

# The Effect of the Hydroalcoholic Extract of Ferula Assa- Foetida Resin Root and Shoot on the VEGF and FGF Gene Expression in the Chorioallantoic Membrane of Chick Embryos

Mohammadreza Pourmohammad<sup>1</sup>, Jina Khayatzadeh<sup>2\*</sup>, Mostafa Azarizadeh<sup>2</sup>, Vahid Pouresmaeil<sup>3</sup>, Saeedeh Zafar Balanjad<sup>2</sup>

1. Department of Medical Parasitology, Faculty of Paramedicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran.

2. Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

3. Department of Biochemistry, Mashhad Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Received: December 18, 2023; Accepted: March 03, 2024

## Abstract

**Background and Aim:** Angiogenesis is the biological process of sprouting new vessels from existing vessels in the tissue. The main factor in the molecular guidance of this process is vascular endothelial growth factors (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF). Considering the importance of plant medicine sciences and also, the role of angiogenesis in the processes such as wound healing, menstrual cycles, placental growth, and ovulation, the aim of this study was to investigate the effect of hydroalcoholic extract of the root and shoot of *Ferula assa- foetida* plant (as one of the prominent medicinal plants in traditional medicine) on changes in the gene expression of VEGF and FGF in the angiogenesis pathway of the chorioallantoic membrane (CAM) of chick embryos.

**Methods:** In this experimental research, 80 Ross fertilized eggs of the were randomly divided into 8 groups including the control group, laboratory control (pbs), and 6 experimental groups. On the eighth day of incubation, the laboratory control group was treated with normal saline and the experimental groups were treated with doses of 100, 200 and 300 µg/ml of the hydroalcoholic extract of the shoot and root of *Ferula assa- foetida* plant. On the twelfth day, a photo was taken of the chorioallantoic membrane to count the number of vessels and measure the length of the vessels. CAM samples were prepared for RNA extraction and cDNA production. The collected data were analyzed by t-test and ANOVA.

**Results:** The average number of vessels ( $26.1 \pm 3.45$ ) and vessel length ( $31.1 \pm 0.78$ ) in the treated group showed a significant decrease ( $P < 0.05$ ) compared to the control group. Also, the gene expression level of VEGF and FGF in the treated group was significantly ( $P < 0.05$ ) lower than the control group.

**Conclusion:** It seems that the hydroalcoholic extract of *Ferula assa- foetida* plant can affect the gene expression level of VEGF and FGF and the process of angiogenesis of the chorioallantoic membrane of chick embryos.

**Keywords:** *Ferula assa- foetida* resin; Hydroalcoholic extract; chorioallantoic membrane; angiogenesis; VEGF; FGF

**Please cite this article as:** Pourmohammad M, Khayatzadeh J, Azarizadeh M, Pouresmaeil V, Zafar Balanjad S. The Effect of the Hydroalcoholic Extract of Ferula Assa- Foetida Resin Root and Shoot on the VEGF and FGF Gene Expression in the Chorioallantoic Membrane of Chick Embryos. Pejouhesh dar Pezeshki. 2024;48(1):50-62.

\*Corresponding Author: Jina Khayatzadeh; Email: j.khayatzadeh@mshdiau.ac.ir

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



## تأثیر عصاره هیدرولالکلی صمغ ریشه و ساقه گیاه آنفوزه *Ferula assa- foetida* بر بیان ژن‌های VEGF و FGF در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه

محمد رضا پور محمد<sup>۱</sup>، جینا خیاطزاده<sup>۲\*</sup>، مصطفی آذریزاده<sup>۲</sup>، حبیب پور اسماعیل<sup>۳</sup>، سعیده ظفر بالانژاد<sup>۲</sup>

۱- گروه انگلشناسی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران.

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

۳- گروه بیوشیمی، واحد علوم پزشکی مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷

### چکیده

**سابقه و هدف:** آنزیوژن فرایند زیستی جوانه زدن رگ‌های جدید از رگ‌های موجود در بافت است. عامل اصلی در هدایت مولکولی این فرایند، فاکتورهای رشد اندوتیال عروقی (VEGF) و فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) هستند. با توجه به اهمیت علوم گیاه پزشکی و از طرفی نقش رگ‌زایی در فرآیندهایی مانند ترمیم زخم، سیکل‌های قاعدگی، رشد جفت و تخمک‌گذاری، هدف این پژوهش بررسی اثر عصاره هیدرولالکلی ریشه و ساقه گیاه آنفوزه (به عنوان یکی از گیاهان دارویی شاخص در طب سنتی) بر تغییرهای بیان ژن‌های VEGF و FGF در مسیر آنزیوژن پرده کوریوآلانتوئیک (CAM) جنین جوجه بود.

**روش کار:** در این پژوهش تجربی، تعداد ۸۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار نژاد Ross به طور تصادفی به هشت گروه شاهد، شاهد آزمایشگاهی (pbs)، و شش گروه تجربی تقسیم شدند. در روز هشتم انکوباسیون، گروه شاهد آزمایشگاهی با نرمال سالین و گروه‌های تجربی با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدرولالکلی ساقه و ریشه گیاه آنفوزه تیمار شدند. در روز دوازدهم، عکس‌برداری از پرده کوریوآلانتوئیک برای شمارش تعداد عروق و اندازه‌گیری طول عروق انجام شد. تهییه نمونه CAM برای استخراج RNA و ساخت cDNA برای انجام گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده توسط آزمون‌های آماری t-test و ANOVA بررسی شدند.

**یافته‌ها:** میانگین تعداد عروق ( $26 \pm 3/45$ ) و طول عروق ( $31/1 \pm 0/78$ ) در گروه تیمارشده کاهش معناداری ( $P < 0/05$ ) را نسبت به گروه شاهد نشان داد. همچنین میزان بیان ژن‌های VEGF ( $40/30 \pm 45$ ) و FGF ( $42/29 \pm 0/0$ ) در گروه تیمارشده به طور معناداری ( $P < 0/05$ ) کمتر از گروه شاهد بود.

**نتیجه‌گیری:** بمنظور رسیده عصاره هیدرولالکلی گیاه آنفوزه می‌تواند بر میزان بیان ژن‌های VEGF و FGF و روند رگ‌زایی پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه تأثیر گذارد.

**واژگان کلیدی:** صمغ آنفوزه؛ عصاره هیدرولالکلی؛ پرده کوریوآلانتوئیک؛ آنزیوژن؛ VEGF؛ FGF؛

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Pourmohammad M, Khayatzadeh J, Azarizadeh M, Pouresmaeil V, Zafar Balanjad S. The Effect of the Hydroalcoholic Extract of Ferula Assa- Foetida Resin Root and Shoot on the VEGF and FGF Gene Expression in the Chorioallantoic Membrane of Chick Embryos. Pejouhesh dar Pezeshki. 2024;48(1):50-62.

\*نوبنده مسئول مکاتبات: جینا خیاطزاده؛ آدرس پست الکترونیکی: j.khayatzadeh@mshdiau.ac.ir  
گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.



## مقدمه

ترکیب‌های فنلی خواص آنتی اکسیدانی قوی دارند و غالباً در میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شوند (۶).

گیاهان حاوی ترکیب‌های مختلفی از جمله فلاونوئیدها، تانن‌ها، استروئیدها، ساپونین‌ها، آلkalوئیدها، ترپن‌وئیدها، کوئینون‌ها، گلیکوزیدهای قلبی و کومارین هستند که این ترکیب‌ها می‌توانند پتانسیل بالقوه‌ای در درمان بیماری‌های مختلف ناشی از ضایعه‌های پاتولوژیک آنژیوژن را دارا باشند (۷). به تازگی توجه زیادی از محققان به کشف داروهای طبیعی و سنتزی به عنوان ترکیب‌های ضدآنژیوژن معطوف شده است تا بتوانند آنها را به عنوان درمان سرطان‌های مختلف و یا حداقل بخشی از پروتکل‌های درمانی تومورها مطرح کنند (۸).

آنفوزه (*Ferula assa-foetida*) از جمله گیاهان بومی ایران از خانواده چتریان (Apiaceae) است که دارای خواص دارویی فراوانی است. ترکیب‌های اصلی واجد خواص دارویی آن شامل رزین (درصد ۴۰-۶۴)، صمغ (درصد ۲۵) و روغن‌های ضروری (درصد ۱۰-۱۷) است. بخش رزینی آن شامل فروولیک اسید و استرهای آن، کومارین، سزکوبی ترپن کومارین‌ها و سایر ترپن‌وئیدها است (۹). بو و مزه خاص آنفوزه به دلیل وجود ترکیب‌های سولفوره در صمغ آنفوزه است که شامل دی، تری و تتراسولفیدها هستند. صمغ آن دارای گلوکز، گالاكتوز، رامنوز، پلی‌ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها بوده و روغن‌های فرار آن از ترکیب‌های سولفوره و ترپن‌وئیدها تشکیل شده است. آنفوزه در تهیه داروهای ضدقارچ، ضدتشنج، قاعده‌آور و مقوی قلب استفاده می‌شود و در رفع بیماری‌های عصبی و تنفسی نظیر اسپاسم حنجره و آسم و همچنین در رفع یبوست افراد مسن مؤثر است. آثار ضدمیکروبی و ضدانگلی برای آنفوزه نیز گزارش شده است (۱۰).

یکی از مدل‌های آزمایشگاهی برای بررسی آنژیوژن استفاده از پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه است. از طرفی استفاده از تخم مرغ جنین دار یک روش ساده و مقرن به صرفه است و چون پرده کوریوآلانتوئیک یک سیستم بسته است، نیمه عمر ترکیب‌های مختلفی که استفاده می‌شوند نسبت به مدل‌های حیوانی بیشتر خواهد بود (۱۱). با توجه به آثار ضدسرطانی

نخستین رگ‌های خونی در اثر پدیده واסקولوژن از سلول‌های پیش‌ساز آندوتیال با آرایش خاص به وجود می‌آیند و به تدریج شروع به انتشار، توسعه و تشکیل شاخه‌های جدید می‌کنند که به آن آنژیوژن می‌گویند. آنژیوژن یا رگ‌زایی فرآیند تکثیر فعال سلول‌های آندوتیال است و تشکیل رگ‌های فعال مستلزم برهم کنش‌های هماهنگ بین سلول‌های آندوتیال، ماتریکس خارج سلولی و سلول‌های احاطه‌کننده آنها است (۱). این سلول‌ها در بلوغ خاموش هستند، ولی توانایی فعال شدن در پاسخ به عوامل مناسب را دارند. رگ‌زایی یک فرآیند ضروری در فیزیولوژی بدن با واسطه تعادل بین فاکتورهای القاکننده و مهارکننده رگ‌زایی است. در صورتی که این تعادل از بین برود، زمینه برای بروز برخی بیماری‌ها از جمله رشد و متاستاز تومور فراهم می‌شود (۲). مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر بر آنژیوژن شامل فاکتور سلول بنیادی (SCF)، فاکتور رشد اپیتلیال (EGF)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF)، فاکتور رشد مشتق از پلاکت‌ها (PDGF) و همچنین فاکتور رشد عروقی آندوتیالی (VEGF) است (۳).

در بسیاری از بیماری‌های پاتولوژیک نظیر تومورهای پیشرفته متاستاز، ورم مفاصل، تصلب شرائین و بسیاری از بیماری‌های دیگر آنژیوژن به طور چشمگیری افزایش می‌یابد. متاستاز نقش ویژه در گسترس سرطان‌هایی دارد که منجر به مرگ می‌شوند. در طی روند متاستاز سلول‌های سرطانی از طریق عروق خونی مهاجرت نموده و به سایر بافت‌ها وارد می‌شوند و در نهایت سبب درگیر شدن بافت‌های سالم بدن می‌شوند (۴).

از این‌رو مهار رگ‌زایی و متعاقب آن مهار متاستاز سلول‌ها روش مناسب و کارآمدی برای مقابله با سرطان است و شناخت عوامل درگیر در رگ‌زایی نرمال و یا غیرنرمال بسیار مهم و حیاتی به نظر می‌رسد (۵). با توجه به مصرف منابع گیاهی به طور گستردۀ در میان ملل مختلف نقش درمانی آنها در بیماری‌ها اهمیت بسیاری پیدا کرده است. همچنین به دلیل عوارض جانبی کمتر گیاهان انجام مطالعه‌ها با هدف شناسایی ترکیب‌های ضدتوموری و ضررگ‌زایی با منشأ گیاهی اهمیت شایانی پیدا کرده است.

شد. عصاره‌گیری در طی دو روز متوالی انجام شد تا تمام عصاره قابل حل از گیاه استخراج و جدا شود. سپس عصاره در دستگاه روتاتوری تقطیر در خلا قرار داده شد تا یک سوم حجم اولیه تغییط شود. بعد از آن عصاره در انکوباتور با دمای ۴۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت تا به طور کامل خشک شود. در نهایت عصاره خشک شده برای به دست آوردن غلظت‌های مورد نظر با حلال مخصوص (PBS) رقیق شد (۱۳).

#### تزریق به تخمرغ جنین دار

تخمرغ‌های تهیه شده پس از ضدعفونی کردن پوسته آنها با الكل ۷۰ درصد، در دستگاه جوجه‌کشی (ایران درنا سیستم پارس) با دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۵ تا ۶۰ درصد قرار داده شد و دستگاه در وضعیت روشن و در حالت چرخش خودکار قرار گرفت. دستگاه جوجه‌کشی برای تبدیل اتوماتیک و خودکار تخمرغ نطفه‌دار به جوجه یک روزه استفاده می‌شود، در واقع تخمرغ نطفه‌دار در داخل دستگاه قرار گرفته و جوجه یک روزه از آن خارج می‌شود. فرآیند تبدیل تخم به جوجه به صورت اتوماتیک انجام می‌گیرد. روز دوم انکوباسیون در شرایط استریل و زیر هود لامینار به کمک پنس استریل در سمت پهنه تخمرغ سوراخ کوچکی ایجاد و سپس در سمت پهلوی آن پنجره ایجاد شد و محل نیز به وسیله لامل، چسب و پارافیلم استریل پوشانده و تخمرغ‌ها به دستگاه جوجه‌کشی برگردانده شد. روز هشتم انکوباسیون پنجره در زیر هود لامینار باز شد و روی پرده کوریوآلانتوئیک جوجه یک اسفنج ژلاتینی به ابعاد  $4 \times 4 \times 1$  میلی‌متر قرار داده شد تا تیمارها در آن ناحیه انجام گیرد. در نمونه شاهد آزمایشگاهی تیمار با نرمال سالین انجام و در نمونه‌های تحت تیمار با عصاره هیدروالکلی ریشه و ساقه گیاه آنگوزه به اسفنج ژلاتینی مقدار ۱۰ میکرولیتر از عصاره‌های هیدروالکلی آنگوزه با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ و  $300 \mu\text{g}/\text{ml}$  اضافه شد، سپس پنجره‌ها دوباره بسته شدند و تخمرغ‌ها به دستگاه چوچه‌کشی برگردانده شد. در روز دوازدهم انکوباسیون تصاویر از عروق خونی سطح پرده کوریوآلانتوئیک تمام نمونه‌ها با استفاده از فوتواترسترنومیکروسکوپ تحقیقاتی تهیه و با کمک نرم‌افزار imageJ تعداد و طول انشعاب‌های عروقی در سطح مقطع

آنگوزه و نظر به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در مورد آثار عصاره هیدروالکلی صمغ ریشه و ساقه آن روی آنژیوژن پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه مشاهده نشده است، هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن‌های VEGF و FGF در روند آنژیوژن پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه تحت اثر عصاره هیدروالکلی صمغ ریشه و ساقه گیاه آنگوزه بر روی تخمرغ جنین دار به عنوان یک مدل آزمایشگاهی بود. این مطالعه در نیمه اول سال ۱۴۰۲ در دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شد.

#### روش کار

این مطالعه یک پژوهش تجربی بود که در سال ۱۴۰۲ انجام شد. کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی آزاد مشهد با شناسه IR.IAU.MSHD.REC.1402.101 این مطالعه را تأیید کرد. برای انجام آزمایش‌های از تخمرغ‌های نطفه‌دار نژاد Ross به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده شد. نمونه‌های مورد مطالعه از شرکت مرغداری جهاد کشاورزی مشهد تهیه شد. برای انجام مطالعه‌ها تعداد ۸۰ عدد تخمرغ نطفه‌دار مطابق سایر تحقیق‌ها انجام شده به طور تصادفی به هشت گروه آزمایشگاهی تقسیم شدند. گروه‌های مورد مطالعه شامل گروه شاهد (بدون تیمار)، شاهد آزمایشگاهی (تیمار با نرمال سالین)، گروه‌های تجربی ۱ و ۲ و ۳ (تیمار با عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه آنگوزه دوز ۱۰۰ و  $200 \mu\text{l}/\text{ml}$  و گروه‌های تجربی ۴ و ۵ و ۶ (تیمار با عصاره هیدروالکلی ساقه گیاه آنگوزه دوز ۱۰۰ و  $200 \mu\text{l}/\text{ml}$ ) بود (۱۲).

**آماده‌سازی عصاره هیدروالکلی ریشه و ساقه گیاه آنگوزه**  
پودر ریشه و ساقه گیاه آنگوزه از شرکت گیاهان دارویی تهیه شد. عصاره هیدروالکلی توسط روش سوکسله (Soxhlet Extractor) که یک روش متداول علمی آزمایشگاهی است تهیه شد. در این روش مقدار ۱۰۰ گرم از پودر ریشه و یا ساقه داخل کاغذ صافی ریخته و به دستگاه سوکسله که شامل یک بالن ته گرد در بخش پایینی و یک مبرد در بخش فوقانی است، انتقال داده شد. برای تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه آنگوزه، حدود ۲۰۰ سی سی اتانول ۹۶ درصد در محفظه مخصوص ریخته شده و عصاره‌گیری انجام

کمک سایت NCBI طراحی و سپس برای اطمینان از درستی آن BLAST شد. همچنین توالی پرایمر ژن GAPDH به عنوان ھاوس کیپینگ ژن تعیین و طراحی شد. جدول ۱ توالی ھاوس پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق را نشان می‌دهد. در نهایت برای دستیابی به پاسخ بیان ژن تحت تأثیر عصاره‌های موردنظر، واکنش Real Time PCR انجام شد. بر این اساس، ۰.۱ میکرولیتر Master Mix از شرکت Bioneer، هفت میکرولیتر آب مقطر استریل، یک میکرولیتر cDNA تهیه شده، یک میکرولیتر پرایمر Forward و یک میکرولیتر پرایمر Reverse باهم ترکیب شدند. برنامه زمان‌بندی PCR برای بیان ژن VEGF و FGF عبارت بود از: یک مرحله دناتوراسیون اولیه در ۴۰ دقیقه، به دنبال آن ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، به دنبال آن ۲۰ دقیقه اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام گرفت. در پایان محصولات PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید منتقل و الکتروفورز شدند (۱۶).

یکسان برای تمام نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. در پایان کار طول سری-دمی وضعیت مورفولوژیکی و وزن جنین‌های هر گروه نیز بررسی و ثبت شد (۱۴).

### استخراج RNA

برای استخراج RNA، پرده CAM جدا و به درون هاون چینی استریل انتقال داده شد و با استفاده از ازت مایع کوبیده و پودر RNA شد. مراحل استخراج RNA طبق پروتکل کیت استخراج RNA شرکت دنا زیست آسیا (S-۱۰۲۰۱) انجام شد. سپس استخراج شده تغییض شد. نمونه‌های به دست آمده تا مراحل بعدی تحقیق در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اطمینان از درستی استخراج RNA کیفیت و کمیت آن توسط ژل الکتروفورز و تکنیک اسپکتروفوتومتری نانودرایپ بررسی شد. در مرحله بعد از نمونه‌های استخراج شده cDNA سنتز شد. کیت مخصوص سنتز cDNA از شرکت پارس توسعه تهیه و در پایان سنتز cDNAها به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد بازگردانده شدند (۱۵).

### بررسی بیان ژن‌های FGF و VEGF با استفاده از تکنیک Real time PCR

برای بررسی بیان ژن VEGF و FGF پرایمرهای اختصاصی به

جدول ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی ژن‌های FGF و GAPDH، VEGF

ردیف	نام ژن	توالی رفت (Forward)	توالی برگشت (Reverse)
1	VEGF	CCTGCCCTGC TGCTCTACC	CACACAGGATGG CTTGAAG
2	GAPDH	TGCTGGTGCTGAGTATGTGCG	GCATGTCAGATCCACAAACGG
3	FGF	AAACAGCGTCTCAGTATCC	ATCCTCTCCACAAACTCACA

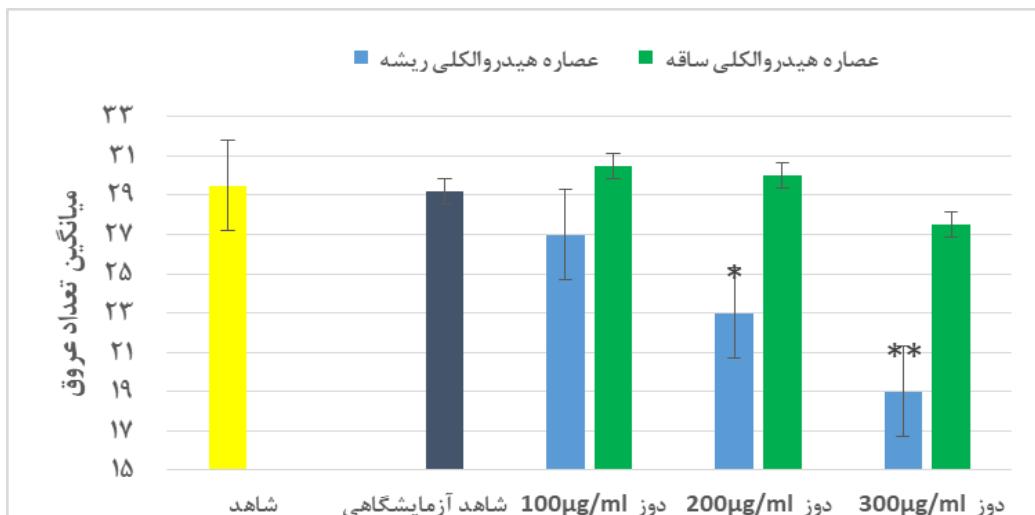
ستونی برای توصیف اطلاعات استفاده شد. سطح معناداری آماری درصد در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

این تحقیق با هدف بررسی روند آنژیوژنیز و میزان تغییرهای بیان ژن VEGF و FGF تحت تیمار با عصاره هیدرولالکلی ساقه و ریشه گیاه آنفوزه در مدل آزمایشگاهی پرده CAM در جنین جوجه انجام گرفت.

### آنالیز آماری

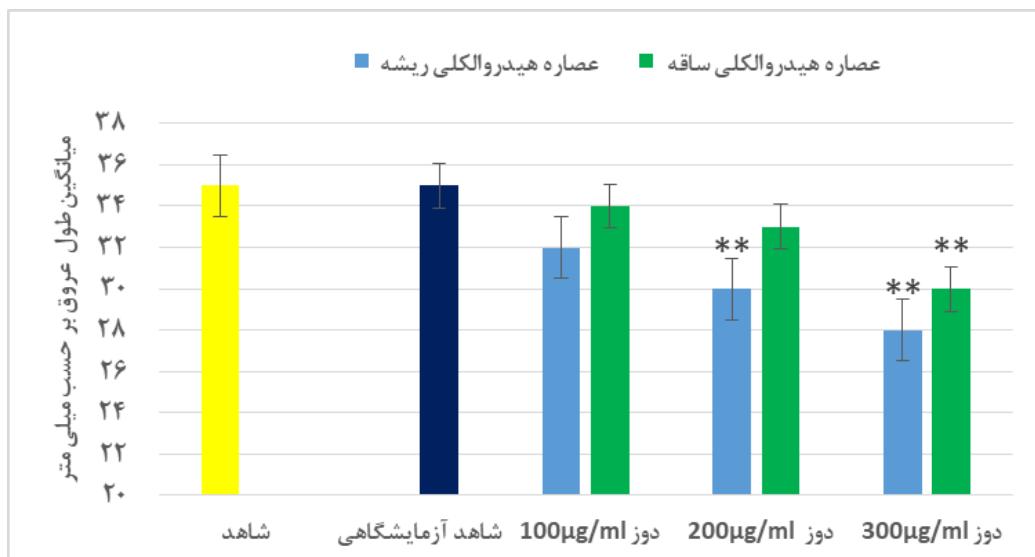
داده‌های جمع‌آوری شده توسط نرم‌افزارهای آماری Excel و SPSS 20 تحلیل شدند. روش‌های آماری استفاده شده در این پژوهش عبارت بودند از: آزمون تی استیودنت (T-student)، آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون توکی (Tukey-Test). همچنین از میانگین، خطای معیار و نمودارهای



نمودار ۱- تعداد انشعباب‌های عروقی در گروه‌های مطالعه شده

(به ترتیب تیمار با  $200 \pm 2/55$  و  $300 \pm 2/55$  میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه آنفوزه) با گروه شاهد نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح خطای ۵ درصد بود. همچنین مقایسه میانگین تعداد عروق در نمونه شاهد با گروه‌های تجربی ۴، ۵ و ۶ (شامل تیمار با  $100$ ،  $200$  و  $300$  میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره هیدروالکلی ساقه گیاه آنفوزه) نشان داد که اختلاف معناداری بین آنها وجود ندارد ( $P > 0.05$ ).

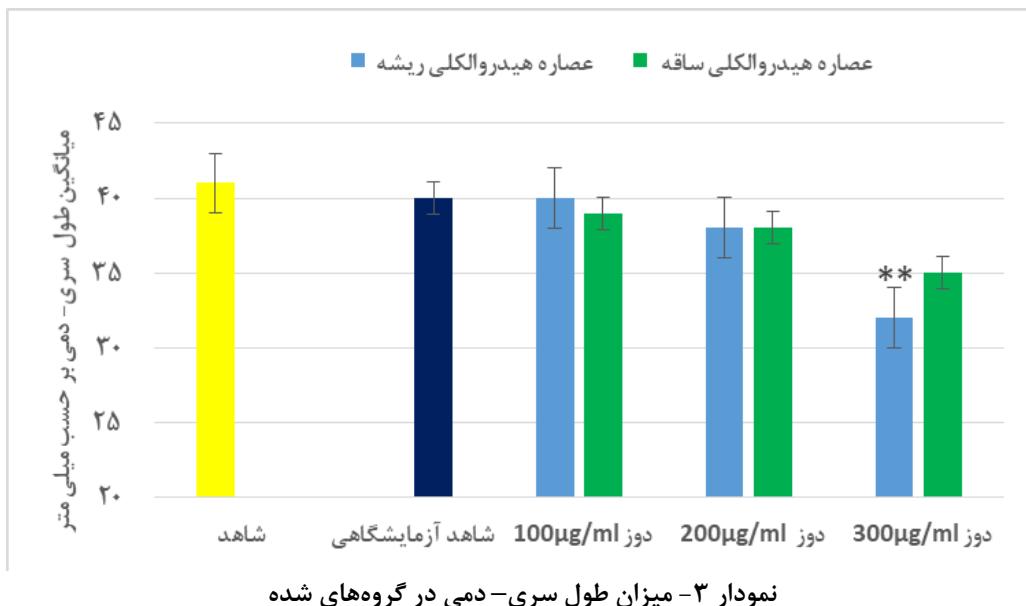
مقایسه میانگین تعداد عروق در گروه شاهد ( $2/45 \pm 2/5$ ) با شاهد آزمایشگاهی ( $1/13 \pm 2/2$ ) نشان داد که اختلاف معناداری بین این دو گروه وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). بنابراین، در بررسی‌های بعدی تمام نمونه‌ها با گروه شاهد مقایسه شد. مقایسه میانگین تعداد عروق بین گروه تجربی ۱ (تیمار با  $100$  میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه آنفوزه) با گروه شاهد نشان داد که تفاوت معناداری وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). اما مقایسه گروه تجربی ۲ ( $2/07 \pm 2/1$ ) و



نمودار ۲- میزان طول انشعباب‌های عروقی در گروه‌های مطالعه شده

گیاه آنفوزه) با گروه شاهد نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح خطای  $0/01$  درصد بود. همچنین مقایسه میانگین طول انشعابات عروقی در نمونه شاهد با گروه‌های تجربی ۴ و ۵ (شامل تیمار با  $100$  و  $200$  میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ساقه گیاه آنفوزه) نشان داد که اختلاف معناداری بین آنها وجود ندارد. اما مقایسه گروه تجربی ۶ (تیمار با  $300$  میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ساقه گیاه آنفوزه) با گروه شاهد نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح خطای  $0/01$  درصد بود.

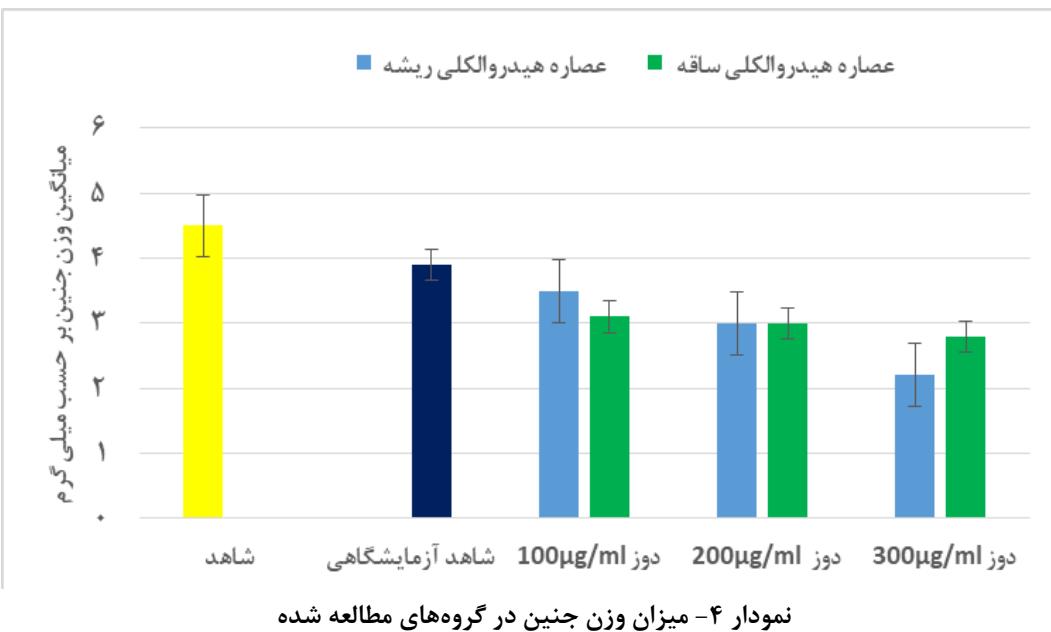
مقایسه میانگین طول انشعاب‌های عروقی در گروه شاهد ( $35/1 \pm 1/35$ ) با شاهد آزمایشگاهی ( $34/9 \pm 1/25$ ) نشان داد که اختلاف معناداری بین این دو گروه وجود ندارد ( $P > 0/05$ ). بنابراین در بررسی‌های بعدی تمام نمونه‌ها با گروه شاهد مقایسه شد. مقایسه میانگین طول عروق بین گروه تجربی ۱ (تیمار با  $100$  میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه آنفوزه) با گروه شاهد نشان داد که تفاوت معناداری وجود ندارد ( $P > 0/05$ ). اما مقایسه گروه تجربی ۲ (تیمار با  $1/82 \pm 1/75$ ) و ۳ ( $30/05 \pm 1/05$ ) و  $300$  میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه  $200$



نمودار ۳- میزان طول سری- دمی در گروه‌های شده

(تیمار با  $300$  میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه آنفوزه) با گروه شاهد نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح خطای  $0/01$  درصد بود. همچنین مقایسه میانگین طول سری- دمی در نمونه شاهد با گروه‌های تجربی ۴، ۵ و ۶ (شامل تیمار با  $100$  و  $200$  و  $300$  میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ساقه گیاه آنفوزه) نشان داد که اختلاف معناداری بین آنها وجود ندارد ( $P > 0/05$ ).

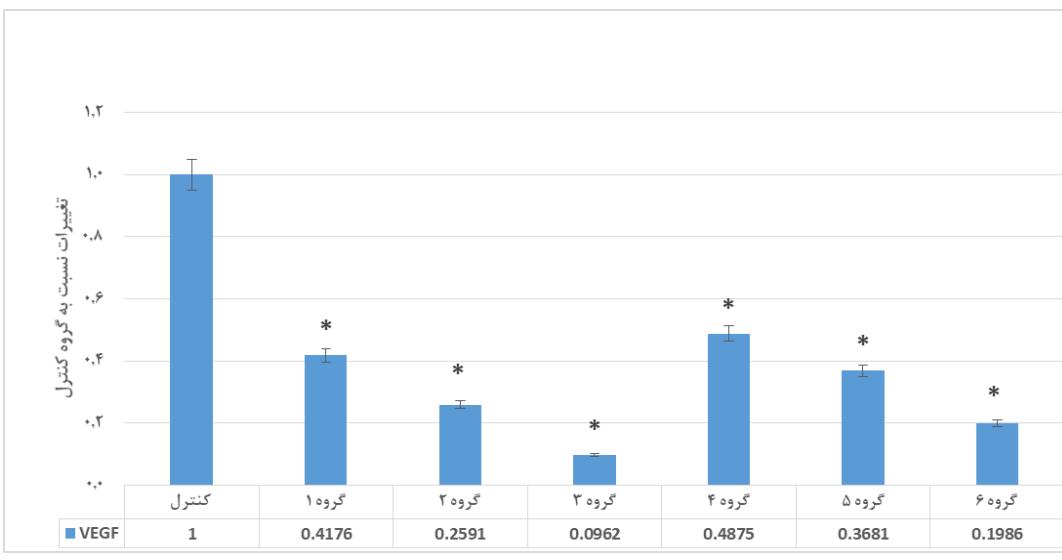
مقایسه میانگین طول سری- دمی در گروه شاهد ( $2/55 \pm 2/55$ ) با شاهد آزمایشگاهی ( $1/15 \pm 0/05$ ) نشان داد که اختلاف معناداری بین این دو گروه وجود ندارد ( $P > 0/05$ ). بنابراین در بررسی‌های بعدی تمام نمونه‌ها با گروه شاهد مقایسه شد. مقایسه میانگین طول سری- دمی بین گروه تجربی ۱ و ۲ (به ترتیب تیمار با  $100$  و  $200$  میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه آنفوزه) با گروه شاهد نشان داد که تفاوت معناداری وجود ندارد ( $P > 0/05$ ). اما مقایسه گروه تجربی ۳



نمودار ۴- میزان وزن جنبین در گروه‌های مطالعه شده

از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه آنفوزه) با گروه شاهد نشان داد که تفاوت معناداری وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). همچنین مقایسه میانگین وزن جنبین‌ها در نمونه شاهد با گروه‌های تجربی ۴، ۵ و ۶ (شامل تیمار با ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ساقه گیاه آنفوزه) نشان داد که اختلاف معناداری بین آنها وجود ندارد ( $P > 0.05$ ).

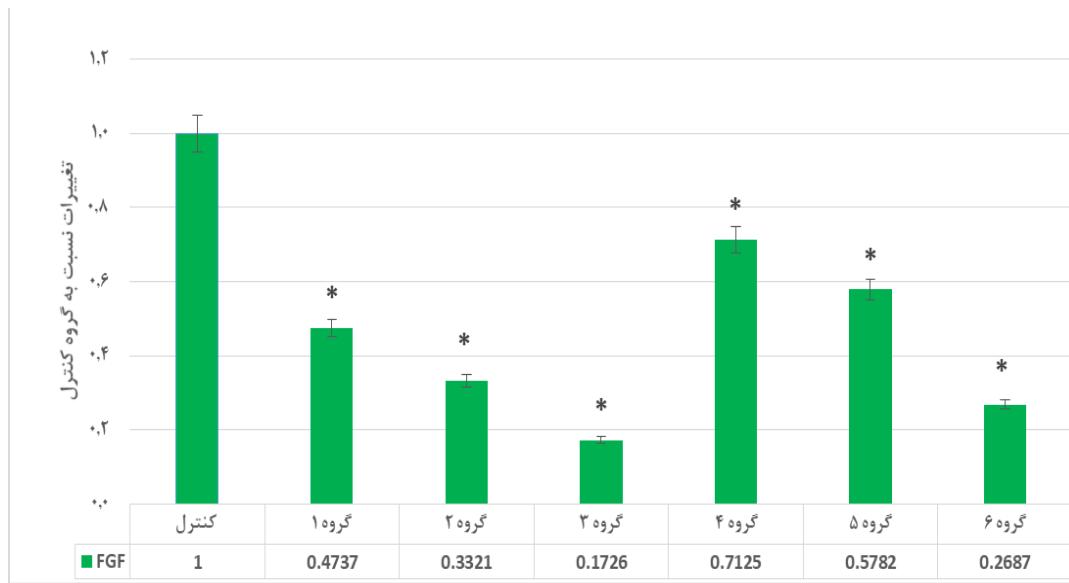
مقایسه میانگین وزن جنبین‌ها در گروه شاهد ( $0.55 \pm 0.05$ ) با شاهد آزمایشگاهی ( $0.2 \pm 0.09$ ) نشان داد که اختلاف معناداری بین این دو گروه وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). بنابراین در بررسی‌های بعدی تمام نمونه‌ها با گروه شاهد مقایسه شد. مقایسه میانگین میانگین وزن جنبین‌ها بین گروه‌های تجربی ۱، ۲ و ۳ (شامل تیمار با ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر



نمودار ۵- میزان بیان زن VEGF در گروه‌های مطالعه شده

آنفوزه) با گروه شاهد نشان داد که تفاوت معناداری در سطح خطای ۵ درصد وجود دارد. همچنین مقایسه میزان بیان ژن VEGF در نمونه شاهد با گروههای تجربی ۴، ۵ و ۶ (شامل تیمار با ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره هیدروالکلی ساقه گیاه آنفوزه) نشان داد که تفاوت معناداری در سطح خطای ۵ درصد وجود دارد.

مقایسه میزان بیان ژن VEGF در گروه شاهد با شاهد آزمایشگاهی نشان داد که اختلاف معناداری بین این دو گروه وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). بنابراین در بررسی‌های بعدی تمام نمونه‌ها با گروه شاهد مقایسه شد. مقایسه میزان بیان ژن VEGF بین گروههای تجربی ۱، ۲ و ۳ (شامل تیمار با ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه



نمودار ۶- میزان بیان ژن FGF در گروههای مطالعه شده

## بحث

نتایج این بررسی نشان داد عصاره هیدروالکلی گیاه آنفوزه می‌تواند به طور معناداری میزان بیان ژن‌های FGF و VEGF روند رگزایی پرده کوربیوآلانتوئیک تخم مرغ جنین‌دار را کاهش دهد. اسید گالبانیک یکی از ترکیب‌های صمغ گیاه آنفوزه است که دارای آثار سیتوتوکسیک روی سلول‌ها بوده و همچنین سبب کاهش تکثیر سلولی می‌شود. بنابراین می‌توان گفت اسید گالبانیک موجود در عصاره این گیاه روی تکثیر سلول‌های آندوتیال عروق خونی اثر مهاری داشته و سبب کاهش تکثیر و در نتیجه کاهش تعداد و طول انشعاب‌های عروقی شده است (Shabestarian و همکاران در مطالعه‌ای اعلام کردند اسید گالبانیک موجود در گیاه آنفوزه منجر به القای آپوپتوز در

مقایسه میزان بیان ژن FGF در گروه شاهد با شاهد آزمایشگاهی نشان داد که اختلاف معناداری بین این دو گروه وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). بنابراین در بررسی‌های بعدی تمام نمونه‌ها با گروه شاهد مقایسه شد. مقایسه میزان بیان ژن FGF بین گروههای تجربی ۱، ۲ و ۳ (شامل تیمار با ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه آنفوزه) با گروه شاهد نشان داد که تفاوت معناداری در سطح خطای ۵ درصد وجود دارد. همچنین مقایسه میزان بیان ژن FGF در نمونه شاهد با گروههای تجربی ۴، ۵ و ۶ (شامل تیمار با ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره هیدروالکلی ساقه گیاه آنفوزه) نشان داد که تفاوت معناداری در سطح خطای ۵ درصد وجود دارد.

تجویز نیتروزاوره (nitrosourea-N-methyl-N) شد. در این مطالعه گزارش شده است که تجویز آنفوزه، موجب تحریک در فعالیت گلوتاتیون اس ترانسفراز، سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون شده است (۲۳). همچنین رزین آنفوزه موجب کاتالاز و بازسازی سیستم آنتی اکسیدانی ناشی از تجویز نیتروز اوره شده است (۲۴). در مطالعه دیگر تجویز ماده سرطان زا روی پوست که موجب تضعیف سیستم آنتی اکسیدانی در سلول‌های پوستی و تشکیل سلول‌های سرطانی می‌شد با پیش درمانی رزین آنفوزه موجب بازسازی سیستم آنتی اکسیدانی و پیشگیری از سرطانی شدن سلول‌های پوست شده است (۲۵). در یک مطالعه تجویز خوراکی آنفوزه موجب مهار دو مرحله گسترش سرطان و همچنین افزایش طول عمر موش‌های سرطانی شده با ماده سرطان زای دی فیل بنر آن ترانس روی پوست شد (۲۶). در یک مطالعه خواص آنتی اکسیدانی رزین آنفوزه در مهار آسیب وارد به DNA در توسط  $H_2O_2$  در مقایسه با آسکوربیک اسید بررسی شد. نتایج نشان داد که اثر رزین آنفوزه در این مورد قویتر از آسکوربیک اسید است (۲۷). نتایج پژوهش حاضر با تحقیق فوق هم راستاست. طبق پژوهش حاضر عصاره هیدرولالکلی گیاه آنفوزه سبب کاهش روند آنزیوژن و جنین جوجه می‌شود. گیاه آنفوزه می‌تواند با کاهش روند رگزایی دارای اثرات بالقوه در درمان سرطان باشد که البته نیازمند انجام مطالعه‌های بالینی است.

در سال‌های اخیر میزان سرطان در جهان روند صعودی داشته است و بنابراین تلاش در جهت جستجوی داروهای ضدسرطانی نیز افزایش پیدا کرده است. به تازگی توجه محققان به استفاده از ترکیب‌های ضد آنزیوژن با منابع مختلف معطوف شده است (۲۸). از جمله پروتئین مهارکننده تریپسین کونیتز، فراکسیون‌های غضروف کوسه، ترکیب‌های گیاهی مانند نوعی پیاز کوچک با نام علمی *Allium ascalonicum*, مریم گلی، *Ficus carica*, انجیر *Salvia officinalis*, کاتابینوئیدها و حتی بارچها یا آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مانند Bevacizumab.

سلول‌های آندوتیالی می‌شود (۱۸). Buhr و همکاران دریافتند کامپتوتسین و توپوتکان که از ترکیب‌های صمغ آنفوزه هستند از رشد سلول‌های آندوتیال انسانی در شرایط *In vitro* جلوگیری می‌کند و این مهار تا ۹۶ ساعت پس از قطع عصاره از محیط، باقی می‌ماند. این دو ترکیب علاوه بر فعالیت ضدرگزایی، می‌توانند از طریق مهار رگزایی نیز به صورت غیرمستقیم اثر ضدتوموری داشته باشند (۱۹). Sarkar ثابت کرد گیاه آنفوزه حاوی مقدار زیادی ایزوفلانوئید است که از تکثیر سلول‌های آندوتیال القاء شده توسط VEGF و FGF ممانعت می‌کند (۲۰). Mallikarjuna در مطالعه طولانی مدت نشان داد که تجویز صمغ آنفوزه از رشد سلول‌های سرطانی پستان ناشی از تجویز نیتروز اوره پیشگیری و زمان ظهور سرطان را به تأخیر می‌اندازد. در این تحقیق دلیل اصلی این تأخیر را اثر مهاری ترکیب‌های موجود در آنفوزه بر کاهش رگزایی در اطراف سلول و بافت سرطانی اعلام شد (۲۱). Jiang و همکاران اعلام کردند آنفوزه حاوی ترکیب‌هایی است که با سلول‌های سرطانی در سطوح مختلف برهمکنش داشته و می‌تواند سبب افزایش آثار تومورکشی پرتو داروها و داروهای شیمیایی شود. همچنین اثرات ضدرگزایی و ضدمتاستازی آن تا حدودی از طریق کاهش بیان آنزیم متالوپروتئیناز ماتریکس (MMP-2) و افزایش بیان مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز یک (TIMP1) می‌باشد (۲۲). نتایج پژوهش حاضر با تحقیق فوق هم راستاست. طبق پژوهش حاضر عصاره هیدرولالکلی گیاه آنفوزه سبب کاهش روند آنزیوژن و کاهش بیان ژن‌های VEGF و FGF در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه می‌شود. نتایج نشان داد که عصاره هیدرولالکلی این گیاه می‌تواند با کاهش روند رگزایی دارای بالقوه در درمان سرطان باشد که البته نیازمند انجام مطالعه‌های بالینی است.

تجویز (Farnesiferol) که یکی از مواد مهم تشکیل‌دهنده رزین آنفوزه است می‌تواند در مهار فاکتور رشد آندوتیوم عروق مؤثر باشد. مهار این فاکتور رشد، موجب مهار سلول‌های تولید سرطان در تکثیر، مهاجرت، تهاجم، تشکیل عروق و بافت همبند می‌شود. تجویز خوراکی شیر آنفوزه به موش آزمایشگاهی موجب مهار رشد سرطان پستان ناشی از

اگرچه تمامی این ترکیب‌ها قادر به مهار آنزیوژن‌زدایی هستند. به نظر می‌رسد ترکیب‌هایی که از گیاهان و داروهای گیاهی تهیه می‌شوند از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر و از سوی دیگر به مقدار زیاد در دسترس هستند. همچنین در صورت استفاده از آنها به صورت خوارکی این ترکیب‌ها به پروتئینازها مقاوم هستند. در مطالعه‌های مختلف به آثار ضدسرطانی آنفوزه در شرایط *in vitro* اشاره شده است (۲۹).

در این تحقیق با توجه به کمبود زمان، آزمایش‌های مولکولی بیشتر انجام نشد که امیداست در آینده در این زمینه تحقیق‌های مولکولی و فارماکولوژی بیشتری انجام شود. همچنین پیشنهاد می‌شود تأثیر گیاه آنفوزه در بیماری‌های متعدد از جمله سرطان و بررسی آثار آن در تأیید یافته‌های این پژوهش بررسی شود.

## نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد عصاره هیدروالکلی گیاه آنفوزه دارای آثار ضررگذاری است. بنابراین بر اساس نتایج پژوهش حاضر عصاره هیدروالکلی گیاه آنفوزه می‌تواند در درمان بیماری‌های مختلف انسانی از جمله سرطان استفاده شود.

## ملاحظات اخلاقی

این مطالعه، در کمیته اخلاق در پژوهش دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم پزشکی مشهد بررسی و با کد اخلاق ۱۰۱.IR.IAU.MSHD.REC.1402 ثبت شده است.

## تشکر و قدردانی

از مشارکت‌کنندگان محترم و تمامی بزرگوارانی که در اجرای پژوهش حاضر ما را یاری نمودند، سپاسگزاریم.

## تعارض منافع

نویسنده‌گان، تعارض منافعی را گزارش نکردند.

## References

- Ramezani T, Baharara J. A review on Angiogenesis in tumor. *J Cell Tissue* 2014; 5(1): 89-100. [Persian]
- Bahararab J, Zafar-Balannezhad S, ShahrokhAbadi K, Hesami Z. Synergic effects of Atorvastatin and low frequency electromagnetic field on chorioallantoic membrane angiogenesis of chick embryo. *J Birjand Univ Med Sci* 2012; 19(2): 148-56. [Persian]
- Vimalraj S, Renugaa S, Dhanasekaran A. Chick embryo chorioallantoic membrane: a biomaterial testing platform for tissue engineering applications. *Process Biochemistry*. 2023 Jan 1; 124:81-91.
- Gulcu A, Akkaya O. Investigation of the antiangiogenic properties of zoledronic acid by using chorioallantoic membrane model. *Dose-Response*. 2022 Apr 7;20(2):15593258221093410.
- CHU, Pei-Yu, et al. Applications of the chick chorioallantoic membrane as an alternative model for cancer studies. *Cells Tissues Organs*, 2022, 211.2: 222-237.
- Boeing H, Bechthold A, Bub A, Ellinger S, Haller D, Kroke A, et al. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *Eur J Nutr* 2012; 51(6): 637-63.
- Prabhakar P, Mukherjee S, Kumar A, Kumar S, Verma DK, Dhara S, Maiti MK, Banerjee M. Optimization of microwave-assisted extraction (MAE) of key phenolic compounds from pigeon pea (*Cajanus cajan L.*), their characterization, and measurement of their anti-diabetic and cytotoxic potential. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2023 Jul 31:1-24.
- Majnooni M, et al. Inhibiting Angiogenesis by Anti-Cancer Saponins: From Phytochemistry to Cellular Signaling Pathways. *Metabolites*, 2023, 13.3: 323.
- Mortazaei S, Rafieian M, Ansary Samani R, Shahinfard N. Comparison of phenolic compoundsConcentrations and antioxidant activity of eight medicinal plants. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2013; 12(7): 519- 30. [Persian]
- Farhangfar A, Tajik H, Razavi Rohani SM, Moradi M, Aliakbarlu J. Combined influence of the clove essential oil and grape seed extract on the spoilage related bacteria of buffalo patties during the storag at 8°C. *J Food Sci Res* 2011; 21(1): 106-16. [Persian]
- Ejaz S, Anwar K, Taj R, Ashraf M. A novel link between angiogenesis and natural products: Anti - angiogenic effects of *Opuntia dillenii*. *Open Life Sci*. 2014;9(3):298-308.
- Niazi F, Shahrokh abadi K, Tehranipour M. The Effects of Total Extract Ocimumbasilicum VEGF Gene Expression Changes in Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Angiogenesis. *JSSU* 2017; 25 (8) :629-640.
- Yuan R, Hou Y, Sun W, Yu J, Liu X, Niu Y, et al. Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. *Ann N Y Acad Sci*. 2017;1401(1):19-27.
- Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reproductive toxicology*. 2017;70:97-101.
- Hormozi M, Talebi S, Khorshid HRK, Zarnani A-H, Kamali K, Jeddi-Tehrani M, et al. The effect of Setarud (IMODTM) on angiogenesis in transplanted human ovarian tissue to nude mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2015;13(10):605.
- Abdullah NK, Shindala MK, Mustafa NG. VEGF Gene Expression and Angiogenesis in the Chorioallantoic Membrane: the Role of Cloprostenol. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*. 2023;54(3):359-68.
- ragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(6):3670-95.
- Shabestarian H, Homayouni Tabrizi M, Movahedi M, Neamati A, Sharifnia F. Putative mechanism for cancer suppression by PLGA nanoparticles loaded with Peganum harmala smoke extract. *Journal of Microencapsulation*. 2021;38(5):324-37.
- Buhr CR, Wiesmann N, Tanner RC, Brieger J, Eckrich J. The chorioallantoic membrane assay in nanotoxicological research—An alternative for in vivo experimentation. *Nanomaterials*. 2020;10(12):2328.
- Sarkar A, Roy A, Maity M, Nayak D, Das S. Ultradiluted *Eupatorium perfoliatum* alleviates DENV-induced fibrosis by regulation of TGFβ1, MMP-9 and interferons. *Future Virology*. 2023;18(12):767-82.
- Mallikarjuna P, Zhou Y, Landström M. The Synergistic Cooperation between TGF-β and hypoxia in Cancer and fibrosis. *Biomolecules*. 2022;12(5):635.
- Jiang K, Liu P, Xu H, Liang D, Fang K, Du S, et al. SASH1 suppresses triple-negative breast cancer cell invasion through YAP-ARHGAP42-actin axis. *Oncogene*. 2020;39(27):5015-30.

23. Sirizi MAG, Ghalenoie JA, Allahtavakoli M, Forouzanfar H, Bagheri SM. Anticancer potential of *Ferula assa-foetida* and its constituents, a powerful plant for cancer therapy. *World Journal of Biological Chemistry*. 2023;14(2):28-39.
24. Pavela R, Morshedloo MR, Lupidi G, Carolla G, Barboni L, Quassinti L, et al. The volatile oils from the oleo-gum-resins of *Ferula assa-foetida* and *Ferula gummosa*: a comprehensive investigation of their insecticidal activity and eco-toxicological effects. *Food and Chemical Toxicology*. 2020;140:111312.
25. Hosseini R, Namavari M, Ghalegolab N, Shirazinejad A, Alipour S. The Effects of zataria multiflora on Angiogenesis of Chorioallantoic Membrane of Chick Embryo. *RJMS* 2022; 28 (12) :206-217.
26. Hamid IS, Aksono EB, Sukmanadi M, Purnama MTE. Antiangiogenesis activity test of tin leaf (*Ficus carica* L.) on the number of blood vessels and VEGF expression of chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs. *Eur J Oncol Pharm*. 2018;1(4):e00007.
27. Sharifalhoseini, M., Es-haghi, A., Vaezi, G., Shajiee, H. Anti-Angiogenic Effects of Synthesized Solid Lipid Nanoparticles Containing *Foeniculum vulgare* Essential Oil. *Journal of Animal Biology*, 2023; 15(3): 243-256.
28. Kachooei SA, Rahmani R, Zareh N, Donyadideh F, Kachooei SA, Nabiuni M, et al. Down-regulation of TGF- $\beta$ , VEGF, and bFGF in vascular endothelial cells of chicken induced by a brittle star (*Ophiocoma erinaceus*) extract. *Heliyon*. 2020;6(1):e03199.
29. Hoseinkhani Z, Norooznezhad F, Rastegari-Pouyani M, Mansouri K. Medicinal plants extracts with antiangiogenic activity: where is the link? *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2020;10(3):370.