

اثر ضد رگ زایی نانوذرات اکسید منگنز بر غشای کوریونوآلانتوئیس جوجه

نویسندگان: منصوره مجیدی فرد، مجید حسن پور عزتی*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

E-mail: hassanpour@shahed.ac.ir

* نویسنده مسئول: مجید حسن پور عزتی

چکیده

مقدمه و هدف: به تازگی، نشان داده شده است که نانوذرات فلزی بدون پوشش، دارای توانایی مهار رگ زایی هستند. در این پژوهش، خاصیت ضد رگ زایی نانوذره دی اکسید منگنز بدون پوشش در مدل غشای کوریونوآلانتوئیس جنین جوجه مورد پژوهش واقع می شود.

مواد و روش ها: تخم مرغ های نطفه دار به پنج گروه (n=10) شاهد و دریافت کننده غلظت های (۱ و ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم و ۱ میکروگرم) نانوذره اکسید منگنز تقسیم شدند. روز هشتم، پس از انکوباسیون، یک دیسک کاغذی بر روی CAM قرار داده شد که در گروه کنترل، حاوی PBS و در دیگر گروه ها، حاوی غلظت های متفاوتی از نانوذره بود. در روز دهم، تمام نمونه ها مورد عکس برداری قرار گرفتند. تعداد انشعابات و طول عروق خونی در تصاویر میکروسکوپی توسط نرم افزار ImageJ کمی شدند.

نتایج: اکسید منگنز در غلظت ۱ نانوگرم در مقایسه با گروه کنترل بر میانگین تعداد انشعابات و طول عروق خونی معنی دار نبود؛ در حالی که تجویز غلظت های ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم و ۱ میکروگرم نانوذره، به طور افزایش یابنده ای سبب کاهش معنی دار ($p < 0.01$) این متغیرهای مورد اندازه گیری شد.

نتیجه گیری: این نتایج گویای فعالیت ضد رگ زایی نانوذره MnO_2 بدون پوشش است. این نانوذره دارای خاصیت اکسید کننده قوی است. برخی نانوذرات اکسید فلزی، اثرات سمیت سلولی و آپتوزی بر سلول های اندوتلیوم از طریق القای استرس اکسیداتیو نشان داده اند. رگ زایی به عنوان یک وضعیت استرس اکسیداتیو محسوب می شود؛ لذا فعالیت ضد رگ زایی این نانوذره احتمالاً می تواند ناشی از فعال سازی فرایندهای اکسیداتیو در CAM باشد.

واژگان کلیدی: نانوذره، دی اکسید منگنز، سنجش غشای کوریونوآلانتوئیس، مهارگرهای رگ زایی.

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و سوم-شماره ۲۱
اسفند ۱۳۹۴

دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۷
آخرین اصلاح ها: ۱۳۹۴/۱۱/۲۷
پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۰۳

مقدمه

رگ‌زایی (Angiogenesis) فرایندی است که در طی آن، مویرگ‌های جدید از رگ‌های موجود ایجاد می‌شوند (۱). این پدیده اساس تعداد زیادی از فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک چون بارداری، ترمیم زخم، دیابت و انواع سرطان است.

شناخته‌شده‌ترین کاربرد نانوذرات فلزی در زیست‌شناسی و پزشکی، اتصال آنتی‌بادی‌ها به آن‌ها به‌عنوان حاملین دارو، شناساگرهای زیستی سلول‌های سرطانی یا به‌منظور مهار رگ‌زایی و درمان سرطان است. ازجمله این نانوذرات فلزی می‌توان به نانوذرات طلا، نقره، اکسید روی و تیتانیوم اشاره کرد. اتصال بین نانوذرات فلزی با آنتی‌بادی‌ها توسط روش‌های زیست‌نانوفناوری صورت گرفته و به‌این‌ترتیب نانوذرات برهنه یا بدون پوشش به فرم پوشش‌دار تبدیل می‌شوند (۲). پژوهش‌ها به‌تازگی نشان داده‌اند که نانوذرات فلزی بدون پوشش (Bare nanoparticles) یا برهنه (Naked nanoparticles) نیز فاقد خواص زیستی نبوده و برخی از آن‌ها دارای خاصیت مهار رگ‌زایی هستند (۳). این یافته‌ها سبب شده است تا پژوهشگران به مطالعه اثرات نانوذرات فلزی بدون پوشش حال هدفمند شده یا غیرهدفمند (Targeted and non-targeted) بر مهار رگ‌زایی بپردازند (۴، ۳).

اساس پدیده رگ‌زایی مهاجرت سلول‌های اندوتلیال است (۵). مهار این فرایند به‌عنوان عملکرد بنیادین اغلب روش‌ها و داروهای ضدتوموری در نظر گرفته می‌شود (۶). امروزه مشخص شده است که بخش عمده‌ای از مکانیسم‌های دخیل در شروع و پیشرفت رگ‌زایی در سلول‌های اندوتلیال به تغییر در تعادل سیستم ردوکس وابسته هستند (۷)؛ بدین ترتیب ترکیبات دارای اثر تعدیلی بر تعادل ردوکس در سلول‌ها می‌توانند اثرات درمانی قابل‌توجهی بر فرایندهای پاتوفیزیولوژیک وابسته به رگ‌زایی مانند سرطان از خود نشان دهند (۸). دانشمندی به نام Alili و همکارانش در تأیید این مطلب نشان دادند تجویز نانوذرات مؤثر بر سیستم ردوکس

می‌تواند به تنظیم کاهشی در رشد و متاستاز تومورها منجر شود (۹). علاوه بر این مکانیسم، تومورهای سرطانی می‌توانند ازطریق ترشح فاکتورهای رشد، مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروق (Vessel Endothelial Growth Factor) یا (VEGF) و فاکتور رشد فیروبلستی (Fibroblast Growth Factor) یا (FGF)، باعث تحریک جوانه‌زنی رگ‌ها شوند. مهار این فاکتورها توسط برخی نانوذرات فلزی به‌عنوان مکانیسم ضد رگ‌زایی این نانوذرات مطرح شده است؛ برای مثال گزارش شده است که نانوسرا (Nanoceria) یا نانوذره اکسید سریم (Cerium Oxide) در حالت بدون پوشش می‌تواند با ایجاد اختلال در تولید برخی فاکتورهای رشد، سبب مهار رگ‌زایی در سلول‌های سرطان تخمدان شود (۱۰). به‌عنوان مثالی دیگر از خاصیت ضد رگ‌زایی نانوذرات اکسید فلزی می‌توان به اثر ضد رگ‌زایی نانوذره نقره بدون پوشش اشاره کرد (۱۱). مشخص شده است که نانوذره فلزی نقره و همچنین طلا ازطریق سرکوب فاکتور رشد اندوتلیال، عروقی سبب مهار رگ‌زایی می‌شوند (۱۲، ۱۳). ادعا شده است که بسیاری از میانجی‌های التهابی رها شده از سلول‌های ماست نظیر فاکتور سلول‌های بنیادی (Stem Cell Factor) یا (SCF) و فاکتور رشد اپیتلیال (Epithelial Growth Factor) یا (EGF) و فاکتور رشد فیروبلستی (Fibroblast Growth Factors) یا (FGF) محرک رگ‌زایی هستند (۱۴). پژوهش Arvizo و همکارانش در سال ۲۰۱۳، در ارتباط با اثر تجویز نانوذرات طلای بدون پوشش بر محیط کشت سلول‌های سرطانی مشخص کرده است که این نانوذرات می‌توانند باعث مهار برخی از این فاکتورهای رشد شده و بدین‌طریق از رشد و متاستاز سلول‌های توموری جلوگیری کنند (۱۵). اثر تحریکی نانوذره اکسید تیتانیوم (TiO₂) بر بیان فاکتورهای درون‌زاد ضد رگ‌زایی چون اینترفرون‌ها، اینترلوکین‌ها، مهارگرهای ماتریکس متالوپروتینازها و اجزای پروتولیتیک در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون انسان، مثال دیگری از مکانیسم‌هایی

دارای ابعادی بین ۲۵ تا ۸۵ نانومتر بوده و مشخصات و مراحل تولید آن‌ها قبلاً^۱ گزارش شده است (۲۳). باتوجه به اینکه غلظت‌های سمی این نانوذره، توسط مطالعات سم‌شناسی پیش از این مشخص شده است (۲۴)، در این پژوهش تصمیم گرفته شد تا اثر تجویز غلظت‌های ۱ و ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم و ۱ میکروگرم از این نانوذره بر غشای کوریونوآلانتوئیس مورد ارزیابی قرار گیرد.

آماده‌سازی دیسک‌های کاغذی آغشته به نانوذره

دیسک‌های کوچک از کاغذ فیلتر (Whatman filter paper)، با ابعاد حدود ۵ میلیمتر در ۵ میلی‌متر بریده شده و توسط اتوکلاو استریل شدند. این دیسک‌های کاغذی هشت روز پس از شروع انکوباسیون تخم‌مرغ‌ها، در دستگاه جوجه‌کشی بر روی غشای کوریونوآلانتوئیس جنین جوجه‌ها قرار داده شدند.

آماده‌سازی غشای کوریون-آلانتوئیس جوجه

در این آزمایش، از روش لیو^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۳ استفاده شد (۲۵). تعداد ۵۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار نژادهای لاین (Hy-Line- W36) از شرکت مرغک کرج تهیه و به‌طور تصادفی، به ۵ گروه، هر گروه شامل ۱۰ عدد تخم‌مرغ تقسیم شدند. گروه‌های مورد مطالعه شامل: گروه شاهد که بافر PBS (۱۰۰ میکرولیتر) بر کاغذ فیلتر، در سطح غشای کوریونوآلانتوئیس آن‌ها تجویز می‌شد و گروه‌های تیمار با نانوذره اکسید منگنز که غلظت‌های (۱ و ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم و ۱ میکروگرم) این نانوذره را دریافت می‌کردند. تخم‌مرغ‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه توسط الکل ۷۰ استریل شده و درون دستگاه جوجه‌کشی اتوماتیک خانگی گلدن ککس (مدل ۴۲۰۰) ساخت کشور هلند در دمای $37/5 \pm 1$ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰ درصد براساس راهنمای استاندارد استفاده از دستگاه جوجه‌کشی قرار گرفتند. تخم‌مرغ ابتدا تحت تابش نور کم و در درون دستگاه جوجه‌کشی نگهداری شدند. بدین ترتیب، جنین و عروق خونی اطراف آن‌ها قابل ارزیابی و مشاهده بود. سپس در روز سوم،

است که نانوذرات فلزی از آن طریق می‌توانند سبب مهار رگ‌زایی شوند (۱۶). براساس آنچه تاکنون ذکر شد، به‌نظر می‌رسد نانوذرات فلزی و به‌خصوص، نانوذرات اکسیدهای فلزی از طریق مکانیسم‌های متعدد و متنوعی قادرند تا رگ‌زایی را مهار کنند. درنهایت، باتوجه به تشابه مکانیسم‌های ملکولی کنترل‌کننده رگ‌زایی در انواع مهره‌داران عالی (۱۷)، پژوهشگران مدعی شده‌اند که پژوهش‌های صورت‌گرفته بر روی مدل‌هایی چون غشای کوریونوآلانتوئیس جنین جوجه، قابل استفاده و استناد به سلول‌های پستانداران نیز هست (۱۸)؛ ضمن اینکه ارزیابی اثر ترکیبات مختلف بر فرایند رگ‌زایی توسط مدل غشا کوریونوآلانتوئیس جنین جوجه، کم‌هزینه و سریع بوده و امکان استفاده آسان از این روش جهت مشاهده و دست‌کاری اهداف داخل عروقی، به‌راحتی امکان‌پذیر است؛ همچنین اعتبار این مدل برای ارزیابی ترکیبات مهارکننده رگ‌زایی با اثر تعدیلی بر سیستم ردوکس مورد تأیید واقع شده است (۱۹،۲۰).

اما تاکنون فقط اثر مهارکننده رگ‌زایی تعداد محدودی از نانوذرات فلزی مورد بررسی واقع شده است. نانوذره اکسید منگنز (MnO_2) از نظر صنعتی ترکیبی شناخته شده و دارای اثرات سمی است. همین امر سبب می‌شود تا این نانوذره اکسید فلزی به ترکیبی ایدئال برای بررسی اثرات ضدرگ‌زایی تبدیل شود (۲۱). پیش‌ازین، اثرات ضدسرطانی ترکیبی حاوی منگنز III ظرفیتی بر سرطان القاشده توسط تزریق سلول‌های سرطانی به موش سوری مورد بررسی و گزارش واقع شده است (۲۲). در عین حال گزارشی در ارتباط با اثر این نانوذره بر فرایند ردوکس در دست می‌باشد (۸).

لذا، در این پژوهش قصد داریم به ارزیابی اثر ضدرگ‌زایی نانو اکسید منگنز در مدل غشای کوریونوآلانتوئیس جنین جوجه بپردازیم.

مواد و روش‌ها

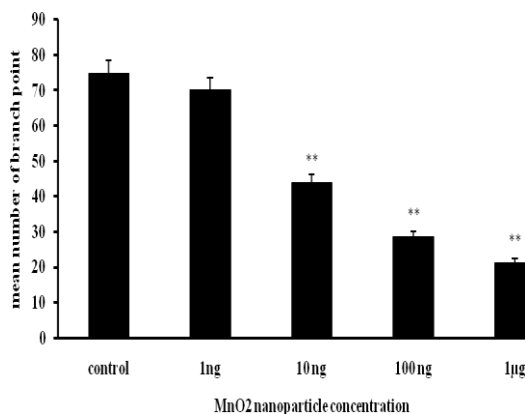
نانوذرات اکسید منگنز

نانوذرات اکسید منگنز به‌کاررفته در این پژوهش،

¹. Liu

یافته‌ها

مقایسه تغییر در تعداد انشعابات عروقی (شکل ۱) و تغییر در طول عروق خونی (شکل ۲)، در نمونه‌های دریافت‌کننده غلظت ۱ نانوگرم از نانوذره اکسید منگنز اختلاف معنی‌داری را با نمونه‌های گروه کنترل نشان نداد. درحالی‌که تعداد انشعابات عروقی در گروه‌های دریافت‌کننده غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم و ۱ میکروگرم در مقایسه با کنترل، کاهش معنی‌دار ($p < 0.01$) داشت و نشان‌دهنده اثر کاهش میزان رگ‌زایی به دنبال تجویز این دوزها از نانوذره بود. همچنین اثر این نانوذره در غلظت‌های ۱۰ نانوگرم تا ۱ میکروگرم بر کاهش تعداد انشعابات عروقی وضعیت وابسته به غلظت نشان داد. تغییر در طول عروق خونی (شکل ۲)، در نمونه‌های دریافت‌کننده غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم و ۱ میکروگرم در مقایسه با کنترل، کاهش معنی‌دار ($p < 0.01$) داشت؛ اما تجویز این غلظت‌ها بر کاهش طول عروقی وابسته به غلظت نبود.



شکل ۱. بررسی اثر تجویز غلظت‌های مختلف نانوذره دی‌اکسید منگنز بر تعداد انشعابات عروق خونی تشکیل شده در پرده کوریونوآلانتوئیس جنین تخم‌مرغ. تعداد انشعابات عروق خونی تشکیل‌شده در سطح غشا، به دنبال تجویز غلظت ۱ نانوگرم، تفاوت معنی‌داری را با گروه کنترل نشان نمی‌دهد؛ اما تجویز غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم و ۱ میکروگرم سبب کاهش معنی‌دار ($p < 0.01$) در مقایسه با گروه کنترل شد ($n=10$ ، ANOVA (One way)).

انکوباسیون به داخل محفظه یک هود لامینار دارای فیلتر حفا منتقل شده و مقدار ۳ میلی‌لیتر از سفیده تخم‌مرغ‌ها توسط سرنگ تخلیه شد. همچنین پنجره‌ای در یک سمت پوسته تخم‌مرغ‌ها، به منظور جداسازی غشای کوریونوآلانتوئیس از پوسته ایجاد شد و هر دو سوراخ ایجادی، توسط پارافیلیم پوشانده شدند. سپس تخم‌مرغ‌ها مجدداً به درون دستگاه انکوباتور برگردانده شدند. در روز هشتم، انکوباسیون پنجره‌ها در شرایط استریل برداشته شد. میزان ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS، بر روی فیلتر واقع بر سطح غشای کوریونوآلانتوئیس تخم‌مرغ‌های گروه شاهد ریخته شد. دوزهای مختلف نانوذره به این روش تهیه شدند که ابتدا نانوذره اکسید منگنز در دوزهای مختلف، در بافر PBS به صورت تازه به تازه و در همان روز آزمایش حل شده و سپس ۱۰ میکرولیتر گلیسرول به این محلول‌ها اضافه شده و به مدت یک دقیقه و رتکس شدند. محلول‌های با دوزهای ۱ و ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم و ۱ میکروگرم حاوی نانوذره اکسید منگنز ساخته شده و با حجم ۱۰۰ میکرولیتر، بر روی فیلتر کاغذی واقع در سطح غشای کوریونوآلانتوئیس ریخته شدند. سپس پنجره سطح تخم‌مرغ‌ها توسط پارافیلیم پوشانده و تخم‌مرغ‌ها به انکوباتور برگردانده شدند. در روز دهم، در تمام نمونه‌ها از محدوده محل تزریق عکس‌برداری شد.

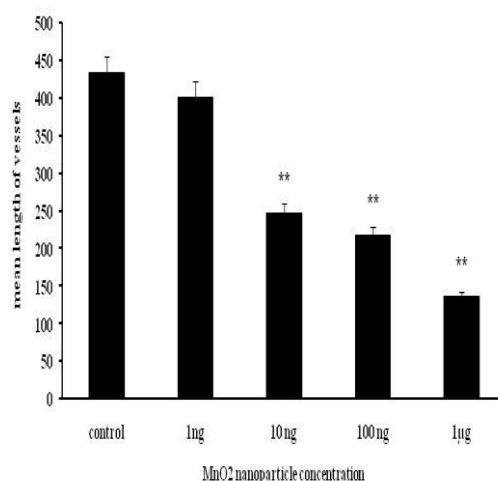
تجزیه و تحلیل آماری

تعداد انشعابات و طول عروق خونی، در سطح مقطع یکسان در تصاویر تهیه‌شده از نمونه‌های غشای کوریونوآلانتوئیس پس از عکس‌برداری توسط به کمک نرم‌افزار ImageJ کمی‌سازی شدند. سپس داده‌های حاصل، با استفاده از نرم‌افزار SPSS، نسخه ۱۰ و با استفاده ANOVA یک‌طرفه و آزمون Tukey با سطح معنی‌داری ($p < 0.01$) مورد ارزیابی قرار گرفتند. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار استاندارد ارائه شده‌اند.

بدون پوشش نیز باعث مهار تکثیر سلول‌های اندوتلیال عروق انسان در محیط کشت شده است (۲۶). اثرات کشنده اکسید منیزیم بر سلول‌های اندوتلیوم رگ‌های وریدی بند ناف نیز مشخص شده است (۲۷). براین اساس مشخص می‌شود که تجویز نانوذرات فلزی و اکسید فلزی بدون پوشش، با اثر بر سلول‌های اندوتلیال عروق باعث جلوگیری از فرایند رگ‌زایی می‌شود. این اثرات در برخی از موارد آن‌قدر قدرتمندند که حتی در شرایطی است که فرایند رگ‌زایی توسط فاکتورهای رشد تشدید شده است نیز توان سرکوب فرایند رگ‌زایی را دارند. براین اساس می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که اثر ضد رگ‌زایی نانوذرات اکسید منگنز احتمالاً می‌تواند ناشی از اثر کشنده آن بر سلول‌های اندوتلیال عروق خونی باشد. با توجه به وجود گزارشات قبلی در مورد اثرات سمی نانوذره اکسید منگنز توسط Ghaedi و همکاران (۲۱)، می‌توان این فرضیه را در ارتباط با اثرات ضد رگ‌زایی این نانوذره مطرح کرد که این نانوذره با اثر سمی خود بر سلول‌های اندوتلیال رگ‌های خونی در این مدل توانسته است، باعث مهار رگ‌زایی شود. به‌طور مشابه اثر کشنده تجویز حاد نانوذرات اکسید روی (ZnO) و نانویترا (Y2O3) نیز بر کشت سلول‌های اندوتلیال آنورت انسان نشان داده شده است (۲۸، ۲۹). به‌عنوان مکانیسم اثرات کشنده سلولی نانوذرات فلزی نشان داده شده است که نانوذرات می‌توانند سبب برانگیخته شدن فرایندهای آپتوز و نکروز در سلول‌ها شده و از این طریق منجر به مرگ سلولی شوند (۳۰).

در تأیید فرضیه مرگ سلول‌های اندوتلیال به‌عنوان مکانیسم مهار رگ‌زایی توسط نانوذره اکسید منگنز، نشان داده شده است که اکسید منگنز می‌تواند باعث فعال شدن بیان کاسپاز ۳ در سلول‌های اپی‌تلیال شود (۳۱). کاسپاز ۳ (Caspase-3) دارای اثرات ضد رگ‌زایی نیز هست (۳۲).

مکانیسم پیشنهادی دیگر در ارتباط با اثر مهارکننده رگ‌زایی توسط نانوذرات اکسید فلزی، تجمع این



شکل ۲. بررسی اثر تجویز غلظت‌های مختلف نانوذره دی‌اکسید منگنز بر طول عروق خونی تشکیل شده در پرده کوریوآلانتوئیس جنین تخم‌مرغ.

طول عروق خونی در سطح غشا، به‌دنبال تجویز غلظت ۱ نانوگرم، تفاوت معنی‌داری را با گروه کنترل نشان نمی‌دهد؛ اما تجویز غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم و ۱ میکروگرم سبب کاهش معنی‌دار ($p < 0.01$) در مقایسه با گروه کنترل شد (One way ANOVA, n=10).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان‌دهنده اثرات ضد رگ‌زایی نانوذره اکسید منگنز وابسته به غلظت، در مدل رگ‌زایی در غشای کوریونوآلانتوئیس جنین جوجه است. تجویز این نانوذره در غلظت ۱ نانوگرم، اثر مهاری بر رگ‌زایی از خود نشان نداد. اما با افزایش غلظت این نانوذره (۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم و ۱ میلی‌گرم) اثرات مهار رگ‌زایی به‌طور معنی‌دار بر عروق غشای کوریونوآلانتوئیس جنین جوجه آشکار شد؛ به‌این ترتیب، تجویز نانوذره اکسید منگنز بدون پوشش می‌تواند سبب مهار رگ‌زایی شود؛ ضمن اینکه افزایش غلظت آن قدرت اثرات آن را افزایش می‌دهد. در تأیید این مشاهده، گزارش شده که به‌کارگیری نانوذرات نقره، یکی دیگر از فلزات واسطه جدول تناوبی نیز به‌تنهایی می‌تواند سبب مهار رگ‌زایی در سلول‌های عروق خونی شبکیه چشم گاو (Bovine retinal endothelial cells) القاشده توسط فاکتور رشد اندوتلیال عروقی شود (۱۲). تجویز نانوذرات طلا

نانوذرات در متیوکندری‌ها و نابود کردن متیوکندری‌ها و ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌های اندوتلیال است (۳۳). امروزه اهمیت فرایند تعدیل‌کننده واکنش‌های ردوکس به‌خصوص، در ارتباط با فرایند رگ‌زایی در سلول‌های اندوتلیال مشخص شده است (۳۴). تغییر در سیستم ردوکس و تأثیر بر عملکرد میتوکندری‌ها، توسط نانوذرات در سلول‌های اندوتلیال دیواره عروق گزارش شده است (۳۵). دانشمندی به نام حوسین^۱ و همکارانش اثر اکسید منگنز در شرایط *In Vitro* بر سلول‌های کبدی موش را بررسی و گزارش کرده‌اند که این نانوذرات سبب کاهش پتانسیل غشای میتوکندری‌ها و افزایش تولید ترکیبات اکسیژن فعال در این سلول‌ها می‌شوند (۳۶). تجویز اکسید منگنز به موش‌ها توانسته با اثر بر میتوکندری‌های سلول‌ها سبب ایجاد اختلال در عملکرد سلول‌ها شود (۳۷).

پژوهشگران گزارش کرده‌اند که منگنز می‌تواند در شرایط *In Vitro* از طریق تنظیم میزان mRNA بر بیان برخی از پروتئین‌های آنزیمی تولیدکننده مواد دارای اکسیژن فعال در سلول‌ها اثر بگذارد (۳۸). به این ترتیب می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که این نانوذره نانواکسید منگنز می‌تواند از این طریق نیز اثرات مهاری خود را بر رگ‌زایی در سلول‌های اندوتلیال اعمال کند.

گزارشی دال بر اختلال در عملکرد نورون‌های دوپامینرژیک به دنبال تجویز اکسید منگنز در دست می‌باشد (۳۹). در تکمیل این یافته گزارش شده است که حذف گیرنده‌های محیطی اعصاب دوپامینرژیک، سبب تحریک رشد تومورهای بدخیم با میانجی‌گری فرایند رگ‌زایی توسط القای فاکتور نفوذپذیرکننده عروق خونی (Vascular permeability factor) و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) می‌شود (۴۰). از سوی دیگر دوپامین سبب تنظیم تحرک سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیوم می‌شود (۴۱). بیان گیرنده‌های دوپامینرژیک، در سلول‌های اندوتلیال عروق خونی غشای کوریونوآلانتوئیس جنین مهره‌داران نشان داده شده است

(۴۲). فعالیت این گیرنده‌ها در جنین انسان، سبب بروز اثرات ضد رگ‌زایی در این غشا می‌شود (۴۲)؛ در نتیجه اثر نانوذره اکسید منگنز بر گیرنده‌های دوپامینرژیک، در سطح سلول‌های اندوتلیال عروق غشای کوریونوآلانتوئیس نیز می‌توان به عنوان یک مکانیسم دیگر عملکردی مطرح شود.

بسیاری از داروها با توجه به اسیدی بودن و هیپوکسیک بودن محیط سلول‌های سرطانی، غیرفعال شده و خاصیت ضدسرطانی خود را از دست می‌دهند. استفاده از کمپلکس پلی الکترولیت-آلبومین و اکسید منگنز نشان داد که طی واکنش اکسید منگنز با گروه‌های دارای اکسیژن فعال همچون H_2O_2 ، میزان pH محیط از ۶/۷ به ۷/۲ تغییر پیدا می‌کند (۴۳). این کمپلکس حاوی اکسید منگنز توانسته است به این روش سبب کاهش رشد تومورها و افزایش مرگ سلول‌های سرطانی در مدل‌های موشی شود. این فرضیه با این مشاهده که ساخت هیپرید پلی الکترولیت اکسید منگنز تحت عنوان (hydrophilic terpolymer/protein-MnO₂) سبب تشدید هیپوکسی محیط تومور و افزایش سرعت و تقویت اثرات ضدسرطانی اکسید منگنز می‌شود، تأیید شده است (۴۴).

به عنوان یک جمع‌بندی کلی می‌توان گفت که تجویز نانوذره اکسید منگنز می‌تواند سبب مهار رگ‌زایی به‌طور معنی‌دار در مویرگ‌های غشای کوریونوآلانتوئیس جنین جوجه شده و به نظر می‌رسد این نانوذره از طریق مکانیسم‌های متنوعی سبب بروز اثرات مهاری خودش بر سلول‌های اندوتلیال عروقی شده و از این طریق سبب مهار رگ‌زایی می‌شود که البته نیاز به بررسی‌های بیشتر در آینده دارد.

^۱ . Hussain

منابع

1. Patel A, Hielscher A. Angiogenesis inhibitor in the treatment of breast cancer. *Cancer Prevention and Current Research*. 2015;2:00059.
2. Li M, Li Y, Huang X, Lu X. Captopril-polyethyleneimine conjugate modified gold nanoparticles for co-delivery of drug and gene in anti-angiogenesis breast cancer therapy. *Journal of Biomaterial Science Polymer Education*. 2015;26:813-27.
3. Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008;60:1289-1306.
4. Edmundson MC, Capenness M, Horsfall L. Exploring the potential of metallic nanoparticles within synthetic biology. *New Biotechnology*. 2014;31: 572-578.
5. Lamallice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation Research*. 2007;100:782-94.
6. Vasudev NS, Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*. 2014;17:471-494.
7. Evangelista AM, Thompson MD, Weisbrod RM, Pimental DR, Tong X, Bolotina VM, Cohen RA. Redox regulation of SERCA2 is required for vascular endothelial growth factor-induced signaling and endothelial cell migration. *Antioxidant Redox Signal*. 2012;17:1099-1108.
8. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009;8:579-91.
9. Alili L, Sack M, von Montfort C, Giri S, Das S, Carroll KS, Zanger K, et al. Down regulation of tumor growth and invasion by redox-active nanoparticles. *Antioxidants Redox Signal*. 2013;19:765-778.
10. Giri S, Karakoti A, Graham RP, Maguire JL, Reilly CM, Seal S, Rattan R, et al. Nanoceria: a rare-earth nanoparticle as a novel anti-angiogenic therapeutic agent in ovarian cancer. *PLoS One* 2013;8:e54578.
11. Gurunathan S, Lee KJ, Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, Vaidyanathan R, Eom SH. Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. *Biomaterials*. 2009;30:6341-6350.
12. Kalishwaralal K, Banumathi E, Ram Kumar Pandian S, Deepak V, Muniyandi J, Eom SH, Gurunathan S. Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;73:51-7.
13. Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, BarathManiKanth S, Haribalaganesh R, Ramkumarpandian S, Gurunathan S. Gold nanoparticles inhibit vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability via Src dependent pathway in retinal endothelial cells. *Angiogenesis*. 2011;14:29-45.
14. Hiromatsu Y, Toda S. Mast cells and angiogenesis. *Microsections Research Technology*. 2003;60:64-9.
15. Arvizo RR, Saha S, Wang E, Robertson JD, Bhattacharya R, Mukherjee P. Inhibition of tumor growth and metastasis by a self-therapeutic nanoparticle. *Proceeding of National Academy of Science USA*. 2013;110:6700-5.
16. Becker K, Schroecksnadel S, Geisler S, Carriere M, Gostner JM, Schennach H, Herlin N, et al. TiO₂ nanoparticles and bulk material stimulate human peripheral blood mononuclear cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2014;65:63-69.
17. Giannopoulou E, Papadimitriou E. Amifostine has antiangiogenic properties in vitro by changing the redox status of human endothelial cells. *Free Radical Research*. 2003;37:1191-9.
18. Tahergorabi Z, Khazaei M. A Review on Angiogenesis and Its Assays. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2012;15(6):1110-1126.
19. Ribatti, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo assay to study antiangiogenesis. *Pharmaceuticals*. 2010; 3:482-513.
20. Manjunathan R, Ragunathan M. Chicken chorioallantoic membrane as a reliable model to evaluate osteosarcoma-an experimental approach using SaOS2 cell line. *Biology Proceeding Online*. 2015;17:10.
21. Ghaedi S, Hassanpour-Ezatti M, Naji T, Rahmanifar MS. Comparison of tissue damages resulting from chronic administration of manganese dioxide nano- and microparticles on the liver, kidneys and testes of rats. *Modares Journal of Medical Sciences*. 2014:67-81.
22. Rabbani ZN, Spasojevic I, Zhang XW, Moeller BJ, Haberle S, Vasquez-Vivar J, Dewhirst MW, et al. Anti-angiogenic action of redox modulating Mn(III) ortho tetrakis N-ethylpyridylporphyrin, MnTE-2-PyP5+ via suppression of oxidative stress in a mouse model of breast tumor. *Free Radical Biological Medicine*. 2009;47:992-1004.
23. Nosrati N, Hassanpour-Ezzati M, Mousavi SZ, Rahmanifar MS, Rezagholiyan S. Comparison of MnO₂ nanoparticles and microparticles distribution in CNS and muscle and effect on acute pain threshold in rats. *Nanomedicine Journal*. 2014;1:180-190.
24. Rezagolian S, Hassanpourezatti M, Mousavi SZ, Rhamanifar MS, Nosrati N. Comparison of chronic administration of manganese oxide micro and nanoparticles on liver function parameters in male rats. *Daneshvar Medicine*. 2013;20:35-46.
25. Liu M, Springstead Scanlon C, Banerjee R, Russo N, Inglehart RC, Willis AL, Weiss SJ, et al. The histone methyltransferase EZH2 mediates tumor progression on the chick chorioallantoic membrane assay, a novel model of head and neck squamous cell carcinoma. *Translational Oncology*. 2013;6:273-281.

26. Freese C, Ubaldi C, Gibson MI, Unger RE, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, et al. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: Comparative studies on human endothelial and epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology*. 2012;9:23.
27. Ge S, Wang G, Shen Y, Zhang Q, Jia D, Wang H, Dong Q, et al. Cytotoxic effects of MgO nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *IET Nanobiotechnology*. 2011;5:36.
28. Gojova A, Guo B. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environmental Health Perspective* 2007;115:403–409.
29. Jinhua Y, Yu C. Determination, characterization and cytotoxicity on HELF cells of ZnO nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;76:1-15.
30. Vamanu CI, Cimpan M. Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: Studies on a human monoblastoid cell line. *Toxicology In Vitro*. 2008;22:1689–1696.
31. Frick R, Müller-Edenborn B, Schlicker A, Rothen-Rutishauser B, Raemy DO, Günther D, Hattendorf B, Stark W, Beck-Schimmer B. Comparison of manganese oxide nanoparticles and manganese sulfate with regard to oxidative stress, uptake and apoptosis in alveolar epithelial cells. *Toxicology Letters* 2011;205(2):163-172.
32. Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, Funahashi T, et al. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proceeding of National Academic Science*. 2004;101:2476–2481.
33. Kodiha M, Wang YM, Hutter E, Maysinger D, Stochaj U. Off to the Organelles - Killing Cancer Cells with Targeted Gold Nanoparticles. *Theranostics*. 2015;5:357-370.
34. Panieri E, Santoro MM. ROS signaling and redox biology in endothelial cells. *Cellular Molecular Life Sciences*. 2015;72:3281-303.
35. Weinberg SE, Chandel NS. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nature Chemistry Biology*. 2015;11:9-15.
36. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in ERL 3A rat liver cells. *Toxicity in Vitro*. 2005;19:975-983.
37. Lown BA, Morganti JB, D'Agostino R, Stineman CH, Massaro EJ. Effects on the postnatal development of the mouse of preconception, postconception and/or suckling exposure to manganese via maternal inhalation exposure to MnO₂ dust. *Neurotoxicology*. 1984;5:119-29.
38. Lin R, Chen X, Li W, Han Y, Liu P, Pi R. Exposure to metal ions regulates mRNA levels of APP and BACE1 in PC12 cells: Blockage by curcumin. *Neuroscience Letters*. 2008;440:344–347.
39. Li T, Shi T, Li X, Zeng S, Yin L, Pu Y. Effect of nano-MnO₂ on dopaminergic neurons and the spatial learning capability of rats. *International Journal of Environmental Research in Public Health*. 2014;11:7918-7930.
40. Basu S, Sarkar C, Chakroborty D, Nagy J, Mitra RB, Dasgupta PS, Mukhopadhyay D. Ablation of peripheral dopaminergic nerve stimulates malignant tumor growth by inducing vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer Research*. 2004; 64:5551-5555.
41. Chakroborty D, Chowdhury UR, Sarkar C, Baral R, Dasgupta PS, Basu. Dopamine regulates endothelial progenitor cell mobilization from mouse bone marrow in tumor vascularization. *Journal of Clinical investigation*. 2008; 118:1380-1389.
42. Kim HJ, Koh PO, Kang SS, Paik WY, Choi WS. The localization of dopamine D2 receptor mRNA in the human placenta and the anti-angiogenic effect of apomorphine in the chorioallantoic membrane. *Life Sciences*. 2001;68:1031-1040.
43. Prasad P, Gordijo CR, Abbasi AZ, Maeda A, Ip A, Rauth AM, DaCosta RS, Wu XY. Multifunctional albumin-MnO₂ nanoparticles modulate solid tumor microenvironment by attenuating hypoxia, acidosis, vascular endothelial growth factor and enhance radiation response. *ACS Nano*. 2014;22;8:3202-12.
44. Gordijo CR, Abbasi AZ, Amini MA, Lip HY, Maeda A, Cai P, O'Brien PJ, et al. Hybrid nanoparticles: design of hybrid MnO₂-polymer-lipid nanoparticles with tunable oxygen generation rates and tumor accumulation for cancer treatment. *Advanced Functional Materials* 2015;1857–1587.

Daneshvar
Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
23th Year, No.121
February-March
2016*

Received: 07/01/2016

Last revised: 16/02/2016

Accepted: 22/02/2016

Anti-angiogenic effect of MnO₂ nanoparticles on chicken chorioalantoic membrane

Mansoureh Majidifard, Majid Hassanpour-Ezatti*

Department of Biology, School of Basic Sciences, Shahed University, Tehran Iran.

*Corresponding author e-mail: hassanpour@shahed.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Recently, it has been shown that some naked metal nanoparticles have angiogenesis potential. In the present study, the anti-angiogenesis property of bare manganese oxide (MnO₂) nanoparticles was investigated on chicken chorioallantoic membrane (CAM).

Materials and Methods: Fifty hen fertilized eggs were divided into five groups (n=10); the control and experimental groups treated with different concentration of MnO₂ nanoparticles (1, 10, 100 ng and 1 µg). On the 8th day of incubation, a paper disk was placed on the chorionallantois membrane of eggs and soaked with PBS or different concentrations of the nanoparticles in control and treated groups, respectively. On the 10th day, all the cases were photographed using a photostereomicroscope. The number and the lengths of the vessels branching in microscopic images were quantified by Image J software.

Results: MnO₂ nanoparticles at a concentration of 1ng in comparison with control had no significant effect on the mean number of blood vessels branching and its length. In contrast, application of the nanoparticles at concentrations of 10, 100 ng and 1 µg, progressively (p<0.01) reduced the measured parameters in CAM.

Conclusion: These results indicate potent anti-angiogenic activity of bare MnO₂ nanoparticles. The nanoparticle is a potent oxidizing agent. Some metal oxide nanoparticles have shown cytotoxic and apoptotic effects on endothelial cells via induction of oxidative stress. Angiogenesis has been widely considered as an oxidative stress condition. So, the anti-angiogenesis activity of MnO₂ nanoparticles in this model probably arises from the nanoparticles impact on the oxidative stress processes in CAM.

Keywords: Nanoparticles, Manganese dioxide, CAM assay, Angiogenesis inhibitors.