هیستوپاتولوژی و اثرات ضدسرطانی نانوذره‌ی نقره در بستر ژلاتین بر سرطان تخمدان موش صحرایی ماده نژاد ویستار

عباسعلی دهپور جویباری*، مستانه میرمیرانی، سیده مرضیه محمدی، مرجان فرهمند

گروه زیست شناسی، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران
*مسئول مکاتبات: dehpour@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۶

چکیده

سرطان تخمدان یکی از شایعترین سرطان‌های موجود در زنان می‌باشد و با اینکه شیوع چندانی ندارد اما یکی از عوامل مهم مرگ و میر در زنان به شمار می‌رود. یکی از مهمترین مشکلاتی که بر سر درمان سرطان قرار دارد عدم وجود داروهای فعال و موثر و همچنین ایجاد مقاومت دارویی نسبت به داروهای موجود می باشد. نانوذرات یکی از شناخته‌شده‌ترین موادی‌اند که خواص ضدسرطانی آنها مورد بررسی قرار گرفته است.از بین این نانوذرات، نانوذره‌ی نقره با دارابودن خواص ضدمیکروبی بسیار قوی مقبولیت بالایی در پزشکی و دندان پزشکی دارد. مطالعه-ی حاضر به منظور بررسی اثرات سایتوتوکسیک نانوذره‌ی نقره بر بستر ژلاتین بر سرطان تخمدان القا شده توسط DMBA بر موش ماده‌ی صحرایی نژاد ویستار صورت گرفته است. در این پژوهش از موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار استفاده شد.حیوانات به ٦ گروه تقسیم شدند: گروه اول گروه نرمال بود. گروه دوم فقط تزریق (DMBA)7,12 Dimethyl bebz(a)anthracene را داشتند. گروه سوم تحت تزریق DMBA+Saline واقع شدند و گروه‌های بعد مورد تزریق مقادیر مختلف نانوذره‌ی نقره بر بستر ژلاتین قرار گرفتند. به منظور القای سرطان از DMBA استفاده شد که مستقیما به داخل تخمدان حیوان تزریق گردید. در این تحقیق خصوصیات هیستوپاتولوژیکی تخمدان در تمام گروه-های آزمایشی مورد سنجش و بررسی قرار گرفت و در انتها اطلاعات جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS16 و آنالیز واریانس یک طرفه تحلیل شد. در این پژوهش نانوذره‌ی نقره بر سلول‌های سرطانی دارای اثرات سمیت قابل توجهی بود. در برش‌های میکروسکوپی بافت تخمدان در گروه‌های دریافت کننده غلظت‌های مختلف نانوذره‌ی نقره بر بستر ژلاتین انسجام بافتی بیشتر، رشد فولیکول‌ها تا اندازه ای نسبت به گروه DMBA کمتر و جسم زرد بیشتری دیده شد.

کلمات کلیدی: سرطان تخمدان، نانو ذره نقره، DMBA

مقدمه

در حال حاضر سرطان یکی از علل عمده‌ی مرگ و میر در جهان است که بر اثر عوامل مختلف مانند: مواد جهش‌زا و مواد شیمیایی سرطان زا در محیط به وجود می‌آید. از نظر ژنتیکی اکثریت آنها مستقیماً به محل خاصی در مولکول DNA متصل گردیده و موجب موتاسیون در سلول‌های سوماتیک و سپس بروز خطاهایی در فرآیند رونوشت برداری، تکثیر و تزاید ژن‌ها می‌گردند [۱، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۲۰، ۲۲، ۲۳، ۳۵]. بر طبق تحقیقات انجام شده بالاترین موارد مرگ و میر در بین سرطان‌های دستگاه تناسلی زنان را بدخیمی‌های تخمدان به خود اختصاص می‌دهند [۲٦]. سرطان تخمدان را می‌توان در رت ها توسط انواع مختلفی از عوامل از جمله هورمون‌ها، پرتوهای یونیزان و مواد کارسینوژن ایجاد نمود. اما یکی از پرکاربرد ترین روش های القای سرطان در رت، استفاده از نوعی ماده ی شیمیایی به

نام ۷ و۱۲ دی متیل بنزآنتراسن می‌باشد که یک هیدروکربن آروماتیک چند حلقه‌ای است که به وفور در دود تنباکو یافت می‌شود [۱۲]. با توجه به پیچیدگی مکانیسم و وجود عوامل متعدد در ایجاد سرطان تاکنون درمان قطعی برای این بیماری یافت نشده است. بنابراین در سال‌های اخیر روش-های نوینی به منظور پیشگیری، درمان و تشخیص این بیماری به کار گرفته شده است [۳۹]. در بسیاری از این روش‌ها می‌توان ردپای نانوفناوری را یافت. از آن جمله نانوذرات نقره را نام برد که علاوه بر خواص باکتریایی، خواص ضد قارچی و ضد ویروسی قوی نیز دارند و لذا مقبولیت بالایی در پزشکی یافته‌اند [۹، ۲۸، ۲۹]. علاوه بر این نانوذرات نقره دارای اثرات سمیت سلولی [٦، ۲۱، ۲۵] بسیار و اثرات ضد سرطانی می‌باشند [۱۵، ۳٤].

این ذرات در اندازه‌های نانومتر می‌توانند به مواد دارویی در ابعاد نانومتریک متصل شده و به صورت اختصاصی توسط سلول‌های سرطانی جذب شوند. با این روش، سلول‌های سالم در معرض مواد دارویی قرار نمی‌گیرند و عوارض جانبی دارو کمتر می‌شود [۱۹، ٤۱]. در سال‌های اخیر شرکت‌های بسیار زیادی در زمینه مواد غذایی و دارویی استفاده از نانوذرات را جهت سلامتی انسان در نظر قرار دادند [۳۰، ٤۰].

یکی از مشهورترین و پر کاربردترین مواد شیمیایی سرطان زا DMBA می‌باشد این ترکیب یکی از مشتقات بنز آنتراسن از خانواده‌ی هیدرو کربن های چند حلقه ای آروماتیک می‌باشد. نام کامل این ترکیب ۷ و ۱۲ دی متیل بنز آنتراسن می‌باشد. این ترکیب یک عامل پیش سرطان زاست و در پروسه فعال سازی متابولیک در کبد تحت تاثیر مونو اکسیژناز خاصی که در سیتوکروم P448 به نام آروماتیک هیدروکربن هیدروکسیلاز معروف است به فرم کارسینوژن بالفعل یا کامل تبدیل می‌شود که آمادگی ترکیب با DNA و ایجاد ترکیب اضافی را پیدا می‌کند. DMBA موجب القای التهاب مزمن و تولید بیش از اندازه‌ی ROS و ایجاد آسیب اکسیداتیو در DNA شده و اثرات مخرب خود را بدین گونه اعمال می‌کند [۲٦]. بنابراین هدف از انجام این پژوهش بررسی هیستوپاتولوژیکی و خواص ضدسرطانی نانوذرهی نقره بر بستر ژلاتین بر سرطان تخمدان القا شده توسط DMBA بر موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار می‌باشد. امید است که نتایج این پژوهش در دستیابی به ترکیبات جدید و کسب اطلاعات بیشتر در ارتباط با سرطان و درمان آن موثر باشد.

مواد و روش کار

این پژوهش از نوع تجربی است. در این تحقیق از موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار که از انستیتو پاستور آمل خریداری شده بودند با میانگین وزنی ۲۰۰-۱۸۰ استفاده گردید. محل نگهداری حیوانات از نظر شرایط فیزیکی دارای دوره ی روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته، دما ۲۵-۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ٤۰ تا ٦۰ درصد بدون آلودگی صوتی بوده و تغذیه ی حیوانات به وسیله‌ی خوراک مخصوص موش (پلت) انجام گرفته است. موش‌ها به طور تصادفی به ٦ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. پس از بیهوش نمودن حیوان با داروی بیهوشی کتامین و زایلزین که بر اساس وزن حیوان به صورت درون صفاقی تزریق گردید حیوان مورد عمل جراحی واقع گردید. پس از تزریق ماده‌ی سرطان زا به تخمدان، منطقه‌ی برش خورده با استفاده از نخ بخیه با دقت بخیه گردید و سپس به طور کامل محل جراحی ضد عفونی شد.

گروه اول: حیوانات هیچگونه تزریقی نداشتند و گروه نرمال محسوب می‌شدند.

گروه دوم: حیوانات برای حصول اطمینان از روش تزریق فقط ماده‌ی سرطان زا (DMBA) را دریافت کردندکه این ماده از شرکت سیگما آلمان تهیه شده بود و پس از مدت زمان ۱۰ روز حیوانات مذکور معدوم و تخمدان مورد تزریق

از بدن آنها خارج و مورد توزین و بررسی‌های پاتولوژی قرار گرفت.

گروه سوم: در این گروه القای تومور در محل تخمدان توسط ماده سرطان زا صورت گرفت اما این دسته از حیوانات از روز دهم به بعد به شکل یک روز در میان تا پایان روز بیستم مورد تزریق درون صفاقی سالین قرار گرفتند.

گروه چهارم: این گروه بعد از القای تومور، از روز دهم به بعد به طور یک روز در میان تزریق عضلانی ۰/۵CC نانوذره‌ی نقره بر بستر ژلاتین با غلظت ۳۰mg/kg را داشتند.

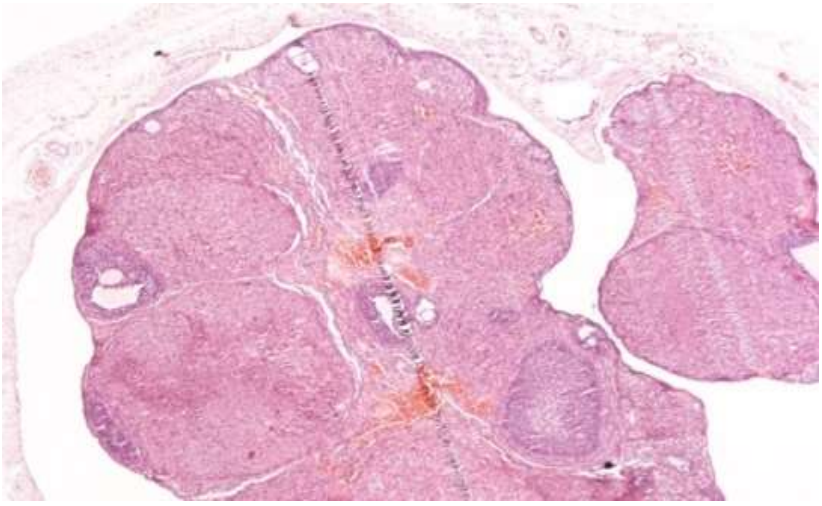
گروه پنجم: این گروه بعد از القای تومور به طور یک روز در میان مورد تزریق درون صفاقی ۰/۵cc نانو ذره ی نقره بر بستر ژلاتین با غلظت ۱۰mg/kg قرار گرفتند.

گروه ششم: این گروه بعد از القای تومور به طور یک روز در میان مورد تزریق درون صفاقی ۰/۵cc نانوذره‌ی نقره بر بستر ژلاتین با غلظت ۵mg/kg قرار داشتند. لازم به ذکر است که القای تومور در هر نمونه توسط ٤ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن DMBA که در ۰/۰۲ میلی‌لیتر روغن کنجد حل شده صورت گرفت.در طول این دوره ی ۲۰ روزه وضعیت حیوانات هر روز بررسی می شد و در روز بیست و یکم تخمدان‌ها از بدن حیوان خارج شدند. توده‌ی استخراج شده از بدن حیوان با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شده و پس از آن جهت پروسه فیکساسیون و در نهایت پاساژ بافتی به محلول فرم آلدهید۰/۱۲ انتقال یافت. برش‌های میکروسکوپی تهیه و با هم مقایسه شدند، قابل ذکر است که کلیه مقاطع جهت تشخیص تحت نظر متخصص پاتولوژی بوده است.

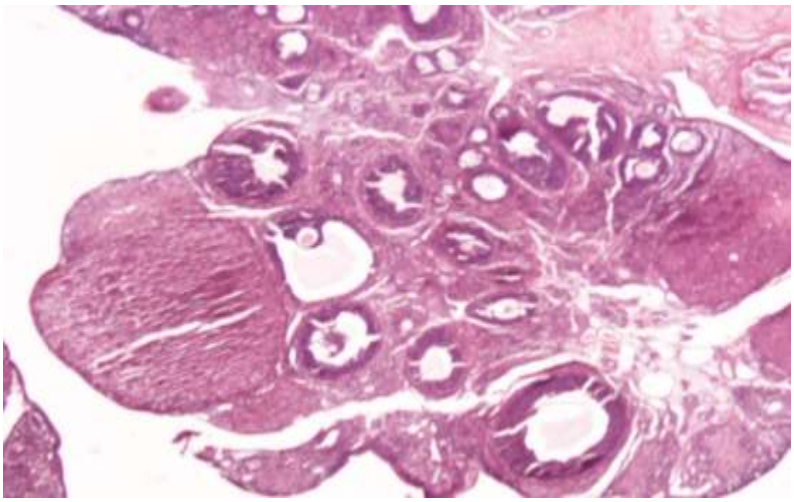
اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS 16 و آنالیز واریانس یک طرفه انجام گردید.

نتایج

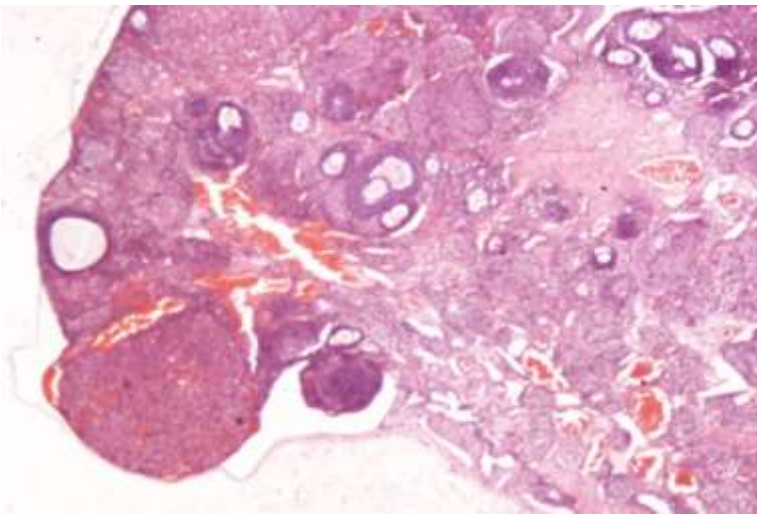
بررسی‌های میکروسکوپی در این پژوهش به عنوان شاخص کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت. در تصویر ۱، برش عرضی از بافت تخمدان موش‌های گروه کنترل یا گروه نرمال، مشاهده می‌شود. در گروه کنترل تعداد و اندازه ی جسم زرد به صورت نرمال می‌باشد، چندین فولیکول در حال نمو هستند. در گروه تحت تزریق DMBA (تصویر۲) کاهش تعداد و اندازه‌ی جسم زرد، وزیکوله و یا حفره دار شدن جسم زرد،به هم ریختگی در نظم تولید فولیکول‌ها ونمو غیر نرمال آنها دیده شد.در گروهی که مورد تزریق غلظت ۵mg/ml نانوذره نقره در بستر ژلاتین در طی ۱۰ روز ،به صورت یک روز در میان قرار گرفت (شکل ۳). رشد فولیکول ها تا اندازه ای نسبت به گروه تحت تزریق DMBA کمتر، تعداد جسم زرد و انسجام بافتی نسبتا بیشتری مشاهده شد. در گروهی که مورد تزریق غلظت ۱۰mg/ml نانوذره نقره در بستر ژلاتین در طی ۱۰ روز، به صورت یک روز در میان قرار گرفت (تصویر٤) نیز انسجام بافتی بیشتر، تعداد فولیکول‌ها نسبت به DMBA کمترو تعداد جسم زرد بیشتری دیده شد. در بافت تخمدان در اثر تزریق دز ۳۰ mg/ml نانوذره‌ی نقره بر بستر ژلاتین طی ۱۰ روز تزریق یک روز در میان (تصویر۵) مشاهده شد که اندازه‌ی جسم زرد به حالت نرمال خود برگشته، رشد فولیکول‌ها به صورت نرمال بوده و تا حدی توانسته اثرات مخرب DMBA را خنثی کند.



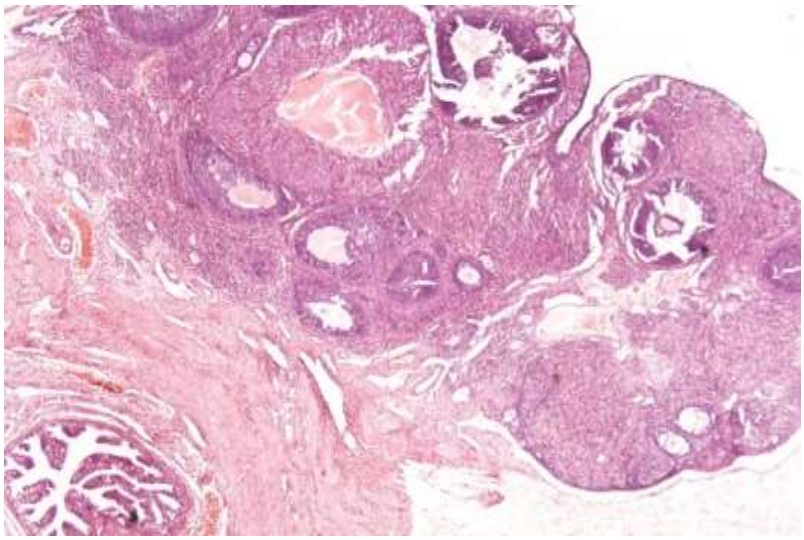
تصویر۱- بافت نرمال تخمدان، تعداد و اندازه جسم زرد نرمال



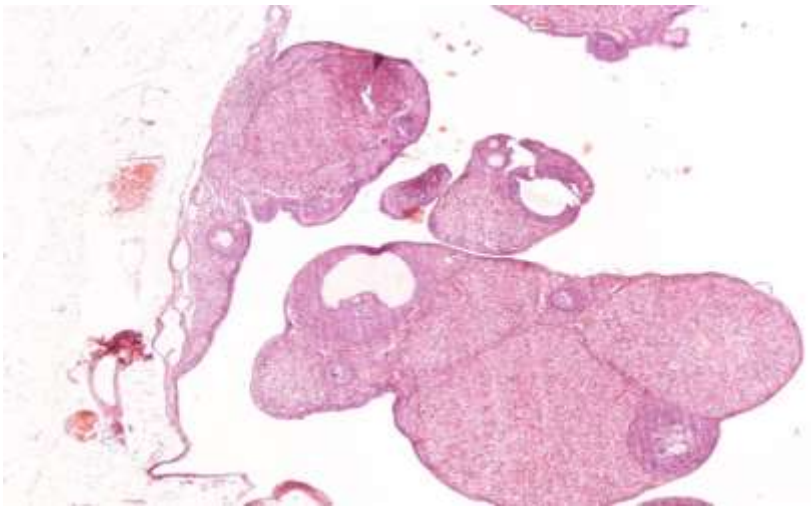
تصویر۲- برش عرضی از بافت تخمدان موش های تیمار شده با تزریق DMBA، کاهش تعداد و اندازه جسم زرد، حفره دار شدن جسم زرد



تصویر۳- برش عرضی بافت تخمدان در موشهای تیمار شده با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره نقره بر بستر ژلاتین ، رشد فولیکول ها تا اندازه ای نسبت به گروه تحت تزریق DMBA کمتر ،تعداد جسم زرد و انسجام بافتی نسبتا بیشتر



تصویر٤- برش عرضی بافت تخمدان در موشهای تیمار شده با غلظت۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره نقره بر بستر ژلاتین انسجام بافتی بیشتر، تعداد فولیکولها نسبت به DMBA کمترو تعداد جسم زرد بیشتر



تصویر۵- برش عرضی بافت تخمدان در موشهای تیمار شده با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذره نقره بر بستر ژلاتین طی ۱۰ روز تزریق یک روز در میان که اندازه ی جسم زرد به حالت نرمال خود برگشته،رشد فولیکولها به صورت نرمال بوده و تا حدی کاهش اثرات مخرب DMBA

بحث

نتایج میکروسکوپی نشان می‌دهد در گروه نرمال بافت تخمدان و تخمک در حالت طبیعی داشته اما در گروه مورد تزریق DMBA، بافت طبیعی دستخوش تغییراتی از جمله کاهش تعداد و اندازه جسم زرد، وزیکوله یا حفره‌ای شدن و به هم ریختگی در نظم تولید فولیکول‌ها و نمو غیرنرمال شده که این تغییرات در تیمارهای مورد تزریق با دوزهای مختلف نانو ذره ی نقره بر بستر ژلاتین رفته رفته کمتر شده اند. گونه‌های اکسیژن فعال در تخمک‌گذاری و بافت

تخمدان و عملکرد جسم زرد اثر می‌گذارند. نانوذره‌ی نقره در بستر نقره با غلظت‌های مختلف توسط خاصیت آنتی-اکسیدانی خود می‌تواند منجر به کاهش اکسیژن فعال شده و در نتیجه تخریبات را کاهش دهد. تحقیقات نشان می‌دهند که نانوذرات فلزی و اکسید فلزی، پلیمری و کربنی می‌توانند بر سلول‌های سرطانی از طریق مکانیزم‌های مختلفی تاثیرگذار باشند: اولین مکانیسم تاثیر نانو ذره بر پروتئین‌ها و فسفولیپیدهای موجود در غشای سلولی می‌باشد. فرضیه دوم شامل تاثیر نانوذرات بر روی پروتئین‌ها و آنزیم‌های درون سلولی است که با اتصال نانوذرات به این ترکیبات حیاتی، کارکرد و فعالیت سلولی محدود یا از بین می‌رود و می‌توانند منجر به تغییرات ساختاری و عملکردی شوند [۱۷]. فرضیه سوم شامل تاثیر نانوذرات روی محتوای هسته و سیستم ژنتیکی سلول می‌باشد، این تاثیر می‌تواند باعث تغییرات عملکردی و مورفولوژیک سلول گردد [۱۳، ۱٤، ۲۷، ۳۸]. مرگ سلول‌ها احتمالابه علت تداخل در عملکرد میتوکندری در سلول‌ها و همچنین نفوذپذیری زیاد نانوذره و تاثیر آن بر دیواره سلول و غشاء سیتوپلاسم و همچنین مهار آنزیم‌ها و تخریب آنها به علت اتصال نانوذره به لیپیدها و پروتئین‌ها می‌باشد [۳، ۱٤]. گزارشاتی درباره آپوپتوزیس، به عنوان مکانیسمی در اثر مهارکنندگی نانوذرات، ارائه شده است [۳۲، ۳۷]. برای مثال Arora و همکاران (۲۰۰۸) اثرات سمیت سلولی توسط نانوذرات را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که نانوذرات توانایی بالقوه‌ای برای نفوذ به غشای سلولی به دلیل سطح بالاتر خود نسبت به حجم دارد و مشاهده گردید زمانیکه سلول‌ها در معرض نانوذرات قرار می‌گیرند، نانو ذره به داخل سلول نفوذ کرده و با رسوب در سلول‌ها، باعث سمیت سلولی و آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی می‌گردد [٤]. Husin و همکاران (۲۰۰۸) مکانیسم دیگری را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند نانوذرات باعث سمیت سلولی و افزایش التهاب در سلول‌های سرطانی می‌شود و همچنین با تحریک چند مسیر سیگنالینگ موجب آپوپتوز و تخریب این سلول‌ها می‌گردد [۱۷، ۳۳]. ROS از روش‌های مختلفی نظیر آسیب رساندن به DNA، تداخل با مسیرهای سیگنالینگ سلولی، تغییرات در روند رونویسی ژن‌ها و ... می‌توانند به سلول‌ها آسیب وارد کنند [۸]. استرس اکسیداتیو می‌تواند به عنوان پاسخی برای آسیب سلولی در نظر گرفته شود [۳۱]. استرس اکسیداتیوی که در اثر نانوذرات ایجاد می‌شود می‌تواند چندین علت داشته باشد: ۱- ROS می‌تواند مستقیماً در زمانی که هم اکسیدان‌ها و هم رادیکال‌های آزاد روی سطح ذرات حضور دارند از سطح نانوذرات ایجاد شوند [۲٤]. ۲- از طریق ورود به میتوکندری. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که نانوذرات خیلی کوچک قادرند تا به میتوکندری وارد شوند و آسیب های فیزیکی را که منجر به استرس اکسیداتیو می‌گردد، ایجاد نمایند [۳۲]. ۳-فعال نمودن سلول‌های التهابی مانند ماکروفاژها و نوتروفیل‌های کیسه‌های هوایی که در روند فاگوسیتوز نانوذرات دخالت دارند. این کار می‌تواند به تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن منجر گردد [۱۸]. نانوذرات فلزی (از جمله دی اکسید تیتانیوم) می‌توانند باعث تولید ROS شوند [۳٦]. تولید ROS در نتیجه حضور نانوذرات می‌توانند آسیب‌های جدی و قابل وراثت را به DNA وارد کند. به عنوان مثال تغییرات شیمیایی در هیستون ها یا دیگر پروتئین‌هایی که در شکل‌دهی ساختار DNA نقش دارند، ساختار مارپیچی DNA را از هم باز می‌کند و DNA را در معرض هر گونه تغییر قرار می‌دهد [۱۳، ۱٤]. ژنوم میتوکندری به طور چشمگیری نسبت به حمله اکسایشی آسیب‌پذیر است (۳۱). آگاروال و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که سطح بالای ROS باعث شکسته شدن غشای خارجی و داخلی میتوکندری شده و در نتیجه منجر به رها شدن پروتئین سیتوکروم c از میتوکندری و فعال شدن آبشار آنزیمی و تحریک آپوپتوز می‌گردد و بنابراین در

فرایند آپوپتوز ROS به عنوان یک میانجی عمل می‌کنند [۲]. مکانیسم‌های مختلفی برای توجیه خصوصیت سمیت سلولی نانوذرات در مواجهه با سلول‌های سرطانی مطرح می‌شوند که در این میان بالا بردن سطح ROS درون سلولی از اهمیت بیشتری برخوردار است [۲].

نتیجه‌گیری

بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که نانو ذره نقره بر بستر ژلاتین موجب کاهش آسیب بافت تخمدان و درمان سرطان تخمدان در موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار شده است اما به طور قطع نمی‌توان مدعی شد چه مکانیسمی موجب این تغییرات بیولوژیک می‌شود چرا که عوامل متنوعی در این امر دخیلند. بنابراین پژوهش‌های دیگر برای مکانیسم عمل و چگونگی تاثیر این مواد بر سلول‌های سرطانی مورد نیاز است تا الگوی مشخص برای درمان بیماران سرطانی به دست آید.

منابع

۱- کرامتی ک.، حبیبی ف.، باباخانی ا.، مهرانپور م. ۱۳۹۰. اثر کتوپروفن برسرطان تخمدان القا شده توسط DMBA (۷ و ۱۲دی متیل بنزو آنتراسن) در موش صحرایی ماده. مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، دوره‌ی سوم، شماره٤، صفحات ۱۳۲-۱۲۵

2- Agarwal A., Saleh R.A., Bedaiwy M.A. (2003), Role of reacyive oxygen species in the pathophysiology of human reproductive. *Fertile and Sterile*, 79(4):829-843.

3- Archer S., Gomberg-Maitland M., Maitland M., Rich S., Garcia J., Weir E. (2008), Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion:a mitochondria-ROS-HIF-1-Kv1.5 O2-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 294: H570-H578.

4- Arora S., Jain J., Rajwade J.M., Paknikar K.M. (2008), Cellular responses induced by silver nanoparticles: *in vitro* studies. *Toxicological Letters*, 179: 93-100.

5- Aslan K., Geddes C.D. (2005). Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology. Curr Opn Biotech. 16: 55-62.

6- Baker C., Pradhan A., Pakstis L. (2005), Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. J Nanosci Nanotechnol, 5: 244-249.

7- Baumber J., Ball B.A., Gravance C.G., Medina V., Davies Morel M.C. (2000), The effect of reactive oxygen species on equine sperm mobility viability acrosomal integrity mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation .J Androl., 21(6): 895-902.

8- Buzea C., Pacheco I.I., Robbie K. (2007), Pache Co,Robbie K.Nanomaterials and nanoparticles :sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4):17-71.

9- Carlson C., Hussain S.M., Schrand A.M., Braydich-Stolle L.K., Hess K.L., Jones R.L. (2008), Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species.J Phys Chem B., 112(43):13608-13619.

10- Cinar S., Gündül G., Mavis B., Colak U. (2011), Synthesis of Silver Nanoparticles by Oleylamine-Oleic Acid Reduction and its Use in Making Nanocable by Coaxial Electrospinning.J Nanosci Nanotechnol., 11(4): 3669-3679.

11- Colleen M., Santoro N.L., Duchsherer D.W. (2007), Antimicrobial Efficacy and Ocular Cell Toxicity from Silver Nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*, 3(2): 55-65.

12- Fruebauf J.P., Bosanquet A.G. (1993), In vitro determination of drug response: a discussion of clinical applications. *Principle and Practice of Oncology*, 7: 25-32.

13- Gill S., Lobenberg R., Ku T., Azarmi S., Roa W., Prenner E.J. (2007), Nanoparticles: characteristics, mechanisms of action, and toxicity in pulmonary drug deliverya review. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3(2): 107-119.

14- Gojova A., Guo B., Kota R.S., Rutledge J.C., Kennedy I.M., Barakat A.I. (2007), Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environmental Health Perspectives*, 115(3): 403.

15- Guan Z.Z. (1991), An experimental study of blood biochemical diagnostic indices for chronic fluorosis. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zh*, 25(1): 33-35.

16- Gurunathan S., Lee K., Kalishwaralal K., Sheikpranbabu S. , Vaidyanathan R., Hyun Eom S. (2009), Antiangiogenic properties of Silver nanoparticles. *Biomaterial*, 30(2009): 6341-6350.

17- Husin, Y.H., Chen C.F., Huang S., Shih T. S., Lai P.S., Chueh P.J. (2008), The Apoptotic Effect of Nanosilver is Mediatedby a ROS- and JNK-Dependent Mechanism Involving theMitochondrial Pathway in NIH3T3 Cells. *Toxicological Letters*, 179: 130-139.

18- Jiaen Li, Muralikrishnan S, Ng Ch, Lanry Yung L, Bay B. (2010), Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Experimental Biology and Medicine*, 235: 1025-1033.

19- Kalishwaralal K., BarathManiKanth S., Pandian S.R.K., Deepak V., Gurunathan S. (2010), Silver nano–a trove for retinal therapies. *Journal of Control Release*, 145(2):76-90.

20- Kelsey J.L., Gammon M.D. (1990), Epidemiology of breast cancer. *Epidemiological Review*, 12(7): 228-240.

21- Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J. (2007), Antimicrobial Effects of Silver Nano Particles. *Journal of Nanomedicine*, 3(1): 95-101.

22- Kim T.N., Fex Q.l., Kim J.Q., Wu J., Wanq H., Chen G.C. (1998), Antimicrobial Effects of Metal Ions in Hydroxyapatite. *Journal of Material Science*, 9(3): 129-34.

23- Kumar A., Jakhmola A. (2007), RNA-mediated fluorescent Q-Pb nanoparticles. *Langmuir*, 23: 2915-2918.

24- Larrisa M., Hempel M. (2012), Recent Advances in Intracellular and In Vivo ROS Sensing: Focus on Nanoparticle and Nanotube Applications. Int. J. Mol. Sci., 13:10660-10679.

25- Lee H.Y., Park H.K., Lee Y.M., Kim K., Park S.B. (2007), A Practical Procedure for Producing Silver Nano Coated Fabric and its Antibacterial Evaluation for Biomedical Applications. *Chemical Communications*, 28(28): 2959-2961.

26- Liu J.Z., Milner J.A. (1992), Age dietary selenium and quantity of 7, 12-dimethylbenz[a] anthraceneinfluence the invivo occurrence of rat mammary DNA adducts. *Journal of Nutrition*, 122(7): 381-386.

27- Mailander V., Landfester K. (2009), Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules*, 10(9): 2379-2400.

28- Morones J.R., Elechiguerra J.L., Yacaman M.J. (2005), The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles. *Journal of Nanotechnology*, 16(10): 2346-2353.

29- Rai M., Yadav A., Gade A. (2009), Silver Nanoparticles and Ant Bacterial as a New Generation of Antimicrobials. *Journal of Biotechnology Advances*, 27(1): 76-83.

30- Shuford K., Schatz G. (2005), Optical Properties of Gold Nanospheres. Nanoscape. 2(1): 2733.

31- Sikka S.C., Rajasekaran M., Hellstrom W.J. (1995), Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology*, 16: 464-468.

32- Singh N., Manshian B., Jenkins G., Griffiths S, Williams P., Maffeis T., Wright C.H., Doak

37- Valeriy V., Balijepalli S. (2007), Modeling the thermodynamics of the interaction of nanoparticles with cell membranes. *Nanoletters*, 7(12): 3716–3722.

38- Vigneshwaran N., Kathe A.A., Varadarajan P.V., Nachane R.P., Balasubramanya R.H. (2007), Functional Finishing of Cotton Fbrics Using Silver Anoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7: 1893-1897.

39- Wagner V., Dullaart A., Bock A.K., Zweck A. (2006), The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology, 24(10):1211-1217.*

40- Woo K., Hye C.H. (2008), Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aurous* and *Escherichia coli*. *Journal of ADA*, 74(7): 217-247.

41- Yezhelyev M.V., Gao X., Xing Y., Hajj A.A., Nie S., Regan R.M.O. (2006), Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncology*, 7: 657–667.

S.H. (2009), NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30(2009): 3891-3914.

33- Sosa I.O., Noguez C., Barrera R.G. (2003), Optical properties of metal nanoparticles with arbitrary shapes. *Journal of Physics and Chemistry*, 107: 6269-6275.

34- Sriram.I., kaanth S.B.M., Kalishwarala L., Gurunathan S. (2010), Antitumor Activity of silver nanoparticel in Daltons lymphoma ascites tumor model. *International Journal of Nanomedicine*, 5: 753.

35- Stefania T., Rosamaria P., Alssandro M. (2008), Molecular and in silico esanalysis of BRCA1 and BRCA2 variants. *Mutation Research*, 644: 64-70.

36- Trouiller B., Reliene R., Westbrook A., Solaimani P., Schiestl R. (2009), Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic InstabilityIn vivo in Mice. *Cancer Research*, 69(22): 8784-8789.