌شود تعداد و طول عروق خونی و همچنین عمل رگزایی را کاهش دهد. پس به این نتیجه می‌رسیم که نانوذره نقره باعث کم شدن عمل رگزایی می‌شود(۲۱). مطالعه‌ای بر روی اثرهای ضد رگزایی نانوذره طلا صورت گرفته است نتایج این مطالعه این چنین بیان کرده است که این نانوذره طلا فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) را مهار کند ، تشکیل رگ را کم می‌کند و همچنین مهاجرت و تکثیر رگ را کاهش می‌دهد که این نتایج یکسان است با نتایجی که در مطالعه‌ی اثرهای ضد رگزایی نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز توسط عصاره گرده گیاه کلزا انجام گرفته است(۲۲).

مطالعه‌ی حاضر گرچه حقایق امید بخشی در راستای تسهیل و کارآمد سازی درمان سرطان را مکشوف ساخته است اما همچنان در تأیید و صحت سنجی نتایج با سه محدودیت اصلی مواجه بوده است. رده‌های سلولی بیشتر و متنوع‌تر سرطانی و نرمال برای تعیین اختصاصیت خواص ضد سرطانی نانو ذرات، طراحی مطالعات مبتنی بر سایر حیوانات در شرایط in-Vivo و تعیین مسیرهای مولکولی القا شده در سلول‌های سرطانی توسط آن‌ها قطعاً به افزایش صحت و دقت نتایج منتج خواهد شد.

نتیجه‌گیری

با توجه به آزمایش‌های انجام شده و مطالعات دیگر به این نتیجه رسیده‌ایم که نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز از عصاره آبی گیاه کلزا ضد سرطان بوده که می‌توان با بررسی‌ها و تحقیقات بیشتر این

نانوذره را به عنوان داروی ضد سرطان مورد استفاده قرار داد و همچنین می‌توان با بررسی‌های مولکولی یا مدل‌های حیوانی دیگر به یافته‌های بیشتری دست پیدا کنیم.

تقدیر و تشکر

تشکر و قدردانی فراوان را دارم از استاد محترم جناب اقا دکتر مسعود همایونی که اینجانب را برای نوشتن این مقاله یاری نمودند که این مقاله بخشی از نتیجه‌گیری‌های پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد.

لازم به ذکر است این مقاله در مجله‌ی دیگر به چاپ نرسیده است.

References:

1. Breier G. Angiogenesis in embryonic development—a review. Placenta 2000;21:S11-S5.
2. Fox SB, Gasparini G, Harris AL. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. Lancet Oncol 2001;2(5):278-89.
3. Yao L, Sgadari C, Furuke K, Bloom ET, Teruya-Feldstein J, Tosato G. Contribution of natural killer cells to inhibition of angiogenesis by interleukin-12. Blood 1999;93(5):1612-21.
4. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. JNCI: J Natl Cancer Inst 1992;84(24):1875-87.
5. Abbasi E, Milani M, Fekri Aval S, Kouhi M, Akbarzadeh A, Tayefi Nasrabadi H, et al. Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. Crit Rev Microbiol 2016;42(2):173-80.
6. Martirosyan A, Bazes A, Schneider Y-J. 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. Salari Joo H, Kalbassi MR, Johari SA. Effect of water salinity on acute toxicity of colloidal silver nanoparticles in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) Larvae. IJHE 2012;5(2):121-31.
8. Hanley C, Layne J, Punnoose A, Reddy K, Coombs I, Coombs A, et al. Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. Nanotechnology 2008;19(29):295103.
9. Rasouli BS, Ghadimi-Darsajini A, Nekouian R, Iragian G-R. In vitro activity of probiotic Lactobacillus reuteri against gastric cancer progression by downregulation of urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor gene expression. J Cancer Res Ther 2017;13(2):246.
10. Joerger R, Klaus T, Granqvist CG. Biologically Produced Silver–Carbon Composite Materials for Optically Functional Thin-Film Coatings. Adv Mater 2000;12(6):407-9.
11. Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. Nat Rev Cancer 2004;4(6):423.
12. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood 1998;91(10):3527-61.
13. Sankar R, Karthik A, Prabu A, Karthik S, Shivashangari KS, Ravikumar V. Origanum vulgare mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. Colloids Surf B Biointerfaces 2013;108:80-4.
14. Rashmezad MA, Ali Asgary E, Tafvizi F, Shandiz S, Ataollah S, Mirzaie A. Comparative study on cytotoxicity effect of biological and commercial synthesized nanosilver on human gastric carcinoma and normal lung fibroblast cell lines. Tehran Univ Med J 2015;72(12):799-807.

15. Dipankar C, Murugan S. The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from Iresine herbstii leaf aqueous extracts. Colloids Surf B Biointerfaces 2012;98:112-9.
16. Vigneshwaran N, Ashtaputre N, Varadarajan P, Nachane R, Paralikar K, Balasubramanya R. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus Aspergillus flavus. Mater Lett 2007;61(6):1413-8.
17. Senapati S, Syed A, Moeez S, Kumar A, Ahmad A. Intracellular synthesis of gold nanoparticles using alga Tetraselmis kochinensis. Mater Lett 2012;79:116-8.
18. Giridharan T, Masi C, Sindhu S, Arumugam P. Studies on green synthesis, Characterization and anti-proliferative potential of silver nano particle using Dodonaea viscosa and Capparis decidua. Biosci. Biotech Res Asia 2014;11(2):665-73.
19. Reddy NJ, Vali DN, Rani M, Rani SS. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by Piper longum fruit. Materials Science and Engineering: C. 2014;34:115-22.
20. Sukirtha R, Priyanka KM, Antony JJ, Kamalakkannan S, Thangam R, Gunasekaran P, et al. Cytotoxic effect of Green synthesized silver nanoparticles using Melia azedarach against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model. Process Biochem 2012;47(2):273-9.
21. 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.
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.

Original Article

THE ANTIANGIOGENIC AND CYTOTOXIC PROPERTIES OF GREEN SYNTHESIZED SILVER NANOPARTICLES USING LIQUID EXTRACT OF RAPESEED FLOWER POLLEN

Sahar Hajebi[1], Masoud Homayouni Tabrizi[2], Mahboobeh Nakhaei Moghaddam[3]*

Received: 09 Feb, 2019; Accepted: 27 May, 2019

Abstract

***Background & Aims*:** Angiogenesis is an active reaction. In this study, the extract of Rapeseed Flower Pollen with different antioxidant properties was used to prepare the Bio-green Silver nanoparticle and then its anti -angiogenic effects of was evaluated. The Bio-green synthesized nanoparticles that were synthesized by the plant extract have the potential to be used as a reducing agent for metal ions to metal molecules present in the composition. Today, green nanoparticles are used extensively due to biological properties such as antioxidant properties, angiogenesis inhibitors, and cancer control.

***Materials & Methods*:** In this test-tube lab research, silver nanoparticles made from rapeseed pollen were used to investigate anti-angiogenic effects using a CAM assay. For this purpose, 60 eggs (Ross) were purchased and randomly assigned into 6 groups (n=10): a control group, a laboratory control, and four treatment groups (25, 50, 100, 200µg/ml). On the second day, the incubation window was made and on the eighth day, samples were treated with different concentrations of nanoparticles. On the twelfth day, the photographs were taken from the samples, then the number and the length of the vessels were evaluated using Imag J software and the height and weight of the embryos were measured. Data were analyzed by SPSS software and ANOVA test and $P < 0.05$ was considered significant. The MTT assay was used to evaluate the toxicity of this nanoparticle against liver cancer (HT-29) and (HepG2) and normal cell (Huvec).

***Results*:** The results of this experiment showed that the nanoparticle are significantly capable of decreasing the length and the number of blood vessels at concentrations of 100 and 200 µg / ml ($p \leq 0.05$). They are also able to reduce the length and the weight of the treated embryos in comparison to the control group. The results showed that the silver nanoparticles can significantly inhibit liver cancer cell (HT-29) and HepG2 (IC50: 0.15 µg/ml) in very low concentrations (IC_{50}:6 µg/ml) but does not have an inhibitory effect in similar concentration on normal cells (Huvec) (IC_{50}: 0.6 µg/ml) ($p \leq 0.001$).

***Conclusion*:** The results showed that the synthesized nanoparticle from rapeseed pollen has an inhibitory effect on the rate of angiogenesis which makes this nanoparticle a suitable candidate for cancer treatment. It does not have toxic effects in similar concentrations on Huvec cells, but it is also able to inhibit the HT-29 and HepG2 cells in a low concentration.

Keywords: Angiogenesis, Ag nanoparticle, CAM assay, Cytotoxic

Address: Mashhad, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad
Tel: +989154505894
E-mail: mhomayouni6@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2019: 30(4): 280 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 Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran*