

Evaluation of (cytotoxicity and angiogenesis) of Zinc oxide nanoparticles Synthesized by aqueous extract of *Origanum majorana*

Somayeh Khaleghi¹ , Jina Khayat Zadeh² , Ali Neamati³ 

¹ Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

² **Corresponding author;** Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
Tel: +985138435050 FAX: +985138435050 Email: j_kh329@yahoo.com

³ Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran



Citation Khaleghi S, Khayat Zadeh J, Neamati A. [Evaluation of (cytotoxicity and angiogenesis) of Zinc oxide nanoparticles Synthesized by aqueous extract of *Origanum majorana*]. J Birjand Univ Med Sci. 2020; 27(1): 56-67. [Persian]

DOI <http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.1.104>

Received: March 2, 2019

Accepted: August 21, 2019

ABSTRACT

Background and Aim: Zinc oxide nanoparticle (ZnO NPs), Due to its unique properties, such as its anti-cancer and antioxidant properties, it has attracted researchers attention. In the present study, the cytotoxic and anti-angiogenic properties of zinc oxide nanoparticles prepared with the green method from extract *Origanum Majorana* were investigated.

Materials and Methods: Cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles, By MTT assay on cells of HUVEC .MDA-MB-231 and Hep-G2 was examined. In order to evaluate the anti-angiogenic effects in an in vivo model, 48 fertile eggs with Ross breed randomly divided into 6 groups Consist of: 4 treatment groups with different concentrations of (125, 250, 500 and 1000 µg / ml) , control and sham groups. After 12 days of incubation, the number and the length of the vessels of the chorioallantoic membrane of chick embryos were assessed. Eventually, data were analyzed using Image J and SPSS software (version 16) and one-way ANOVA and post hoc LSD statistical tests at the significant level (P <0.05).

Results: The results showed that ZnO nanoparticles made the concentration-dependent cytotoxic effects with the amount IC50 values of 60, 15 and 80 µg / ml. The number and length of chorioallantoic membrane vessels and by chick embryos weight and height in treated groups with different concentrations of nanoparticles significantly decreased compared to the control group (p<0.05).

Conclusion: The Zinc oxide nanoparticles produced by the green method from the extract of *Marjoram* probably with more severe cytotoxic properties for cancerous cells compared to healthy cells and it can also have anti-angiogenic potential.

Key Words: Angiogenesis; Chorioallantoic Membrane; Cytotoxicity; *Origanum Majorana*; ZnO-NPs

ارزیابی سمیت و آنژیوژنز نانو ذره اکسید روی سنتز شده با عصاره آبی گیاه مرزنجوش (*Origanum majorana*)

سمیه خالقی^۱، جینا خیاطزاده^۲، علی نعمتی^۳

چکیده

زمینه و هدف: نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs)، با توجه به ویژگی‌های شاخصی همچون خاصیت ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی که دارد، توجه محققان را جلب کرده است. در مطالعه حاضر، خواص سیتوتوکسیک و ضد رگ‌زایی نانوذرات اکسید روی تهیه شده به روش سبز از عصاره گیاه مرزنجوش (*Origanum majorana*) مورد بررسی قرار گرفت.

روش تحقیق: اثرات سیتوتوکسیک نانوذرات اکسید روی، توسط آزمون MTT بر روی سلول‌های (سلول بند ناف جنینی) HUVEC، (سرطان پستان)، MDA-MB-231 و (سرطان کبد) Hep-G2 مورد بررسی قرار گرفت. به منظور ارزیابی اثرات ضد رگ‌زایی در مدل *In vivo*، تخم مرغ بارور نژاد Ross به صورت تصادفی به ۶ گروه شامل: چهار گروه تیمار با غلظت‌های مختلف ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و یک گروه شاهد و یک گروه شاهد آزمایشگاهی تقسیم شدند. پس از ۱۲ روز انکوباسیون، تعداد و طول عروق خونی غشای کوریوآلانتوئیک جنین جوجه بررسی گردید. در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SPSS و Image J (ویرایش ۱۶) و با کمک آزمون‌های آماری ANOVA یک‌طرفه و LSD در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد نانوذرات اکسید روی، اثرات سیتوتوکسیک وابسته به غلظت با مقادیر IC_{50} ، ۶۰، ۱۵ و ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایجاد کرد. تعداد و طول عروق پرده کوریوآلانتوئیک همراه با قد و وزن جنین جوجه در نمونه‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نانوذرات اکسید روی تولید شده به روش سبز از عصاره گیاه مرزنجوش احتمالاً دارای خصوصیات سیتوتوکسیک شدیدتری برای سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های سالم بوده و می‌تواند دارای پتانسیل ضد رگ‌زایی نیز باشد.

واژه‌های کلیدی: رگ‌زایی؛ پرده کوریوآلانتوئیک؛ سمیت سلولی؛ گیاه مرزنجوش؛ نانوذرات اکسید روی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۹؛ ۲۷ (۱): ۵۶-۶۷.

دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۱ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۳۰

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.

^۲ نویسنده مسؤول؛ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

آدرس: خراسان رضوی - مشهد - خیابان راهنمایی - نبش راهنمایی ۲۶

تلفن: +۹۸۵۱۳۸۴۳۵۰۵۰؛ شماره: +۹۸۵۱۳۸۴۳۵۰۵۰؛ پست الکترونیکی: j_kh329@yahoo.com

^۳ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

مقدمه

سرطان دومین عامل مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه و اولین عامل در کشورهای توسعه یافته است. علی رغم گسترش روش‌های متنوع درمانی از جمله شیمی‌درمانی، شیوع این بیماری رشد فزاینده‌ای داشته و نیاز به کشف و تولید ترکیبات جدید به منظور مبارزه با آن یکی از اولویت‌های مهم جهانی محسوب می‌شود (۱).

عوامل گوناگونی در ابتلا به سرطان دخیل هستند؛ وراثت، استفاده از الکل و استعمال دخانیات، چاقی و استرس همراه با عوامل محیطی، از جمله مهم‌ترین عوامل دخیل در ابتلا به سرطان می‌باشند. سرطان به دلیل تجمع عوامل آسیب‌رسان و جهش‌های ژنتیکی در سلول‌ها ایجاد شده و موجب تکثیر خارج از کنترل سلول‌ها می‌شود. سلول‌های جهش‌یافته به دلیل آسیب‌های وارد شده تکثیر می‌شوند؛ در نتیجه اکسیژن و مواد مغذی را از دسترس سایر سلول‌ها خارج می‌نمایند (۱). این وضعیت از رشد و تکثیر سلول‌های سالم ممانعت نموده، در حالی که سلول‌های سرطانی با افزایش اندازه موجب ایجاد صدمات فیزیکی شده و یا به سایر بافت‌های بدن حمله می‌کنند و از این طریق موجب گسترش سرطان می‌شوند (۲). نیاز سلول‌های سرطانی به مواد غذایی، اکسیژن و دفع متابولیت‌ها سبب ترشح فاکتورهای شیمیایی شده که رگ‌زایی را افزایش می‌دهد (۱). رگ‌زایی (آنژیوژنز) به ایجاد و تکامل رگ‌های جدید از عروق پیشین توسط جوانه‌زدن سلول‌های اندوتلیال عروقی اطلاق می‌گردد. این فرآیند در وضعیت فیزیولوژیک از جمله رشد و نمو جنین، تشکیل جفت و ترمیم زخم؛ و شرایط پاتولوژیک از جمله رشد و متاستاز تومور، آرتریت روماتوئید، بیماری‌های قلبی و عروقی و غیره دیده می‌شود (۳). عدم تطابق سرعت رگ‌زایی با رشد تومور، موجب پدید آمدن ساختار عروقی نامنظم می‌شود که از نشانه‌های بافت سرطانی است (۴). داروهای مختلف نیز پس از عبور از این عروق وارد سلول‌های سرطانی می‌شود (۵).

یکی از بارزترین زمینه‌های استفاده از نانوداروها در

پزشکی، استفاده از نانوذرات فلزی از جمله نانوذرات اکسیدروی به‌عنوان حاملین دارو، شناساگرهای سلول‌های سرطانی و مهارکننده‌های رگ‌زایی است (۵). نانوذرات قادر به هدایت دارویی و شناسایی سلول‌های سرطانی هستند و می‌توانند با فعال‌نمودن مسیرهای آپوپتوتیک و ضد رگ‌زایی، اثرات درمانی قابل توجهی داشته باشند (۶). روش‌های گوناگونی برای تولید این نانوذرات وجود دارد. روش‌های شیمیایی به دلیل نیاز به ترکیبات و امکانات مختلف، صرفه اقتصادی ناچیزی داشته و خطرات بی‌شماری برای محیط زیست ایجاد می‌کنند؛ در حالی که استفاده از روش‌های حمایت‌کننده طبیعت علاوه بر صرفه اقتصادی، موجب تولید بیشتر و کیفیت بالاتر نانوذرات می‌شود. استفاده از عصاره‌های گیاهی، یکی از مطلوب‌ترین و پرکاربردترین روش‌های تولید نانوذرات به‌روش دوست‌دار محیط زیست است. در این روش عصاره به‌دست آمده از بخش‌های مختلف گیاه از جمله: ریشه، برگ و ساقه، به‌عنوان ترکیب کاهنده عمل نموده و موجب تولید نانوذرات می‌شود. نانوذرات تولیدشده با این روش، دارای اندازه و شکل مناسب بوده و مطالعات مختلف نشان داده است که این نانوذرات، از قدرت سیتوتوکسیک مناسبی در مقایسه با سایر نانوذرات تولیدشده به روش‌های شیمیایی برخوردار هستند (۷).

استفاده از فلز روی برای تولید نانوذرات اکسیدروی (ZnO)، موارد استفاده فراوانی در زمینه پزشکی و زیست‌پزشکی پیدا کرده است. این فلز به دلیل داشتن ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد، در تهیه کاتالیزورها، حسگرهای گاز، نیمه‌رساناها و مواد عایق اشعه مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات مختلف نشان داده است که نانوذرات اکسید روی دارای توان مناسبی در القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی بوده و قادرند روند رگ‌زایی را در بافت‌های سرطانی سرکوب نمایند (۸).

به‌منظور تولید نانوذرات اکسید روی، از عصاره گیاه مرزنجوش (*Origanum majorana*) استفاده شد.

یک ساعت در دمای 35°C روی همزن مغناطیسی قرار داده شد؛ سود یک مولار، قطره قطره اضافه گردید تا زمانی که محلول به رنگ سفید تغییر پیدا کرد. محلول حاوی نانوذرات ساخته شده به مدت ۲۰ دقیقه و با دور 12000 rmp سانتریفیوژ شد؛ سپس محلول رویی دور ریخته و رسوب سفید رنگ به دست آمده خشک گردید و در ادامه آزمایش های بیولوژیک به قرار زیر انجام شد.

۲- کشت سلول:

در این مطالعه، از رده های سلولی سرطانی MDA-MB231 (سرطان پستان)، Hep-G2 (سرطان کبد) و رده سلولی HUVEC (سلول بند ناف جنینی) استفاده شد. این سلول ها پس از خریداری از انستیتو پاستور (تهران، ایران) در محیط حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو (FBS) (Gibco, USA) و یک درصد آنتی بیوتیک استرپتومایسین و ۸۹ درصد محیط RPMI (Gibco, USA) برای رده سلولی HUVEC و DMEM (Gibco, USA) برای رده های سلولی MDA-MB231 و Hep-G2 در فلاسک های ۲۵ میلی لیتری در دمای 37°C درجه سلسیوس، ۵ درصد دی اکسید کربن و ۸۰ درصد رطوبت کشت داده شدند. پاساژ سلولی در زمانی که ۸۰ درصد کف فلاسک ها توسط سلول ها مفروش شده بود، به انجام رسید. پس از ۲ مرحله پاساژ سلولی، سلول ها با استفاده از ترکیب تریپسین-EDTA از کف فلاسک جدا شده و با استفاده از لام نئوبار شمارش شدند؛ سپس، تعداد ۹۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه قرار گرفت و سلول ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C درجه سلسیوس، رطوبت ۹۰ درصد و ۵ درصد کربن دی اکسید انکوبه شدند (۱۱).

۳- بررسی تأثیر سایتوتوکسیک نانوذرات اکسید

روی:

روش MTT (دی متیل تیا زول - ۲ و ۵ دی فیل تترازولیوم برمید) نوعی روش رنگ سنجی است که بر اساس شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دی هیدروژناز صورت می پذیرد (۱۰). پس از

مرزنجوش (*Origanum majorana*) دارای ترکیبات مختلفی مانند: فلاونوئیدها، ترپین ها و رزمارینیک اسید است. گیاه مرزنجوش دارای کاربرد وسیع برای استفاده ضد میکروبی و آنتی اکسیدان است. در طب سنتی از این گیاه به منظور درمان مشکلات گوارشی، اسهال، سوء هاضمه، بی خوابی، آسم، دیابت، آلزایمر، سرطان، و فشار خون بالا استفاده شده و اثرات سودمند آن گزارش شده است (۹). در این مطالعه، اثرات سایتوتوکسیک نانوذرات اکسید روی تولید شده به روش سبز با استفاده از عصاره آبی گیاه مرزنجوش بر روی رده های سلولی سرطانی MDA-MB231، HUVEC و یا سلول های طبیعی Hep-G2 مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین اثرات این ترکیب بر رگ زایی با استفاده از مدل کوریوآلانتوئیک جنین جوجه (CAM)^۱ بررسی گردید.

روش تحقیق

۱- بیوسنتز نانوذرات اکسیدروی با استفاده از عصاره

آبی گیاه مرزنجوش:

برای انجام مطالعه حاضر، ابتدا نانوذرات اکسید روی از عصاره آبی گیاه مرزنجوش به روش سبز سنتز شدند. در این روش ابتدا برگ های گیاه مرزنجوش (*Origanum majorana*) در فصل بهار از شهر مشهد جمع آوری و با آب مقطر به خوبی شستشو داده شد و در درمای اتاق خشک گردید؛ سپس در هاون کوبیده و پودر شد. مقدار ۱۰ گرم از پودر آسیاب شده گیاه با ۱۰۰ سی سی آب مقطر به مدت یک ساعت در دمای 40°C درجه سانتی گراد با هات پلیت استیرر مخلوط گردید و بعد از یک ساعت از کاغذ صافی وایتمن نمره یک عبور داده شد تا عصاره آبی گیاه مرزنجوش تهیه شود. مقدار ۹۰ میلی لیتر محلول استات روی (۴۶ گرم استات روی در ۵۰۰ سی سی آب مقطر) با ۱۰ میلی لیتر از عصاره آبی تهیه شده از گیاه مرزنجوش به مدت

¹ Chorio allantoic membrane

گروه دوم (گروه شاهد آزمایشگاهی): به نمونه‌های این گروه در روز هشتم ۱۰ میکرولیتر نرمال سالین استریل اضافه و تا روز دوازدهم در دستگاه جوجه‌کشی انکوبه شد. برای ساخت اسفنج ژلاتینی، ۵ سی‌سی محلول ۰/۶ درصد آگار در نرمال سالین در دمای اتاق تهیه و تا رسیدن به نقطه جوش روی همزن مغناطیسی گرم شد؛ سپس به بن‌ماری با دمای ۴۹ درجه منتقل گردید. گروه سوم، چهارم، پنجم و ششم با غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذره اکسید روی سنتز شده به روش سبز توسط عصاره آبی گیاه مرزنجوش (*Origanum majorana*) در حجم ۱۰ میکرولیتر بر صفحه ژلاتینی تا روز دوازدهم انکوبه شدند. در روز دوازدهم پس از انکوباسیون، پنجره‌های هر تخم‌مرغ باز شده و میزان رگ‌زایی به وسیله فوتواسترنئومیکروسکوپ (مارک Nikon, USA) مورد بررسی قرار گرفت (۱۳، ۱۲).

۵- آنالیزهای آماری:

به منظور انجام تحلیل‌های آماری، از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۶) استفاده شد. وزن‌گیری جنین جوجه‌ها با ترازوی حساس (حساسیت ۰/۱ میلی‌گرم) و اندازه‌گیری قد جنین‌ها با استفاده از کولیس با حساسیت ۱۰ میکرون به انجام رسید. تعداد و طول انشعابات مویرگ‌های خونی در سطح مقطع یکسان و با استفاده از نرم‌افزار Image J مورد ارزیابی کمی قرار گرفت. با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS، از آزمون‌های ANOVA یک‌طرفه و LSD در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ استفاده شد. داده‌های به دست آمده به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه گردید.

در این مطالعه، در کلیه مراحل آزمایش معیارهای اخلاقی پژوهش رعایت شد و کد اخلاق به شماره IR.IAU.MSHD.REC.1398.046 از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی مشهد اخذ گردید.

انکوباسیون ۲۴ ساعته، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی (۱۵/۶، ۳۱/۲، ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای رده HUVEC و رده‌های سرطانی به مدت ۲۴ ساعت در شرایط انکوباسیون تیمار شدند؛ سپس به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT اضافه و پلیت به مدت ۴ ساعت در تاریکی انکوبه گردید. در ادامه، محیط حاوی MTT تخلیه و به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون، جذب هر چاهک با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Bio-Rad, Model 680) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. نتایج به دست آمده در این آزمایش، به صورت سه بار تکرار بوده و براساس میانگین $\pm$ انحراف معیار استاندارد می‌باشد (۱۱).

۴- آماده‌سازی غشای کوریوآلانتوئیک:

این آزمایش به منظور ارزیابی اثرات ضد رگ‌زایی نانوذرات اکسید روی تهیه شده به انجام رسید. تعداد ۴۸ عدد تخم مرغ نژاد ROSS از کارخانه مرغداران توس (مشهد، ایران) خریداری شد؛ سپس تخم مرغ‌ها توسط الکل ۷۰ درصد تمیز و به دستگاه جوجه‌کشی (ساخت شرکت درنا سیستم) با دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۳-۶۵ درصد -به طوری که سر پهن تخم مرغ‌ها به سمت بالا باشد- وارد شد و کلید چرخش خودکار دستگاه در حالت روشن قرار گرفت. در روز دوم، انکوباسیون به وسیله یک پنس استریل و در شرایط استریل (زیر هود لامیلار کلاس ۲) در سمت پهلویی تخم مرغ، پنجره ایجاد و محل آن به وسیله پارافین استریل و لامل پوشانده شد؛ در نهایت تخم مرغ‌ها به طور تصادفی در ۶ گروه هشت‌تایی به شرح زیر طبقه‌بندی شدند:

گروه اول (گروه کنترل): نمونه‌های مربوط به این گروه در روز نخست در دستگاه جوجه‌کشی قرار داده شد و پس از ۴۸ ساعت از انکوباسیون، برای ایجاد پنجره اقدام گردید و تا روز دوازدهم در همین وضعیت و بدون تیمار انکوبه شدند.

یافته‌ها

۱- بررسی اثرات سایتوتوکسیک نانوذرات اکسید روی:

ارزیابی اثرات نانوذرات اکسید روی تهیه شده با عصاره آبی گیاه مرزنجوش به روش سبز بر رده‌های سلولی، نشان‌دهنده تأثیرات سایتوتوکسیک وابسته به غلظت نانوذرات بود (جدول ۱). میزان IC_{50} به دست آمده برای رده سلولی HUVEC در مدت زمان ۲۴ ساعت ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و میزان IC_{50} به دست آمده برای رده‌های سلولی سرطان Hep-G2 و MDA-MB-231 در مدت زمان ۲۴ ساعت به ترتیب: ۱۵ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. نتایج نشان می‌دهد که درصد زیستایی سلول‌ها به غلظت نانوذره بستگی دارد. در غلظت کمتر، درصد بقای سلول‌ها بیشتر بود؛ در حالی که غلظت‌های بالاتر این سلول‌ها به میزان بیشتری دچار مرگ و میر شدند.

۲- اثرات ضد رگزایی:

در مطالعه حاضر ارزیابی تعداد و طول رگ‌های مورد بررسی بر پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه (CAM) به عنوان یک مدل *In vivo* مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲).

- تغییر طول عروق خونی بعد از تیمار با نانوذرات

اکسید روی:

مقایسه میانگین طول رگ‌های ایجاد شده بر پرده کوریوآلانتوئیک در گروه کنترل (34.6 ± 0.5 میلی‌متر) با گروه شاهد آزمایشگاهی (33.9 ± 2.5) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نبود ($P < 0.05$). میانگین طول رگ‌های ایجاد شده بر پرده کوریوآلانتوئیک در گروه کنترل در مقایسه با گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسیدروی شامل: غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (26.8 ± 0.9 میلی‌متر)، غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (23.5 ± 1.9 میلی‌متر)،

غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (22 ± 1.7 میلی‌متر) و غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (18.3 ± 2.3 میلی‌متر) نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار در طول این رگ‌ها بود ($P < 0.001$).

_ تغییر تعداد عروق خونی بعد از تیمار با نانوذرات اکسید روی:

مقایسه میانگین تعداد عروق خونی پرده کوریوآلانتوئیک در گروه کنترل (20.1 ± 6.1) و شاهد آزمایشگاهی (1 ± 21.5) تفاوت معنی‌داری را نشان نداد؛ در حالی که مقایسه تعداد عروق خونی میان گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده با نانوذرات اکسید روی شامل غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (16.2 ± 1.5)، غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (12.6 ± 1.5)، غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (1 ± 1)، غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (7.9 ± 1) تولید شده نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار در تعداد عروق خونی بود ($P < 0.001$).

- بررسی قد جنین‌ها بعد از تیمار با نانوذرات اکسید روی:

مقایسه میانگین قد (فاصله از فرق سر تا نشیمنگاه) جنین‌های گروه کنترل (37.2 ± 1.3) و شاهد آزمایشگاهی (37 ± 0.1) تفاوت معنی‌داری را نشان نداد؛ در حالی که مقایسه قد جنین‌های گروه کنترل با گروه‌های تیمار شده با نانوذرات اکسید روی تولید شده از عصاره آبی گیاه مرزنجوش شامل: غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (36.4 ± 0.7 میلی‌متر)، غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (35.1 ± 1.6 میلی‌متر)، غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (35.3 ± 0.4 میلی‌متر) و غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (34.1 ± 1.2 میلی‌متر) نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار قد جنین‌ها بود ($P < 0.001$).

جدول ۱- تعیین IC50 و مقایسه تعداد سلولی ناشی از اثر نانوذره اکسید روی سنتز شده از عصاره گیاه مرزنجوش بر رده‌های مختلف سلولی پس از ۲۴ ساعت (Mean± SD)

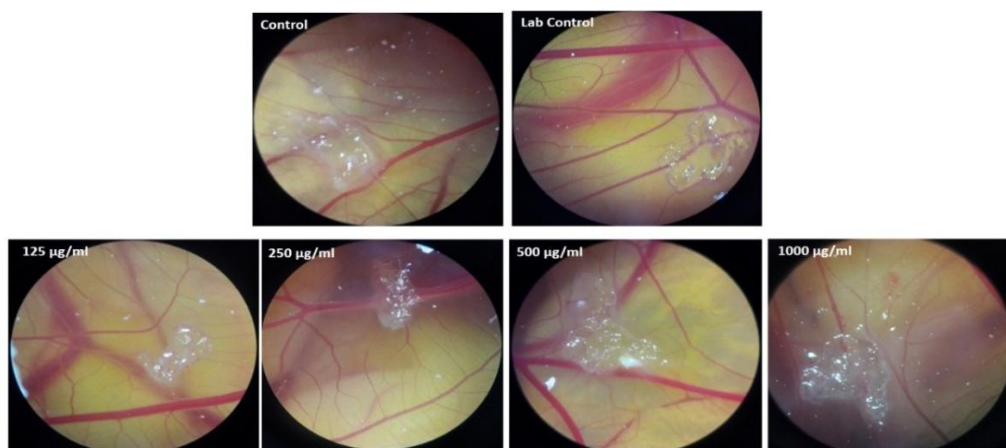
سلول	غلظت					P-value	IC50
	۰	۱۵/۶	۳۱/۲	۶۲/۵	۱۲۵		
HUVEC	۱۰۰	۱۰۰	۹۲/۵	۶۰	۳۴/۳۲	*** P<۰/۰۰۱	۸۰
MDA-MB231	۱۰۰	۵۸/۴	۲۶/۶	۲۵/۵	۱۶/۴	*** P<۰/۰۰۱	۶۰
Hep-G2	۱۰۰	۸۵/۵	۷۵/۳	۴۸/۶	۱۹/۲	*** P<۰/۰۰۱	۱۵

- بررسی وزن جنین‌ها بعد از تیمار با نانوذرات اکسید روی تولید شده از عصاره آبی گیاه مرزنجوش شامل: غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۳/۱۹±۰/۱۷ گرم)، غلظت ۲۵۰

مقایسه وزن جنین جوجه‌های گروه کنترل (۳/۸۳±۰/۰۵ گرم) در مقایسه با گروه شاهد آزمایشگاهی (۳/۷۸±۰/۰۲ گرم) تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد میانگین وزن جوجه‌ها در گروه کنترل در مقایسه با گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید

جدول ۲- مقایسه میانگین طول و تعداد عروق خونی پرده کورنوالانتوتیک، قد و وزن جنین‌های مورد مطالعه در گروه‌های شاهد و شاهد آزمایشگاهی و ۴ گروه تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذره

گروه	غلظت	میانگین (Mean±SD)	انحراف معیار	سطح معنی‌داری
کنترل	طول عروق خونی پرده کورنوالانتوتیک جنین جوجه	۳۴/۶	۰/۵	NS
	تعداد عروق خونی پرده کورنوالانتوتیک جنین جوجه	۲۰/۶	۱/۱	NS
	قد جنین جوجه	۳۷	۱/۳	NS
	وزن جنین جوجه	۳/۸۳	۰/۰۵	NS
شاهد آزمایشگاهی	طول عروق خونی پرده کورنوالانتوتیک جنین جوجه	۲۳/۹	۲/۵	NS
	تعداد عروق خونی پرده کورنوالانتوتیک جنین جوجه	۲۱	۱/۵	NS
	قد جنین جوجه	۳۷	۰/۱	NS
	وزن جنین جوجه	۳/۷۸	۰/۰۲	NS
۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر	طول عروق خونی پرده کورنوالانتوتیک جنین جوجه	۲۶/۸	۰/۹	***P<۰/۰۰۱
	تعداد عروق خونی پرده کورنوالانتوتیک جنین جوجه	۱۶/۲	۱/۵	***P<۰/۰۰۱
	قد جنین جوجه	۳۶/۴	۰/۷	*P<۰/۰۵
	وزن جنین جوجه	۳/۱۹	۰/۱۷	***P<۰/۰۰۱
۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	طول عروق خونی پرده کورنوالانتوتیک جنین جوجه	۲۳/۵	۱/۹	***P<۰/۰۰۱
	تعداد عروق خونی پرده کورنوالانتوتیک جنین جوجه	۱۲/۶	۱/۵	***P<۰/۰۰۱
	قد جنین جوجه	۳۵/۱	۱/۶	*P<۰/۰۵
	وزن جنین جوجه	۳/۰۸	۰/۱۹	***P<۰/۰۰۱
۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	طول عروق خونی پرده کورنوالانتوتیک جنین جوجه	۲۲	۱/۷	***P<۰/۰۰۱
	تعداد عروق خونی پرده کورنوالانتوتیک جنین جوجه	۱۱	۱	***P<۰/۰۰۱
	قد جنین جوجه	۲۵/۳	۰/۴	*P<۰/۰۵
	وزن جنین جوجه	۳/۲۴	۰/۱۵	***P<۰/۰۰۱
۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	طول عروق خونی پرده کورنوالانتوتیک جنین جوجه	۱۸/۳	۲/۳	***P<۰/۰۰۱
	تعداد عروق خونی پرده کورنوالانتوتیک جنین جوجه	۷/۹	۱	***P<۰/۰۰۱
	قد جنین جوجه	۳۴/۱	۱/۲	***P<۰/۰۰۱
	وزن جنین جوجه	۳/۱۲	۰/۱۴	***P<۰/۰۰۱



شکل ۱- کاهش آنژیوژنز در سلول‌های تحت درمان با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسیدروی سنتز شده با عصاره آبی گیاه مرزنجوش (*Origanum majurana*) بر پرده کوریوآلانتوئیک در مقایسه با گروه‌های شاهد و شاهد آزمایشگاهی (درشتمایی ۴۰)

اولویت‌های درمانی هستند. یکی از عرصه‌های پیش‌تاز در این زمینه، نانوفناوری است که با ورود به بیولوژی و پزشکی، دستاوردهای قابل توجهی در جهت مبارزه با سرطان داشته است. استفاده از فناوری نانو در پزشکی با هدف غلبه بر بیماری‌های مختلف و سرطان در مقیاس نانو، توجه محققان بی‌شماری را جذب نموده و نتایج ارزشمندی به بار آورده است (۱۵). در این مطالعه، اثر نانوذرات اکسید روی تهیه‌شده از عصاره آبی گیاه مرزنجوش به‌روش سبز بر سلول‌های سرطانی و نرمال و نیز تأثیر آن بر روند رگ‌زایی در مدل پرده کوریوآلانتوئیک و جنین جوجه مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش سبز برای تولید نانوذرات فلزی علاوه بر صرفه اقتصادی، دوست‌دار محیط زیست بوده و مضرات روش‌های خطرناک شیمیایی را ندارد. در این روش از عصاره گیاهی به‌عنوان ترکیب احیاکننده استفاده شد. یافته‌های به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد نانوذرات تولیدشده با این روش، قدرت سایتوتوکسیک بیشتری بر سلول‌های سرطانی رده Hep-G2 و MDA-MB-231 در مقایسه با سلول‌های نرمال HUVEC دارند. همچنین نانوذرات بیان‌شده قادرند روند رگ‌زایی را در مدل *In vivo* پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه به‌طور معنی‌داری کاهش دهند ($P < 0.001$). نتایج

بررسی ریخت‌شناسی عروق خونی بعد از تیمار با نانوذرات اکسید روی:

بررسی تغییرات ریخت‌شناسی میزان رگ‌زایی بر پرده کوریوآلانتوئیک تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی توسط تصاویر گرفته‌شده زیر فتواسترئومیکروسکوپ نشان داد که افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی توانسته تعداد عروق خونی را بر پرده کوریوآلانتوئیک کاهش دهد (شکل ۱).

بحث

پیشگیری از سرطان یکی از مهم‌ترین استراتژی‌های محدودکننده این بیماری در سطح جهان است. ابتلا به سرطان از معضلات اصلی بهداشتی است و پیدا کردن روش‌های درمانی جزء اولویت‌های اصلی سیستم‌های بهداشتی و درمانی در سرتاسر جهان محسوب می‌شود (۱۴). بر خلاف تلاش‌های فراوان صورت‌پذیرفته به‌منظور کاهش مبتلایان به سرطان، این بیماری در سال‌های اخیر گسترش بیشتر یافته است؛ بنابراین یافتن روش‌های درمانی جدید، بهبود بخشیدن روش‌های جاری و کشف ترکیبات جدید دارای قدرت سرکوب‌کنندگی سرطان، از اصلی‌ترین

شد نانوذرات تولید شده با روش سبز می توانند اثرات ضد تکثیر مشابهی بر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی و قارچ ها ایجاد کنند (۱۹).

بر اساس یافته های مطالعات اشاره شده و نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر می توان نشان داد نانوذرات اکسیدروی تولید شده به روش سبز قادرند از تکثیر سلول های سرطانی رده Hep-G2 و MDA-MB-231 به صورت وابسته به غلظت ممانعت نمایند. یکی از مهم ترین مکانیسم های پیشنهاد شده در مورد تأثیر نانوذرات اکسید روی بر سلول های سرطانی اثر آپوپتوتیک نانوذرات بر این سلول هاست (۲۱، ۲۰). عوامل مختلفی از جمله گونه های واکنشگر اکسیژن (۲۰) و رادیکال های آزاد با تغییر در وضعیت تعادل آنتی اکسیدانی سلول سبب ایجاد استرس اکسیداتیو می شوند. در سلول آسیب دیده، مسیرهای پیام رسانی مختلف از جمله Capase فعال شده و روند آپوپتوز (مرگ سلولی برنامه ریزی شده) فعال می شود (۲۲).

یکی از مهم ترین عوامل در گسترش توده سرطانی، رسیدن مواد غذایی و اکسیژن به سلول های سرطانی از طریق افزایش رگ زایی است. در این مطالعه، اثر نانوذرات اکسید روی بر پرده کوریوآلاتنوتیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از مطالعات مختلف نشان دادند نانوذرات اکسید روی تهیه شده به روش سبز از عصاره آبی گیاه مرزنجوش (*Origanum majorana*)، به طور معنی داری اثرات ضد رگ زایی داشتند. اثرات ضد رگ زایی نانوذرات روی نشان می دهد این نانوذرات قادرند از گسترش عروق خونی در اطراف سلول های سرطانی ممانعت نمایند (۱۲). بررسی های بیوشیمیایی بر روی گیاه مرزنجوش نشان داده که عصاره آبی گیاه مرزنجوش دارای ترکیباتی از جمله: فلاونوئیدها، مشتقات کافئیک اسید و ترپنین هاست که باعث تأثیرات آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی گیاه مرزنجوش شده است؛ همچنین در طب سنتی ایران و سایر سرزمین ها از این گیاه در قاعدگی های دردناک، آرتریت روماتوئید، اختلالات دستگاه ادراری، اسهال

مطالعه حاضر نشان داد نانوذرات اکسید روی قادرند به صورت وابسته به غلظت، اثرات سایتوتوکسیک بر سلول های رده Hep-G2 و MDA-MB-231 ایجاد نمایند؛ به طوری که میزان غلظت تأثیرگذار (IC_{50}) به دست آمده به ترتیب ۱۵ و ۶۰ میکروگرم در میلی لیتر بود. سرطان های کبد و سینه از خطرناک ترین سرطان های تهدید کننده سلامتی انسان هستند و به بافت های اصلی بدن حمله می کنند. فناوری نانو در درمان این بیماری ها، قدم های بزرگی برداشته است. در مطالعه انجام شده توسط Wahab و همکاران مشخص شد نانوذرات اکسید روی قادرند به صورت وابسته به غلظت، از تکثیر سلول های رده Hep-G2 و MCF-7 ممانعت به عمل آورند. در این مطالعه از غلظت های ۲/۵ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات اکسید روی برای تیمار سلول ها استفاده شد. نتایج حاصل از آزمایش MTT مشخص نمود، این نانوذرات به طور قابل ملاحظه ای ($P < 0.05$) می توانند از رشد و تکثیر سلول های فوق ممانعت نمایند (۱۶).

در مطالعه انجام شده توسط Sharma و همکاران نیز نتایج مشابهی گزارش شد. در این مطالعه سلول های رده Hep-G2 به مدت ۱۲ ساعت با نانوذرات اکسید روی تیمار شدند. نتایج این مطالعه نشان داد غلظت ۱۴-۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر از این نانوذرات قادرند به طور معنی داری از تکثیر سلول های رده Hep-G2 ممانعت کند (۱۷). نتایج به دست آمده از مطالعه Akhtar و همکاران نیز اثرات مشابهی از نانوذرات اکسید روی را بر سلول های رده Hep-G2 نشان داد (۱۸).

نتایج به دست آمده از مطالعه Malaikozhundan و همکاران نشان داد سنتز نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره های گیاهی می تواند اثرات سایتوتوکسیک بیشتری بر سلول های سرطانی رده MCF-7 ایجاد کند. بر اساس این مطالعه، نانوذرات اکسیدروی تولید شده توانستند در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به طور معنی داری از تکثیر سلول های MCF-7 جلوگیری نمایند. همچنین در این مطالعه مشخص

نانوذرات اکسید روی تهیه شده به روش سبز از عصاره آبی گیاه مرزنجوش قادرند از تکثیر سلولی ممانعت نموده و اثرات ضد رگ‌زایی ایجاد نمایند.

نتیجه‌گیری

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های مشخصی از نانوذرات اکسید روی سنتز شده با گیاه آبی مرزنجوش (*Origanum majorana*)، باعث کاهش تعداد عروق خونی در ناحیه تیمار شده روی پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه می‌شود و می‌توان از نانوذرات اکسید روی در انجام آزمایشات تکمیلی بیشتر و کارآزمایی‌های بالینی ضروری به منظور درمان بسیاری از بیماری‌های مرتبط با رگ‌زایی استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

محققین لازم می‌دانند مراتب تشکر خود را از مسئولین و کارشناسان آزمایشگاه‌های گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد ابراز دارند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافی بین نویسندگان و عوامل دخیل در این مطالعه اعلام نشده است.

و استفراغ، تب و یرقان، اختلالات تنفسی از جمله سرفه و به‌عنوان خلط‌آور و آرام‌بخش استفاده می‌شود (۲۳). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد، استفاده از رقت‌های کمتر این ترکیب، اثر معنی‌داری بر روی تعداد و کاهش عروق خونی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه نداشت، اما با بالا رفتن میزان غلظت نانوذرات اکسید روی، میزان رگ‌زایی کاهش یافت. در مطالعه انجام شده توسط Sanaeimehr و همکاران مشخص شد، نانوذرات اکسید روی تهیه شده به روش سبز قادرند به‌طور معنی‌داری از رگ‌زایی در مدل پرده کوریوآلانتوئیک تخم‌مرغ جلوگیری نماید (۷). اثر نانوذرات بر تحریک رگ‌زایی نیز در مطالعات مختلف دیده شده است. در مطالعه Mroczek-Sosnowska و همکاران نانوذرات مس، اثرات تحریک‌کنندگی رگ‌زایی بر مدل پرده کوریوآلانتوئیک تخم‌مرغ ایجاد نمودند (۲۴).

به‌طور کلی نتایج در خصوص اثر نانوذرات بر القای رگ‌زایی یا مهار این فرایند بحث‌برانگیز است. در مطالعه جاری، نانوذرات اکسید روی تهیه شده از عصاره آبی گیاه مرزنجوش، توانستند رگ‌زایی را در مدل پرده کوریوآلانتوئیک تخم‌مرغ کاهش دهد. همچنین علاوه بر کاهش در تعداد و طول رگ‌ها، یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد نانوذرات قادرند وزن و قد جنین جوجه را نیز به‌صورت معنی‌داری کاهش دهند. بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر،

منابع:

- 1- Moloney JN, Cotter TG, editors. ROS signalling in the biology of cancer. Seminars in cell & developmental biology; 2018: Elsevier.
- 1- Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. Semin Cell Dev Biol. 2018; 80: 50-64. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.05.023.
- 2- Pasculli B, Barbano R, Parrella P. Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine. Semin Cancer Biol. 2018; 51: 22-35. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.01.007.
- 3- Rogers MS, D'amato RJ. The effect of genetic diversity on angiogenesis. Exp Cell Res. 2006; 312(5): 561-74. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.10.021
- 4- Tambe P, Kumar P, Paknikar KM, Gajbhiye V. Decapeptide functionalized targeted mesoporous silica nanoparticles with doxorubicin exhibit enhanced apoptotic effect in breast and prostate cancer cells. Int J Nanomedicine. 2018;13:7669-80. doi: 10.2147/IJN.S184634

- 5- 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. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.11.008.
- 6- Ali A, Ahmed S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International journal of biological macromolecules*. 2018; 109: 273-86. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078
- 7- Sanaeimehr Z, Javadi I, Namvar F. Antiangiogenic and antiapoptotic effects of green-synthesized zinc oxide nanoparticles using *Sargassum muticum* algae extraction. *Cancer Nanotechnol*. 2018; 9(1): 3. doi: 10.1186/s12645-018-0037-5.
- 8- Ancona A, Dumontel B, Garino N, Demarco B, Chatzitheodoridou D, Fazzini W, et al. Lipid-coated zinc oxide nanoparticles as innovative ROS-generators for photodynamic therapy in cancer cells. *Nanomaterials (Basel)*. 2018; 8(3): pii: E143. doi: 10.3390/nano8030143.
- 9- Attoub S, Shahrazad S, Kholoud A. PO-419 Use of origanum majorana oil in lung cancer therapy. *ESMO Open* 2018; 3(Suppl 2): A187. doi: 10.1136/esmoopen-2018-EACR25.445
- 10- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*. 1990; 82(13): 1107-12. DOI: 10.1093/jnci/82.13.1107
- 11- Nair S, Sasidharan A, Divya Rani VV, Menon D, Nair S, Manzoor K, et al. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2009; 20 Suppl 1: S235-41. doi: 10.1007/s10856-008-3548-5.
- 12- Safavi E, Homayounitabrizi M, Karimi E. Investigation of Antiangiogenic Properties of Green ZnO Nanoparticles Synthesized By Root Extract of *Persicaria bistorta*. *Sci J Ilam Univ Med Sci*. 2018; 26(2): 45-56. [Persian]
- 13- Ghandehari S, Homayouni Tabrizi M, Ardalan P. Evaluation of Anti-angiogenic Activity of Silver Nanoparticle Synthesis by *Rubina tinctorum* L (Ru-AgNPs) Using Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay. *Arak Med Univ J*. 2018; 21(1): 82-90. [Persian]
- 14- Odisho AY, Rabban JT, Meng MV. Development of CNS-type primitive neuroectodermal tumor in metastatic testicular mixed germ cell tumor. *Urol Case Rep*. 2016; 6: 7-8. doi: 10.1016/j.eurc.2016.01.003
- 15- Kalepu S, Nekkanti V. Improved delivery of poorly soluble compounds using nanoparticle technology: a review. *Drug Deliv Transl Res*. 2016; 6(3): 319-32. doi: 10.1007/s13346-016-0283-1.
- 16- Wahab R, Siddiqui MA, Saquib Q, Dwivedi S, Ahmad J, Musarrat J, et al. ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014; 117: 267-76. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.02.038
- 17- Sharma V, Anderson D, Dhawan A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis*. 2012;17(8): 852-70. doi: 10.1007/s10495-012-0705-6.
- 18- Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Khan MM, Ahmad J, Alrokayan SA. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7: 845-57. doi: 10.2147/IJN.S29129.
- 19- Malaikozhundan B, Vaseeharan B, Vijayakumar S, Pandiselvi K, Kalanjiam MAR, Murugan K, et al. Biological therapeutics of *Pongamia pinnata* coated zinc oxide nanoparticles against clinically important pathogenic bacteria, fungi and MCF-7 breast cancer cells. *Microb Pathog*. 2017; 104: 268-77. doi: 10.1016/j.micpath.2017.01.029.
- 20- Namvar F, Rahman HS, Mohamad R, Azizi S, Tahir PM, Chartrand MS, et al. Cytotoxic effects of biosynthesized zinc oxide nanoparticles on murine cell lines. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015; 2015: 593014. doi: 10.1155/2015/593014.
- 21- Liu T, Liang H, Liu L, Gong Y, Ding Y, Liao G, et al. Influence of pristine and hydrophobic ZnO nanoparticles on cytotoxicity and endoplasmic reticulum (ER) stress-autophagy-apoptosis gene expression in A549-macrophage co-culture. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019; 167: 188-95. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.10.018.

- 22- Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 2000; 5(5): 415-8. DOI: 10.1023/a:1009616228304
- 23- Al Dhaheri Y, Attoub S, Arafat K, AbuQamar S, Viallet J, Saleh A, et al. Anti-metastatic and anti-tumor growth effects of *Origanum majorana* on highly metastatic human breast cancer cells: inhibition of NFκB signaling and reduction of nitric oxide production. *PLoS One*. 2013; 8(7): e68808. doi: 10.1371/journal.pone.0068808.
- 24- Mroczek-Sosnowska N, Sawosz E, Vadalasetty KP, Łukasiewicz M, Niemiec J, Wierzbicki M, et al. Nanoparticles of copper stimulate angiogenesis at systemic and molecular level. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(3): 4838-49. doi: 10.3390/ijms16034838.