

بررسی اثر سمیت نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش سبز با عصاره گیاه خرنوب بر رده سلول سرطانی پستان MDA-MB231 و ارزیابی اثرات ضد رگزایی آن

آسیه سادات رئیس الساداتی^۱، وحید پوراسماعیل^{۲*}، علی نعمتی^۱

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران

۲- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران

چکیده

مقدمه

سنتز نانوذرات فلزی به روش سبز یکی از روش‌های کارآمد دارای حداقل عوارض جانبی در درمان سرطان به شمار می‌رود. هدف از مطالعه حاضر بررسی سمیت سلولی نانوذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره خرنوب بر سلول‌های سرطان پستان و بررسی اثر ضد رگزایی این نانوذرات در مدل پرده کوریوالانتوتیک جوجه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش سلول‌های سرطانی MDA-MB231 به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت تیمار با غلظت‌های مختلف (۳۱/۲ - ۲۵۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) از نانوذرات قرار گرفته و درصد زیستایی سلول‌ها با استفاده از تست MTT بررسی شد. همچنین با انجام تست CAM روی تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار اثر ضد رگزایی این نانوذرات با اندازه‌گیری تعداد رگ، طول عروق، طول و وزن جنین بررسی شد.

یافته‌ها

نانوذرات اکسیدروی سنتز شده به روش سبز به صورت وابسته به دوز و زمان باعث القای سمیت سلولی بر روی رده سلول‌های سرطان پستان می‌شود ($P < 0/001$). میزان IC50 در این سلول‌ها ۶۲/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر بدست آمد. بررسی میزان رگزایی در مدل پرده کوریوالانتوتیک نشان داد که نانوذرات اکسیدروی، با توجه به دوز، به صورت معنی‌داری منجر به کاهش تعداد عروق ($P \leq 0/001$); ($P \leq 0/01$) و طول عروق ($P \leq 0/05$); ($P \leq 0/001$) و قد جنین ($P \leq 0/05$) و وزن جنین ($P \leq 0/05$) در دوز بالا می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نانوذرات اکسیدروی سنتز شده با عصاره خرنوب با القای اثر کشندگی و اثرات ضد رگزایی بر سلول‌های سرطان پستان می‌تواند به عنوان گزینه مناسبی در درمان سرطان مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها

نانوذرات اکسید روی، سمیت سلولی، اثر ضد رگزایی، سلول‌های سرطان پستان انسانی، گیاه خرنوب

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۱۹

تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۷

*نویسنده مسئول: وحید پوراسماعیل،

مشهد- خیابان امام خمینی ۱۴- کوچه

سراب- دانشکده پزشکی

تلفن:

پست الکترونیک:

v.pouresmaeil@mshdiau.ac.ir

مقدمه

و (۱۰). روش‌های شیمی درمانی مبتنی بر عوامل آلکیله کننده و عوامل بیولوژیکی که در حال حاضر برای مهار سلول‌های سرطانی بکار می‌رود اغلب به علت مقاومت دارویی یا عدم تشخیص سلول‌های سرطانی در درمان قطعی سرطان ناتوان هستند (۱۱). اگر بتوان روش‌های درمان را به سمتی سوق داد که از مواد طبیعی و ترکیبات حاصل از آنها با کمترین اثرات جانبی استفاده نمود می‌توان به درمان‌های کارآمدتری در این زمینه دست یافت (۱۲).

فناوری نانو یک علم جدید تحقیقاتی، در قرن ۲۱ به شمار می‌رود که مشتق از خواص متمایز نانوذرات^۱ و کاربرد آنها در زمینه‌های مختلف است (۱۱). کاربرد فناوری نانو در برنامه های پزشکی، که معمولاً به عنوان «نانو پزشکی» نامیده می شود، به دنبال ارائه مجموعه‌ای جدید از دستگاه‌ها و روش های درمانی برای درمان بیماری‌هاست (۱۳). نانوتکنولوژی با تولید نانوداروها و هدف قرار دادن سلول‌های توموری توانسته است گام مهمی در بهبود کیفیت آثار داروهای ضد سرطان داشته باشد (۱۴). فلز روی در ساختمان بسیاری از آنزیم‌ها و هورمون‌ها دخالت دارد و در صنایع مختلفی بکار می‌رود (۱۵). اکسید روی یکی از پنج ترکیب شناخته شده روی است که در پزشکی و نانوفناوری به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از محصولات نانوفناوری، نانوذرات اکسید روی هستند که به خاطر خصوصیات ویژه فیزیکی و زیستی نقش مهمی در صنعت و محصولات نانوفناوری دارند و در زمینه‌های مختلفی از جمله سنسورهای زیست پزشکی، سیستم‌های تحویل دارو، بیوسنسورها، لوازم آرایشی و کشاورزی و غیره مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۱).

رشد بی رویه سلول‌ها و نیاز به منابع غذایی بیشتر باعث شده است که سلول‌های سرطانی همواره در پی یافتن راه حلی برای بقای بیشتر در بافت توموری باشند. رگ‌زایی یکی از راه‌هایی است که به سلول‌های سرطانی اجازه جذب مواد غذایی بیشتر، دفع مواد زائد و متاستاز به سایر بافت‌ها را می‌دهد، از این رو مهار رگ‌زایی به عنوان یک هدف عمده و راهی موثر در درمان سرطان توسط محققین مد نظر قرار گرفته است (۲۱).

فرایند رگ‌زایی هم به صورت فیزیولوژیک و هم پاتولوژیک روی می‌دهد و به تعادل دقیق بین فعال کننده‌ها و مهار کننده‌ها وابسته می‌باشد. عوامل تنظیم کننده رگ‌زایی متنوعی شناسایی شده‌اند که این فرایند را در شرایط فیزیولوژیک کنترل نموده و عدم تعادل در تولید این فاکتورها می‌تواند منجر به حالت پاتولوژیک رگ‌زایی شود (۳ و ۴). در سلول‌های توموری افزایش بیان فاکتور اندوتلیال عروق خونی باعث رشد، مهاجرت و متاستاز سلول‌های سرطانی به بافت‌های اطراف می‌شود (۵ و ۶). بررسی‌ها نشان داده که سلول‌های موجود در بافت تومور با ترشح فاکتورهای تحریک کننده باعث تشکیل رگ‌های جدید می‌شوند. بنابراین رشد اولیه تومور و ادامه رشد آن بستگی به خون‌رسانی کافی به بافت تومور دارد و مهار خون‌رسانی می‌تواند از رشد بیشتر تومور جلوگیری کند (۷).

سرطان پستان، از سرطان‌های شایع و یکی از عوامل مهم مرگ و میر در بانوان است که در ایجاد و گسترش آن عوامل مختلفی مثل فاکتورهای رشد، انکوژن‌ها و هورمون‌ها دخیل هستند (۸). با وجود پیشرفت روش‌های جراحی، شیمی درمانی، پرتودرمانی و هورمون درمانی یکی از مشکلات عمده در بهبود این بیماران عوارض جانبی حاصل از درمان است (۹).

^۱Nanoparticles: NPs



تا خشک شود. سپس ۱۰ گرم گیاه خرنوب خشک شده در ۱۰۰ سی سی آب مقطر حل گردید و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی استیرر در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از سرد شدن با استفاده از کاغذ واتمن، فیلتر شده و عصاره آبی حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

به منظور تهیه نانوذرات اکسید روی ابتدا محلول استات روی با غلظت ۰/۵ مولار تهیه شد و سپس ۱۰ سی سی از عصاره به ۹۰ سی سی محلول استات روی اضافه گردید. محلول حاصل در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲۰ دقیقه توسط همزن مغناطیسی همزده شد. در نهایت محلول حاوی نانوذره ساخته شده با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد و نانو ذرات حاصل (رسوب سفید رنگ) در کوره خشک شد (۲۱۰ و ۲۰).

ویژگی‌های ساختاری و مورفولوژیکی نانوذرات اکسید روی تولید شده از عصاره آبی گیاه خرنوب با استفاده از روش‌های پراش اشعه ایکس^۲ XPERT-PRO و میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی Philips, Eindhoven, The Netherlands^۳ تعیین و بررسی شد.

بررسی اثر ضد رگ‌زایی نانوذرات اکسید روی بر غشای

کورویوالانتوئیک

تست پرده کورویوالانتوئیک جوجه یک روش *In vivo* جهت مطالعه رگ‌زایی می‌باشد. در این روش با ایجاد پنجره‌ای در پوسته تخم مرغ تیمارهای مختلفی بر روی آن انجام و پس از طی زمان لازم میزان رگ‌زایی و تغییرات آن نسبت به نمونه کنترل مورد بررسی قرار می‌گیرد. ابتدا تعداد ۶۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار که از نظر وزن و سن همگن می‌باشند از شرکت مرغداران طوس مشهد خریداری شده و در ۶ گروه ۱۰ تایی، شامل شاهد (بدون تیمار)، شاهد آزمایشگاهی (تحت تیمار با

گیاه خرنوب^۱ یک گونه همیشه سبز و از جمله گیاهان دارویی محسوب می‌شود. این گیاه در سرتاسر مدیترانه، عمدتاً اسپانیا، ایتالیا، پرتغال و مراکش رشد می‌کند (۱۶). میوه‌های خرنوب شامل غلاف بلند با یک پالپ شیرین و دانه‌های سخت می‌باشد و در قدیم به دلیل شیرینی زیاد آن، جایگزین شکر بوده است.

ترکیب شیمیایی غلاف خرنوب متفاوت است. دارای میزان بالای کربوهیدرات (۴۰-۶۰ درصد)، پروتئین کم (۳-۴ درصد) و لیپید بسیار کمی (۰/۴-۰/۸ درصد) است. علاوه بر این حاوی میزان بالای انواع مختلف ترکیبات فنلی نیز می‌باشد (۱۷ و ۱۸).

در مطالعه‌ای نشان داده شده که عصاره‌های الکلی برگ‌های خرنوب به شدت مهارکننده تکثیر سلول‌های سرطانی گردن رحم انسانی می‌باشد (۱۹).

از این رو هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر سمیت سلولی نانوذرات اکسید روی سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه خرنوب، بر رده سلول‌های سرطان پستان انسانی MDA-MB231 و ارزیابی اثر ضد رگ‌زایی این نانوذرات بر پرده کورویوالانتوئیک جوجه است.

مواد و روش‌ها

لاین سلولی مورد استفاده در این پژوهش از انستیتو پاستور ایران و مواد لازم مانند رنگ MTT و دیگر ترکیبات شیمیایی از Sigma-Aldrich, USA و نیز محیط‌های کشت و آنتی-بیوتیک و سرم جنین گاوی از GIBCO, USA تهیه شد.

تهیه نانوذرات اکسید روی از عصاره آبی گیاه خرنوب

به منظور تولید نانوذرات روی در مرحله اول عصاره آبی از گیاه خرنوب تهیه شد. به این صورت که غلاف گیاه خرنوب با آب مقطر به خوبی شسته شد و سپس در دمای اتاق قرار گرفت

^۲X-Ray Diffraction: XRD

^۳Field Emission Scanning Electron Microscope: FESEM

^۱ *Cerantonía siliqua*

تست MTT^۱ یک روش رنگ‌سنجی برای اندازه‌گیری توان حیاتی سلول است. اساس آن بر پایه احیا کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی و ایجاد بلورهای آبی رنگ تیره فورمازان است که در آب غیر محلول می‌باشد. احیا MTT فقط در سلول‌های زنده اتفاق می‌افتد.

ابتدا سلول‌های سرطان پستان MDA-MB 231 در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی بیوتیک (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنسیلین) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد دی اکسید کربن درون انکوباتور کشت داده شدند. سپس سلول‌ها به تعداد ۵۰۰۰ سلول / چاهک به پلیت ۹۶ خانه کیت MTT منتقل شدند (۱۰۰ میکرولیتر). پس از طی ۲۴ ساعت، سلول‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت تاثیر نانوذرات با حجم ۱۰۰ میکرولیتر و در غلظت‌های مختلف (۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲٫۵، ۳۱٫۲ میکروگرم بر میلی لیتر) قرار گرفتند. سپس سمیت سلولی نانوذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره گیاه خرنوب بر روی سلول‌های سرطانی بدین شرح مورد بررسی قرار گرفت که پس از طی مدت زمان تیمار، در هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از رنگ MTT به سلول‌ها اضافه شد و ۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت و پس از آن با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO جذب رنگ بنفش ایجاد شده ناشی از حل شدن کریستال‌های فورمازان در گروه‌های کنترل و تحت تیمار در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد (۲۳). برای هر غلظت در هر سه زمان انکوباسیون ۳ بار تکرار انجام شد. میزان زنده ماندن سلول‌ها در هر غلظت بر اساس معادله زیر مورد سنجش قرار گرفت.

حلال نرمال سالین)، و چهار گروه تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره گیاه خرنوب تقسیم‌بندی شدند. تخم مرغ‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه با رطوبت ۷۰ درصد نگهداری شدند. در روز دوم انکوباسیون، تخم مرغ‌ها از دستگاه جوجه‌کشی (Cocks, Netherland) خارج شدند. تحت شرایط کاملا استریل در زیر هود، پنجره‌های در یک طرف تخم مرغ‌ها ایجاد و سپس توسط چسب بسته شد و مجدداً به دستگاه بازگردانده شدند و تا روز ۸ درون انکوباتور قرار گرفتند. با توجه به شکل‌گیری پرده کوریوآلانتوئیک و شکل‌گیری کامل قلب و جدا شدن گردش خون سرخرگی و سیاهرگی در روز هشتم پس از انکوباسیون، تیمار در این روز انجام شد. روز هشتم پنجره‌ها در شرایط کاملا استریل برداشته شد و اسفنج ژلاتینی محتوی آلبومین سفیده تخم مرغ و محلول آگار حل شده در نرمال سالین به نسبت مساوی همراه با ۲۰۰ میکرولیتر آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین بر روی پرده کوریوآلانتوئیک قرار داده شد. در این مرحله در گروه شاهد تیماری صورت نگرفت. گروه‌های تیماری در معرض غلظت‌های مختلف نانوذرات سنتز شده اکسید روی به روش سبز (۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) قرار گرفتند. سپس پنجره مجدد بسته شد. پس از ۴ روز انکوباسیون، در روز ۱۲ از محل قرارگیری اسفنج توسط استریومیکروسکوپ عکسبرداری شد و توسط نرم‌افزار image J طول عروق، تعداد انشعابات عروق ارزیابی شد. در ادامه طول بدن جنین با کولیس و وزن جنین جوجه با استفاده از ترازو با دقت ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری شد (۲۲).

بررسی سمیت نانوذرات اکسیدروی سنتز شده به روش

سبز به کمک تست MTT

^۱3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

جهت بررسی ساختاری نانوذرات اکسید روی سنتز شده از روش XRD استفاده شد. در شکل ۱ پیک‌های پراش (۱۰۰)، (۰۰۲)، (۱۰۱)، (۲۰۲)، (۱۱۰)، (۱۰۳)، (۱۰۳)، (۲۰۰)، (۱۱۲)، (۰۱۱)، (۰۰۴) اکسید روی با ساختار هگزاگونال می‌باشد که در آن قله شدت بیشینه (۱۰۱) است. نانوذرات دارای فاز هگزاگونال اکسید روی بوده و فاقد هرگونه ناخالصی یا فازی مربوط به ترکیبی غیر از اکسید روی می‌باشد. با توجه به تفسیر دستگاه ۱۰۰ درصد نانوذره، اکسید روی بوده است. تمام پیک‌های آشکار به عنوان ساختار oxidewurtzite روی زنجیره نشان داده شده است. اکسید روی در دو فرم اصلی، wurtzite شش ضلعی و zinblende کبالت می‌شود. ساختار وورتزیت در شرایط محیطی پایدار است و در نتیجه شایع‌تر است و نتایج بدست آمده در اینجا تأیید می‌کند که نانوذرات سنتز شده از ناخالصی‌ها آزاد هستند زیرا هیچ نشانه‌ای از ویژگی‌های XRD به جز پیک اکسید روی ندارد.

$$100 \times \frac{\text{میانگین جذب نوری خانه های مربوط به هر غلظت}}{\text{میانگین جذب نوری خانه های کنترل}} = \text{درصد زیستایی}$$

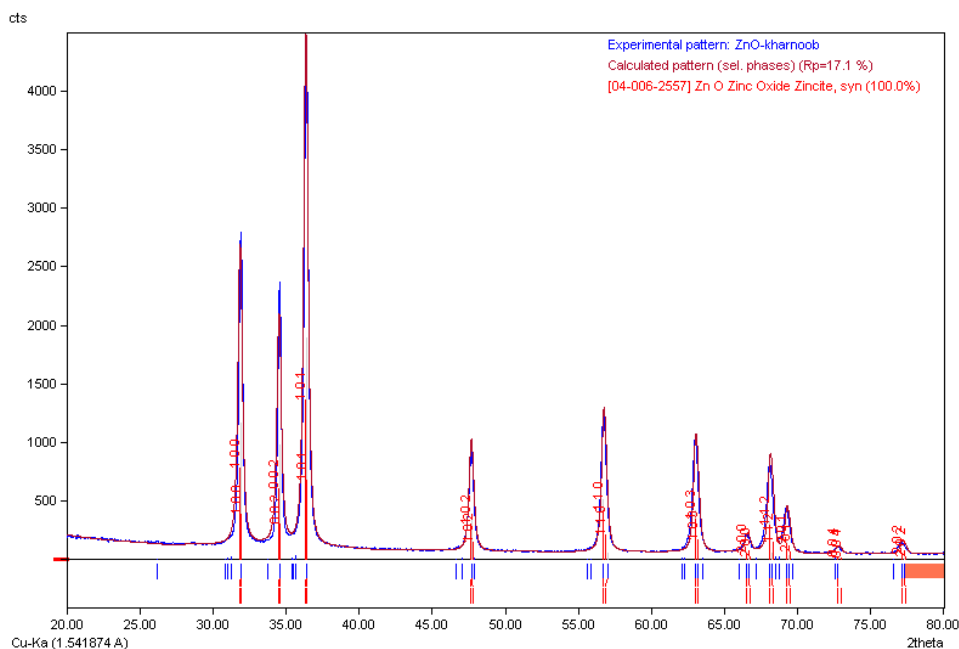
درصد بقا = ۱۰۰ - درصد سمیت سلولی

آنالیز آماری

میانگین شاخص‌های اندازه‌گیری شده برای بقا سلول‌ها از نرم‌افزار SPSS با آزمون آماری ANOVA و آنالیز واریانس یک طرفه در سطح معنی‌داری $P=0/05$ تحلیل شد. تعداد و طول عروق توسط نرم‌افزار image J ارزیابی شدند. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شد و توسط نرم‌افزار SPSS با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه در سطح معنی‌داری $P=0/05$ مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

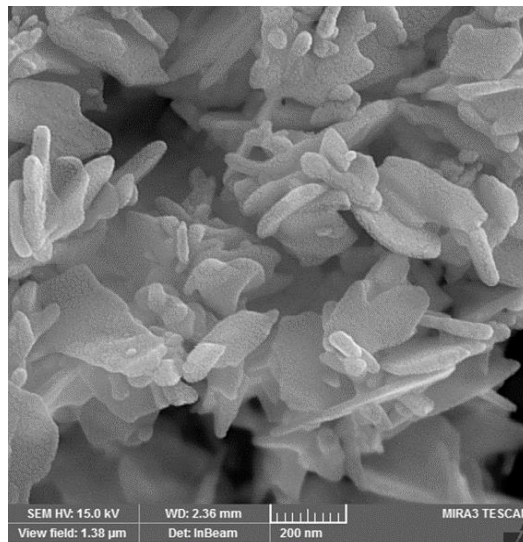
آنالیز نانوذره اکسید روی سنتز شده با XRD



شکل ۱- نتایج حاصل از XRD

ناهموار می‌باشند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که ذراتی که دارای
ناهمگونی در شکل می‌باشند اثرات بیولوژیک بهتری را دارا
می‌باشند.

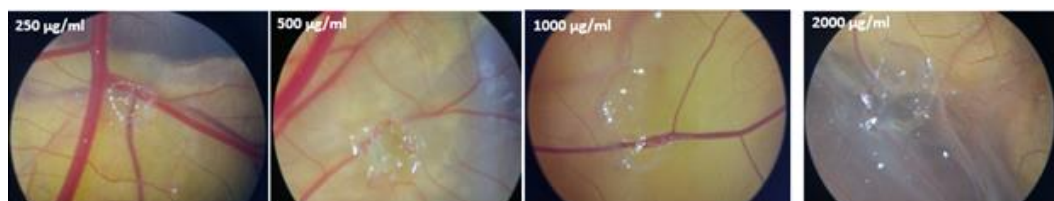
آنالیز نانوذرات اکسید روی با میکروسکوپ الکترونی
مورفولوژی نانوذرات اکسید روی سنتز شده با کمک FESEM
(شکل ۲) مورد بررسی قرار گرفت. تصویر نشان می‌دهد که
این ذرات دارای اشکال کروی، میله‌ای، صفحه‌ای با سطح



شکل ۲- تصویر حاصل از FESEM

یافته‌های حاصل از بررسی مورفولوژیک طول عروق و تعداد
انشعابات نشان داد که نانوذرات اکسید روی سنتز شده به
روش سبز باعث کاهش رگ‌زایی در پرده کوریوانتوتیک
جوجه شده است (شکل ۳).

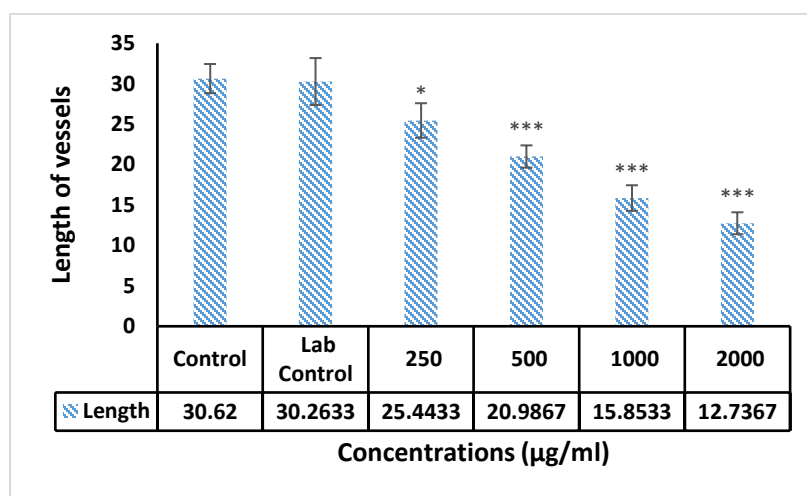
**اثر نانوذرات اکسیدروی سنتز شده با عصاره خرنوب بر
تعداد و طول عروق پرده کوریوانتوتیک**



شکل ۳- بررسی مورفولوژیک رگ‌های پرده کوریوانتوتیک جوجه در گروه‌های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و نمونه‌های تیماری با غلظت‌های
۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات اکسید روی پوشش یافته با عصاره خرنوب در زیر استریومیکروسکوپ

نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش سبز با گروه شاهد (۳۰/۶۲±۱/۰۴) ، نشان داد که طول عروق در گروه تحت تیمار با غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات اکسید روی تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ دارد و با افزایش غلظت نانوذره میزان معنی‌داری به صورت چشمگیری ($P < 0.001$) افزایش می‌یابد (نمودار ۱).

بررسی تغییرات طول عروق خونی در تیمار با نانوذره
مقایسه میانگین طول عروق، تعداد انشعابات عروق، طول و وزن جنین در نمونه شاهد در مقایسه با شاهد آزمایشگاهی تفاوت چشمگیری با یکدیگر نداشتند ($P \geq 0.05$).
مقایسه میانگین طول عروق در گروه‌های تیمار با غلظت‌های ۲۵۰ (۲۵/۴۳±۱/۲) ، ۵۰۰ (۲۰/۹۸±۰/۷۹) ، ۱۰۰۰ ، ۲۰۰۰ (۱۵/۸۵±۰/۹۱) و ۲۰۰۰ (۱۲/۷۳±۰/۷۸) میکروگرم از

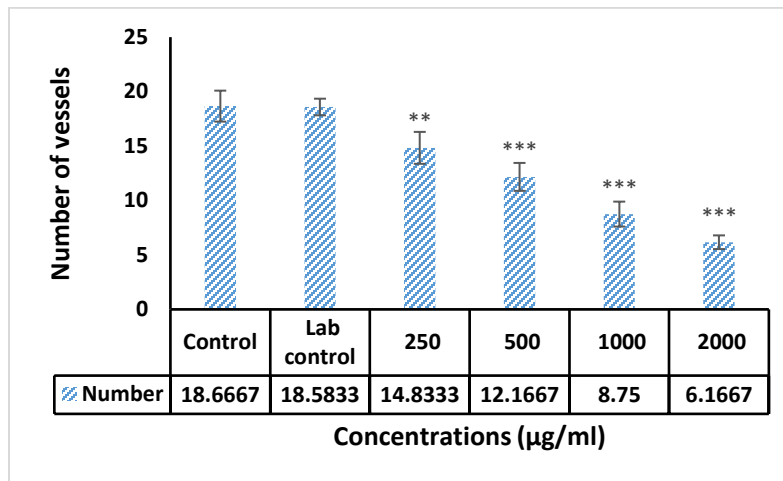


نمودار ۱- میانگین طول عروق پرده کوریوالانتوتیک جنین جوجه در گروه‌های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و نمونه‌های تیماری با غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات اکسید روی پوشش یافته با عصاره خرنوب داده‌ها بیانگر انحراف معیار ± میانگین هستند.

$P < 0.05$ * و $P < 0.001$ ***

۱۰۰۰ (۸/۷±۰/۶۶) و ۲۰۰۰ (۶/۱۶±۰/۳۶) میکروگرم از نانوذره با گروه شاهد (۱۸/۶۶±۰/۸۲) ، نشان داد که تعداد انشعابات عروق در گروه تحت تیمار با شاهد تفاوت معنی‌دار در سطح دارد. (نمودار ۲).

بررسی تغییرات تعداد انشعابات عروق خونی در تیمار با نانوذره
مقایسه میانگین تعداد انشعابات عروق در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۲۵۰ (۱۴/۸۳±۰/۸۴) ، ۵۰۰ (۱۲/۱۶±۰/۷۴) ،

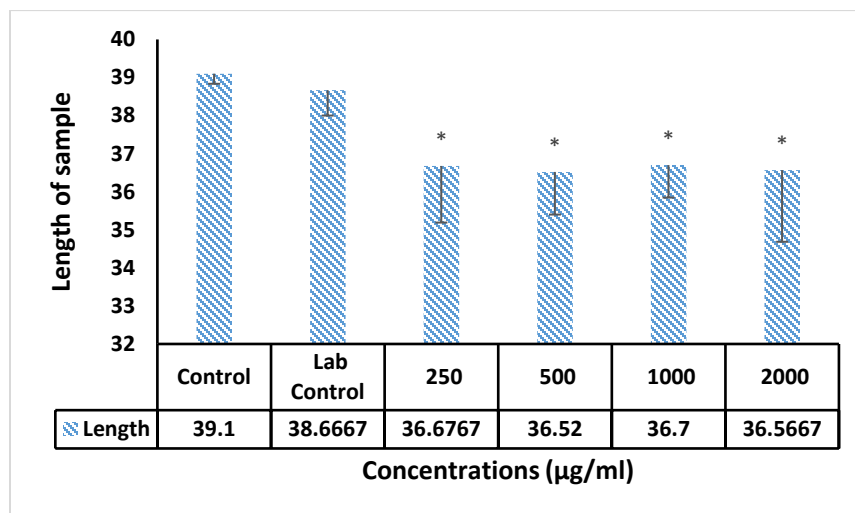


نمودار ۲- میانگین تعداد عروق پرده کوریوالانتویک جنین جوجه در گروه‌های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و نمونه‌های تیماری با غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات اکسیدروی سنتز شده با عصاره خرنوب
 $P < 0.01$ ** و $P < 0.001$ ***

میلی متر) میکروگرم از نانوذره با گروه شاهد (39.1 ± 0.15)
 میلی متر)، نشان داد که در تمام گروه‌های تحت تیمار، طول جنین در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$) (نمودار ۳).

اثر تیمار با نانوذره بر قد جنین‌ها

مقایسه حاصل از اندازه طول جنین (از فرق سر تا نشیمنگاه) بر حسب میلی‌متر در گروه‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۲۵۰ (36.67 ± 0.85 میلی متر)، ۵۰۰ (36.52 ± 0.64 میلی متر)، ۱۰۰۰ (36.7 ± 0.49 میلی متر) و ۲۰۰۰ (36.56 ± 1.08 میلی متر)

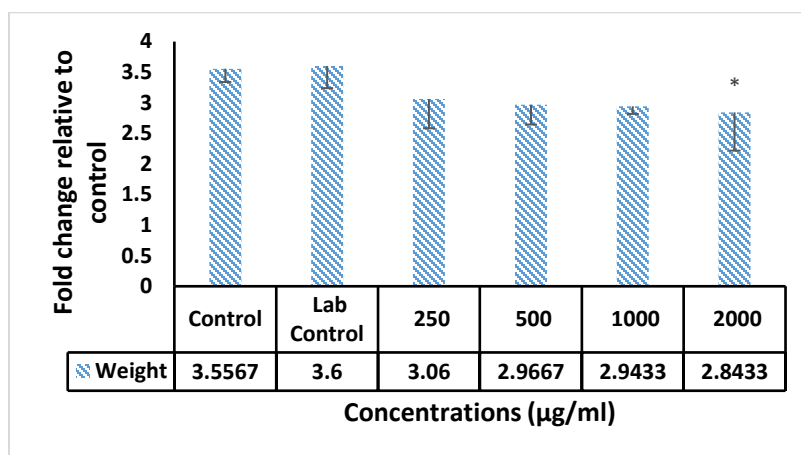


نمودار ۳- میانگین طول جنین جوجه بر حسب میلی متر در گروه‌های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و نمونه‌های تیماری با غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ میکروگرم/میلی لیتر نانوذرات اکسیدروی سنتز شده با عصاره خرنوب
 $P < 0.05$ *

بررسی اثر تیمار با نانوذره بر وزن جنین‌ها

مقایسه نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن جنین‌ها بر حسب گرم در تمام گروه‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی پوشش یافته با خرنوب نشان داد که تنها در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تفاوت معنی‌دار با گروه

شاهد وجود دارد ($P < 0.05$) همانگونه که نمودار ۴ نشان می‌دهد در غلظت‌های پایین‌تر از ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تغییرات میانگین وزن نسبت به گروه شاهد مشاهده ولی به لحاظ آماری معنی‌دار نشد.

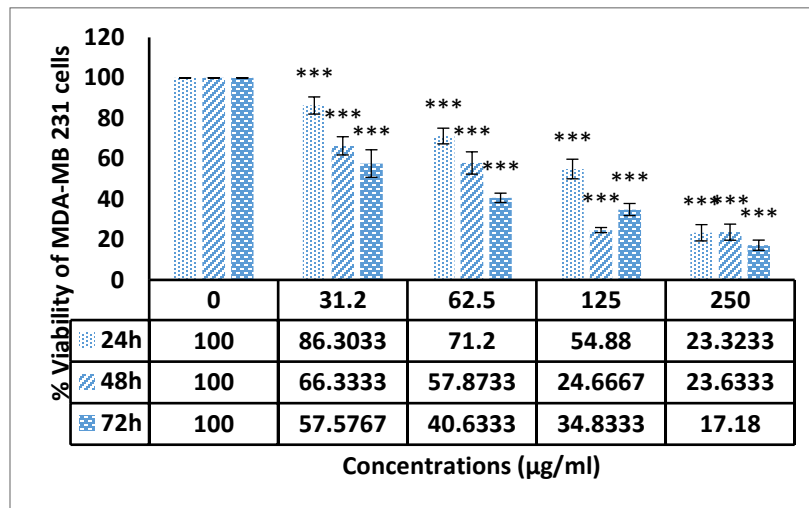


نمودار ۴- میانگین وزن جنین جوجه در گروه‌های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و نمونه‌های تیماری با غلظت‌های ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسیدروی سنتز شده با عصاره خرنوب
 $P < 0.05$ *

بررسی سمیت سلولی نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش سبز بر سلول‌های سرطان پستان MDA-MB231

نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که نانوذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره گیاه خرنوب قادر به مهار تکثیر سلول‌های سرطان پستان MDA-MB231 بوده و به صورت وابسته به دوز و زمان باعث القای سمیت سلولی در سلول‌های سرطانی

می‌شود. همانطور که در نمودار ۵ مشاهده می‌شود، نانوذرات اکسید روی در دوزهای (۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲.۵، ۳۱.۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با $P < 0.001$ باعث کاهش بقای سلول‌های سرطانی و اعمال اثر سیتوتوکسیک می‌شود. بررسی نمودار حاصل از MTT میزان IC50 را در سلول‌های MDA-MB231 در حدود ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان می‌دهد.



نمودار ۵- بررسی میزان زیستایی سلول‌ها با روش MTT پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسیدروی سنتز شده با عصاره گیاه خرنوب

*** $P < 0.001$; $n=3$ و داده‌ها بیانگر انحراف معیار \pm میانگین هستند

روی سلول‌های سرطان پستان MDA-MB-231 اثر مهارتی داشته و توسط القای آپوپتوز باعث از بین رفتن سلول‌های سرطان پستان می‌شود (۲۴). در مقاله حاضر نیز به طور مشابه اثر سیتوتوکسیک نانوذره سنتز شده از عصاره این گیاه بر سلول‌های سرطانی MDA-MB 231 بررسی و تایید شد. همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد عصاره خرنوب به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و مقابله با استرس اکسیداتیو دارای اثر ضد مالاریایی و آسیب کبدی ناشی از دیابت است. وجود ترکیبات پلی‌ساکاریدی در دانه خرنوب سبب کاهش قند خون، کلسترول، تری‌گلیسرید و نهایتاً کاهش رادیکال‌های آزاد می‌شود (۲۵).

در بررسی تاثیر نانوذرات اکسید روی از گیاه خرنوب، داده‌های بدست آمده نشان دهنده اثر ضد رگ‌زایی نانوذره بر غشای کوریوالانتوئیک جوجه به صورت وابسته به دوز است. نتایج نشان داد این نانوذرات در غلظت‌های ۲۵۰-۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور چشمگیری باعث کاهش تعداد و طول عروق و کاهش اندازه و وزن بدن جنین می‌شود.

بحث

سنتز نانوذرات توسط روش‌های مختلف شیمیایی، فیزیکی و زیستی صورت می‌گیرد. سنتز این ترکیبات به روش سبز به دلیل بکارگیری ترکیبات گیاهی به عنوان پوشش دهنده در واکنش احیای نانوذرات باعث کاهش عوارض جانبی ترکیبات شیمیایی می‌شود. گیاهان دارویی غنی از مولکول‌های زیستی هستند که به دلیل دارا بودن خواص احیایی قوی و گرایش بالا برای جذب سطحی نانوذرات فلزی، پایداری قوی و زیست‌تخریب‌پذیری در سنتز نانوذرات فلزی مورد توجه هستند؛ بنابراین روش‌های بیوسنتزی با استفاده از عصاره گیاهان به عنوان تکنیکی ساده، موثر و مناسب در سنتز نانوذرات در علم نانوتکنولوژی مورد توجه قرار گرفته است (۹). در این مطالعه از عصاره گیاه خرنوب به عنوان عامل کاهنده و پایدار کننده قوی در سنتز نانوذرات روی استفاده شد و اثر سیتوتوکسیک و ضد رگ‌زایی این نانوذرات مورد مطالعه قرار گرفت. مطالعات نشان داده است عصاره متانولی خرنوب به دلیل دارا بودن پلی‌فنول‌ها، توکوفرول، استروئول‌های گیاهی و آنتی‌اکسیدان‌ها بر



از آنجاکه رگ‌زایی گام مهمی در توسعه و متاستاز سرطان است، تلاش‌های زیادی برای مهار این فرآیند صورت گرفته است. فناوری نانو نیز در این زمینه از طریق سنتز نانوذرات مختلف وارد شده و برای مهار رگ‌زایی استفاده می‌شود، اما نتایج به دست آمده متنوع است. هر دو خصوصیت پیشبرنده رگ‌زایی و یا ضد رگ‌زایی در ارتباط با نانوذرات سنتز شده در مطالعات دیده می‌شود (۲۶). با این وجود اکثر مطالعات انجام گرفته بر روی اثرات ضد رگ‌زایی نانوذرات نقره و طلا می‌باشد و مطالعات اندکی بر روی خصوصیت رگ‌زایی نانوذرات روی صورت گرفته است (۲۷-۲۹).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ توسط دیویا^۱ و همکاران انجام شد اثر ضد رگ‌زایی نانوذره اکسید روی پوشش داده شده با ژلاتین با استفاده از تست CAM مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که نانوذره مورد بررسی به طور معنی‌داری سبب کاهش رگ‌زایی شد (۳۰) که با نتیجه بدست آمده در مطالعه حاضر مشابه و قابل مقایسه می‌باشد. با توجه به یافته‌های مطالعات مذکور می‌توان در نظر داشت که اثرات زیستی نانوذرات سنتز شده با توجه به عصاره‌های مختلف مورد استفاده در روند سنتز می‌تواند متفاوت باشد. مطالعات دیگری در زمینه اثرات رگ‌زایی نانوذرات فلزی دیگر نیز انجام شده است. برای مثال در بررسی انجام شده توسط مجیدی فرد و همکاران اثر نانوذرات اکسید منگنز بر کاهش تعداد و طول عروق پرده کوریوالانتوییک از طریق القای استرس اکسیداتیو در سلولهای اندوتلیال اثبات شده است (۳۱). در بررسی انجام شده در سال ۲۰۱۴ توسط بهارآرا و همکاران نشان داده شد که نانوذره نقره سنتز شده به روش سبز از گیاه *Achillea biebersteinii* به طرز چشمگیری سبب کاهش میزان رگ‌زایی در پرده کوریوالانتوییک جوجه می‌شود و طول و تعداد

عروق خونی را بصورت معنی‌داری کاهش می‌دهد ($P < 0.01$) (۳۲).

به طور مشابه در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۴ اثر ضد رگ‌زایی زایی نانوذره نقره سنتز شده از *Saliva officinalis* بر رگ‌زایی پرده کوریوالانتوییک جوجه بررسی شد و در ادامه فاکتورهای همچون قد و وزن جنین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی نشان داد که در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذره در مورد هر ۴ متغیر مورد بررسی از قبیل طول و انشعابات عروق و قد و وزن جنین کاهش معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$ و $P < 0.01$) (۳۳). در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که فاکتورهای طول و تعداد انشعابات و قد جنین از غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به بالا تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$ و $P < 0.001$) را در گروه شاهد با گروه‌های تحت تیمار نشان می‌دهد که قابل مقایسه با مطالعه بهارآرا می‌باشد (۳۳).

در مورد اثرات سمی نانوذرات اکسید روی در مهار رگ‌زایی می‌توان چنین فرض نمود که این نانوذرات از طریق تاثیر منفی بر سلول‌های اندوتلیال اثر خود را ایفا نموده است. بر اساس گزارشات قبلی نانوذرات فلزی با تاثیر بر میتوکندری و افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری باعث القای استرس اکسیداتیو و اعمال اثر سیتوتوکسیک در سلول‌های اندوتلیال می‌شود (۳۴). گجوا^۲ در سال ۲۰۰۶ اثر نانوذرات اکسیدروی سنتز شده به روش شیمیایی را در مهار سلولهای اندوتلیال آنورتی نشان داد. در مورد اثر سیتوتوکسیک نانوذرات فلزی، مطالعات نشان داده است که نانوذرات در دوزهای پایین از طریق القای آپوپتوز و در دوزهای بالاتر از طریق القای نکروز باعث راه اندازی مرگ سلولی می‌شود (۳۵).

^۲Gojova

^۱Divya

سلول‌های سرطان پستان به اثبات رسیده است و از طرفی ثابت شده است که نانوذرات روی سنتز شده به روش شیمیایی نیز دارای اثر سیتوتوکسیک هستند بنابراین پوشش دهی این نانوذرات با عصاره خرنوب می‌تواند با کاهش عوارض جانبی در القای اثر ضد سرطان این نانوذرات تاثیر بسزایی داشته باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد نانوذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره خرنوب دارای اثر کشندگی سلول‌های سرطان پستان هستند. همچنین این نانوذرات موجب مهار رگ‌زایی در مدل پرده کوریوالانتوتیک و مهار سلول‌های سرطانی می‌شوند.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به این موضوع اشاره کرد که بررسی سمیت نانوذره به صورت *in vitro* انجام گرفته و در آینده باید مطالعه‌ای طراحی کرد تا این بررسی به صورت *in vivo* نیز انجام پذیرد. علاوه بر این خصوصیات بیولوژیکی دیگر نانوذره اکسید روی سنتز شده با عصاره آبی گیاه خرنوب می‌تواند بر رده‌های سلول سرطانی مختلفی مورد بررسی قرار گیرد تا تاثیرات بیولوژیکی بیشتری از آن نمایان شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش برگرفته از نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی به شماره ۱۶۱۵۵ می‌باشد و نویسندگان مراتب قدردانی و سپاس خود را از کلیه همکاران محترم دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی مشهد جهت حمایت این کار ابراز می‌دارند.

نتایج حاصل از بررسی اثر سمیت نانوذره سنتز شده از گیاه خرنوب بیانگر اثر بازدارنده تکثیر این نانوذرات بر رده MDA-MB231 با IC50 حدود ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد. نتایج پژوهش‌های قبلی نشان داده است که پوشش دهی نانوذرات اکسید روی با اعمال استرس اکسیداتیو و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند باعث افزایش سمیت سلولی شود. همچنین اثر سمی نانوذرات اکسیدروی بر فیبروبلاست‌های ریوی نیز مشاهده شده است (۳۶). مهدوی راد و همکاران اثر ضد سرطان نانوکامپوزیت اکسیدروی و ترکیب نانو نقره با اکسیدروی را بر سلول‌های بدخیم ملانومایی A-375 در حد میکرومولار نشان دادند (۳۷).

سارانی^۱ و همکاران از عصاره آبی برگ *Musa ornate*, *Zea mays* به عنوان عوامل تثبیت کننده نانوذرات اکسیدروی استفاده نموده و نشان دادند که نانوذرات پوشش یافته اکسید روی بسته به غلظت، زمان واکنش و نوع سلول قادر به اعمال اثر سیتوتوکسیک هستند (۳۸). همچنین محققین از عصاره آبی جلبک قهوه‌ای برای پوشش دهی نانوذرات اکسید روی استفاده کردند و نشان دادند که عصاره جلبک قهوه‌ای به عنوان یک احیا کننده قوی باعث ثبات نانوذرات شده و از طریق القای آپوپتوز باعث اعمال اثر توکسیک روی سلول‌های سرطانی موشی می‌شود (۳۹ و ۴۰).

تحقیقات نشان داده است که ترکیبات طبیعی می‌توانند از طریق تاثیر بر بیان فاکتور رشد آندوتلیال عروقی^۲ و ماتریکس متالوپروتئیناز^۳ باعث مهار رگ‌زایی در غشای کوریوالانتوتیک جوجه شوند. از آنجا که اثر سیتوتوکسیک عصاره خرنوب علیه

^۲Vascular endothelial growth factor: VEGF

^۳Matrix metalloproteinase 9: MMP-9

^۱Saranya

References

1. Bhat TA, Singh RP. Tumor angiogenesis—a potential target in cancer chemoprevention. *Food Chem Toxicol* 2008;46(4):1334-45.
2. Vinoth Prabhu V, Chidambaranathan N, Gopal V. A historical review on current medication and therapies for inducing and inhibiting angiogenesis. *J Chem Pharm Res* 2011;3(2):526-33.
3. Unsicker K, Kriegelstein K, editors. Cell signaling and growth factors in development: From molecules to organogenesis. Wiley-VCH; 2006.
4. Jahani M, Modaresi MH, Mansouri K. Hypoxia inducible factor & 58; It's role in angiogenesis and tumor. *Tehran Univ Med J* 2016;73(11):757-66. [Persian]
5. Baharara J, Amini E, Mousavi M. The anti-proliferative and anti-angiogenic effect of the methanol extract from brittle star. *Rep Biochem Mol Biol* 2015;3(2):68-75.
6. Reinmuth N, Liu W, Jung YD, Ahmad SA, Shaheen RM, Fan FA, *et al.* Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival. *FASEB J* 2001;15(7):1239-41.
7. 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. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(24):1875-87.
8. Ernberg IT. Oncogenes and tumor growth factors in breast cancer: A mini review. *Acta Oncol* 1990;29(3):331-4.
9. Otrrock ZK, Hatoum HA, Musallam KM, Awada AH, Shamseddine AI. Is VEGF a predictive biomarker to anti-angiogenic therapy?. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011;79(2):103-11.
10. Li J, Qiu DM, Chen SH, Cao SP, Xia XL. Suppression of human breast cancer cell metastasis by coptisine in vitro. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(14):5747-51.
11. Bedi P, Kaur A. An overview on uses of zinc oxide nanoparticles. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2015;4(12):1177-96.
12. Soltani M, Parivar K, Baharara J, Kerachian MA, Asili J. Putative mechanism for apoptosis-inducing properties of crude saponin isolated from sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) as an antioxidant compound. *Iran J Basic Med Sci* 2015;18(2):180-7.
13. Wagner V, Dullaart A, Bock AK, Zweck A. The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotechnol* 2006;24(10):1211-7.
14. Banerjee D, Harfouche R, Sengupta S. Nanotechnology-mediated targeting of tumor angiogenesis. *Vascular cell* 2011;3(1):3.
15. Kumar YP, King P, Prasad VS. Removal of copper from aqueous solution using *Ulva fasciata* sp.—a marine green algae. *J Hazard Mater* 2006;137(1):367-73.
16. Battle I, Tous J. Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Bioversity International; 1997. Available from: https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/migrated/uploads/tx_news/Carob_tree_Ceratonia_siliqua_L_347.pdf
17. Avallone R, Plessi M, Baraldi M, Monzani A. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *J Food Compost Anal* 1997;10(2):166-72.
18. Owen RW, Haubner R, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, *et al.* Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food Chem Toxicol* 2003;41(5):703-17.
19. Custódio L, Fernandes E, Escapa AL, López-Avilés S, Fajardo A, Aligué R, *et al.* Antioxidant activity and in vitro inhibition of tumor cell growth by leaf extracts from the carob tree (*Ceratonia siliqua*). *Pharmaceutical biology* 2009;47(8):721-8.
20. Yedurkar S, Maurya C, Mahanwar P. Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Ixora Coccinea* Leaf Extract—A Green Approach. *Open Journal of Synthesis Theory and Applications* 2016;5:1-14.
21. Thirumavalavan M, Huang KL, Lee JF. Preparation and morphology studies of nano zinc oxide obtained using native and modified chitosans. *Materials (Basel)* 2013;6(9):4198-212.
22. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo assay to study antiangiogenesis. *Pharmaceuticals (Basel)* 2010;3(3):482-513.

23. Namvar F, Rahman HS, Mohamad R, Baharara J, Mahdavi M, Amini E, *et al.* Cytotoxic effect of magnetic iron oxide nanoparticles synthesized via seaweed aqueous extract. *Int J Nanomedicine* 2014; 9:2479-88.
24. Custodio L, Fernandes E, Escapa AL, López-Avilés S, Fajardo A, Aligue R, *et al.* Antiproliferative and apoptotic activities of extracts from carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Planta Med* 2008;74(09):PA48.
25. Custodio L, Marques L, Mayor A, Alonso P, Albericio F, Romano A. Evaluation of the antimalarial activity of extracts of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Planta Med* 2008;74(09):PA49.
26. Augustine R, Dominic EA, Reju I, Kaimal B, Kalarikkal N, Thomas S. Investigation of angiogenesis and its mechanism using zinc oxide nanoparticle-loaded electrospun tissue engineering scaffolds. *RSC Advances* 2014;4(93):51528-36.
27. Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, BarathManiKanth S, Haribalaganesh R, Ramkumarpanidian 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.
28. 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.
29. Gurunathan S, Lee K-J, Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, Vaidyanathan R, Eom SH. Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. *Biomaterials* 2009;30(31):6341-50.
30. Divya M, Vaseeharan B, Abinaya M, Vijayakumar S, Govindarajan M, Alharbi NS, *et al.* Biopolymer gelatin-coated zinc oxide nanoparticles showed high antibacterial, antibiofilm and anti-angiogenic activity. *J Photochem Photobiol B* 2018;178:211-8.
31. Majidifard M, Hassanpour-Ezatti M. Anti-angiogenic effect of MnO₂ nanoparticles on chicken chorioalantoic membrane. *Daneshvar Medicine* 2016;23(121):21-8.
32. Baharara J, Namvar F, Mousavi M, Ramezani T, Mohamad R. Green synthesis of silver nanoparticles using *Achillea biebersteinii* flower extract and its anti-angiogenic properties in the rat aortic ring model. *Molecules* 2014;19(4):4624-34.
33. 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.
34. Kodiha M, Wang YM, Hutter E, Maysinger D, Stochaj U. Off to the organelles-killing cancer cells with targeted gold nanoparticles. *Theranostics* 2015;5(4):357-70.
35. Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM, Barakat AI. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environ Health Perspect* 2007;115(3):403-9.
36. Ng CT, Yong LQ, Hande MP, Ong CN, Yu LE, Bay BH, *et al.* Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung fibroblasts and *Drosophila melanogaster*. *Int J Nanomedicine* 2017;12:1621-37.
37. Mahdavradd M, Najafzadeh N, Ali Niapour A, Jafari A. Cytotoxicity of ZnO and Ag/ZnO nano-composites on malignant melanoma cell line (A375). *AMUJ* 2014;17(6):74-83.
38. Saranya S, Vijayarani K, Pavithra S, Raihana N, Kumanan K. In vitro cytotoxicity of zinc oxide, iron oxide and copper nanopowders prepared by green synthesis. *Toxicol Rep* 2017;4:427-30.
39. Namvar F, Rahman HS, Mohamad R, Azizi S, Tahir PM, Chartrand MS, Yeap SK. Cytotoxic effects of biosynthesized zinc oxide nanoparticles on murine cell lines. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015.
40. Mahmoodi MR, Mashayekh M, Entezari MH. Fortification of wheat bread with 3-7% defatted soy flour improves formulation, organoleptic characteristics, and rat growth rate. *Int J Prev Med* 2014;5(1):37-45.



Evaluation of the cytotoxic effect of green-synthesized Zinc Oxide nanoparticles with *Ceratonia siliqua* extract on the breast cancer cell line (MDA-MB231) and its antiangiogenic effects

Asieh Sadat Raeisalsadati¹, Vahid Pouresmaeil^{*2}, Ali Neamati¹

1. Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2. Department of Biochemistry, Mashhad Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Original Article

Received: 7 Jul, 2018

Accepted: 28 May, 2019

***Corresponding Author:**

Vahid Pouresmaeil, Mashhad,
Emam Khomeini 14 St,
Faculty of Medicine

TEL:

Email:

v.pouresmaeil@mshdiau.ac.ir

ABSTRACT

Introduction

Green biosynthesis of the metallic nanoparticles is considered as one of the effective method for cancer treatment with minimum side effects. The objective of this study was the evaluation of cytotoxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles synthesized with *Ceratonia siliqua* extract on the breast cancer cells and assessment of anti-angiogenesis properties of these nanoparticles in the chorioallantoic model (CAM).

Methods & Materials

In this investigation, the MDA-MB231 cancer cells line was treated for 24, 48 and 72 hours at different concentrations of ZnO nanoparticles (31.2 to 250 µg/ml) synthesized with *Ceratonia siliqua* extract and the percentage of cell viability was evaluated using an MTT assay. In addition, to determine the anti-angiogenesis effect, Ross Fertilized Chicken eggs were used in the CAM assay. After 12 days, the vessel number, vessels length, embryo length, and weight were measured.

Results

The findings showed that the green synthesized ZnO nanoparticle induces a cytotoxicity effect on breast cancer cell line ($P \leq 0.001$) depended in dose and time. The IC₅₀ values were found about 62.5 µg/ml. Evaluation of angiogenesis in the CAM model showed that ZnO nanoparticles in the dose ratio used, significantly reduced the number of vessels ($P \leq 0.01$); ($P \leq 0.001$) and the length of the vessels ($P \leq 0.001$); ($P \leq 0.05$) and embryo size ($P \leq 0.05$) and embryo weight ($P \leq 0.05$) only in the high-dose).

Conclusion

ZnO nanoparticles synthesized with *Ceratonia siliqua* extract having a cytotoxic effect on breast cancer cells and anti-angiogenic effect can be an appropriate candidate in cancer treatment.

Keywords

zinc oxide nanoparticles, cytotoxicity, angiogenesis, MDA-MB231, *Ceratonia siliqua*

► **Please cite this article as:** Raeisalsadati AS, Pouresmaeil V, Neamati A. Evaluation of the cytotoxic effect of green-synthesized zinc oxide nanoparticles with *Ceratonia siliqua* extract on the breast cancer cell line (MDA-MB231) and its antiangiogenic effects. J Neyshabur Univ Med Sci 2019;7(2):58-72.