

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 Pourmohammad¹, Jina Khayatzaheh^{2*}, Mostafa Azarizadeh², Vahid Pouresmaeil³, Saeedeh Zafar Balanjad²

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 ± 3.45) and vessel length (31.1 ± 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, Khayatzaheh 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 Khayatzaheh; Email: j.khayatzaheh@mshdiau.ac.ir
Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

تأثیر عصاره هیدروالکلی صمغ ریشه و ساقه گیاه آنگوزه *Ferula assa- foetida* بر بیان ژن های VEGF و FGF در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه

محمد رضا پورمحمد^۱، جینا خیاطزاده^{۲*}، مصطفی آذریزاده^۲، وحید پوراسماعیل^۳، سعیده ظفر بالانزاد^۲

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

۲- گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۳

چکیده

سابقه و هدف: آنژیوژنز فرایند زیستی جوانه زدن رگ های جدید از رگ های موجود در بافت است. عامل اصلی در هدایت مولکولی این فرایند، فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) هستند. با توجه به اهمیت علوم گیاه پزشکی و از طرفی نقش رگ زایی در فرآیندهایی مانند ترمیم زخم، سیکل های قاعدگی، رشد جفت و تخمک گذاری، هدف این پژوهش بررسی اثر عصاره هیدروالکلی ریشه و ساقه گیاه آنگوزه (به عنوان یکی از گیاهان دارویی شاخص در طب سنتی) بر تغییرهای بیان ژن های VEGF و FGF در مسیر آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوئیک (CAM) جنین جوجه بود.

روش کار: در این پژوهش تجربی، تعداد ۸۰ عدد تخم مرغ نطفه دار نژاد Ross به طور تصادفی به هشت گروه شامل گروه شاهد، شاهد آزمایشگاهی (pbs)، و شش گروه تجربی تقسیم شدند. در روز هشتم انکوباسیون، گروه شاهد آزمایشگاهی با نرمال سالین و گروه های تجربی با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره هیدروالکلی ساقه و ریشه گیاه آنگوزه تیمار شدند. در روز دوازدهم، عکس برداری از پرده کوریوآلانتوئیک برای شمارش تعداد عروق و اندازه گیری طول عروق انجام شد. تهیه نمونه CAM برای استخراج RNA و ساخت cDNA انجام گرفت. داده های جمع آوری شده توسط آزمون های آماری t- test و ANOVA بررسی شدند.

یافته ها: میانگین تعداد عروق (۳/۴۵ ± ۱/۲۶) و طول عروق (۳۱/۱ ± ۰/۷۸) در گروه تیمار شده کاهش معناداری (P < ۰/۰۵) را نسبت به گروه شاهد نشان داد. همچنین میزان بیان ژن های VEGF (۰/۳۰۴۵) و FGF (۰/۴۲۲۹) در گروه تیمار شده به طور معناداری (P < ۰/۰۵) کمتر از گروه شاهد بود.

نتیجه گیری: به نظر می رسد عصاره هیدروالکلی گیاه آنگوزه می تواند بر میزان بیان ژن های VEGF و FGF و روند رگ زایی پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه تأثیر گذارد.

واژگان کلیدی: صمغ آنگوزه؛ عصاره هیدروالکلی؛ پرده کوریوآلانتوئیک؛ آنژیوژنز؛ 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.

*نویسنده مسئول مکاتبات: جینا خیاطزاده؛ آدرس پست الکترونیکی: j.khayatzadeh@mshdiau.ac.ir

گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

مقدمه

نخستین رگ‌های خونی در اثر پدیده واسکولوژنز از سلول‌های پیش‌ساز آندوتلیال با آرایش خاص به وجود می‌آیند و به تدریج شروع به انتشار، توسعه و تشکیل شاخه‌های جدید می‌کنند که به آن آنژیوژنز می‌گویند. آنژیوژنز یا رگ‌زایی فرآیند تکثیر فعال سلول‌های آندوتلیال است و تشکیل رگ‌های فعال مستلزم برهم کنش‌های هماهنگ بین سلول‌های آندوتلیال، 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 الفاککننده 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 آنژیوژنز شامل فاکتور سلول بنیادی (SCF)، فاکتور رشد اپیتلیال (EGF)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF)، فاکتور رشد مشتق از پلاکت‌ها (PDGF) و همچنین فاکتور رشد عروقی آندوتلیالی (VEGF) است (۳).

در بسیاری از بیماری‌های پاتولوژیک نظیر تومورهای پیشرفته متاستاز، ورم مفاصل، تصلب شرائین و بسیاری از بیماری‌های دیگر آنژیوژنز به طور چشمگیری افزایش می‌یابد. متاستاز نقش ویژه در گسترش 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 این رو 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 گسترده 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 ضد رگ‌زایی با منشأ گیاهی اهمیت شایانی پیدا کرده است.

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

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

آنغوزه (*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 ۶۴-۴۰)، صمغ (درصد ۲۵) و روغن‌های ضروری (درصد ۱۷-۱۰) است. بخش رزینی آن شامل فرولیک اسید و استرهای آن، کومارین، سزکویی ترپن کومارین‌ها و سایر ترپنوئیدها است (۹). بو و مزه خاص آنغوزه به دلیل وجود ترکیب‌های سولفور در صمغ آنغوزه است که شامل دی، تری و تتراسولفیدها هستند. صمغ آن دارای گلوکز، گالاکتوز، رامنوز، پلی‌ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها بوده و روغن‌های فرار آن از ترکیب‌های سولفور و ترپنوئیدها تشکیل شده است. آنغوزه 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 ضد میکروبی و ضدانگلی برای آنغوزه نیز گزارش شده است (۱۰).

یکی از مدل‌های آزمایشگاهی برای بررسی آنژیوژنز استفاده از پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه است. از طرفی استفاده از تخم مرغ جنین‌دار یک روش ساده و مقرون 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

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 تغلیظ 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 تخم‌مرغ جنین‌دار

تخم‌مرغ‌های تهیه شده پس از ضدعفونی کردن پوسته آنها با الکل 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 تخم‌مرغ نطفه‌دار به جوجه یک روزه استفاده می‌شود، در واقع تخم‌مرغ 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 پهن تخم‌مرغ سوراخ کوچکی ایجاد و سپس در سمت پهلویی آن پنجره ایجاد شد و محل نیز به وسیله لامل، چسب و پارافیلیم استریل پوشانده و تخم‌مرغ‌ها 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 ۱×۴×۴ 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 ۳۰۰ $\mu\text{g/ml}$ اضافه شد، سپس پنجره‌ها دوباره بسته شدند و تخم‌مرغ‌ها به دستگاه جوجه‌کشی برگردانده شد. در روز دوازدهم انکوباسیون تصاویر از عروق خونی سطح پرده کوریوآلانتوئیک تمام نمونه‌ها با استفاده از فتواستروئومیکروسکوپ 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 آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه مشاهده نشده است، هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن‌های VEGF و FGF در روند آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه تحت اثر عصاره هیدروالکلی صمغ ریشه و ساقه گیاه آنگوزه بر روی تخم‌مرغ جنین‌دار 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 آزمایشگاهی از تخم‌مرغ‌های 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 تخم‌مرغ نطفه‌دار مطابق سایر تحقیقات 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 ۲۰۰ و ۳۰۰ $\mu\text{l/ml}$) و گروه‌های تجربی ۴ و ۵ و ۶ (تیمار با عصاره هیدروالکلی ساقه گیاه آنگوزه دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۳۰۰ $\mu\text{l/ml}$) 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 سی‌سی 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 هاوس کیپینگ ژن تعیین و طراحی شد. جدول ۱ توالی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق را نشان می‌دهد. در نهایت برای دستیابی به پاسخ بیان ژن تحت تأثیر عصاره‌های مورد نظر، واکنش Real Time PCR انجام شد. بر این اساس، ۱۰ 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 دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ سیکل شامل واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طول‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طول‌سازی 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 شد. مراحل استخراج RNA طبق پروتکل کیت استخراج RNA (شرکت دنا زیست آسیا (S-۱۰۲۰۱) انجام شد. سپس RNA استخراج شده تغلیظ 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 اسپکتروفتومتری نانودراپ بررسی شد و در مرحله بعد از نمونه‌های استخراج شده cDNA سنتز شد. کیت مخصوص سنتز cDNA از شرکت پارس توس تهیه و در پایان سنتز cDNAها به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد بازگردانده شدند (۱۵).

بررسی بیان ژن‌های VEGF و FGF با استفاده از تکنیک Real time PCR
برای بررسی بیان ژن VEGF و FGF پرایمرهای اختصاصی به

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

ردیف	نام ژن	توالی رفت (Forward)	توالی برگشت (Reverse)
1	VEGF	CCTGCCTTGC TGCTCTACC	CACACAGGATGG CTTGAAG
2	GAPDH	TGCTGGTGTGAGTATGTCG	GCATGTCAGATCCACAACGG
3	FGF	AAACAGCGTCTTCAGTATCC	ATCCTCTCCACAAACTCACA

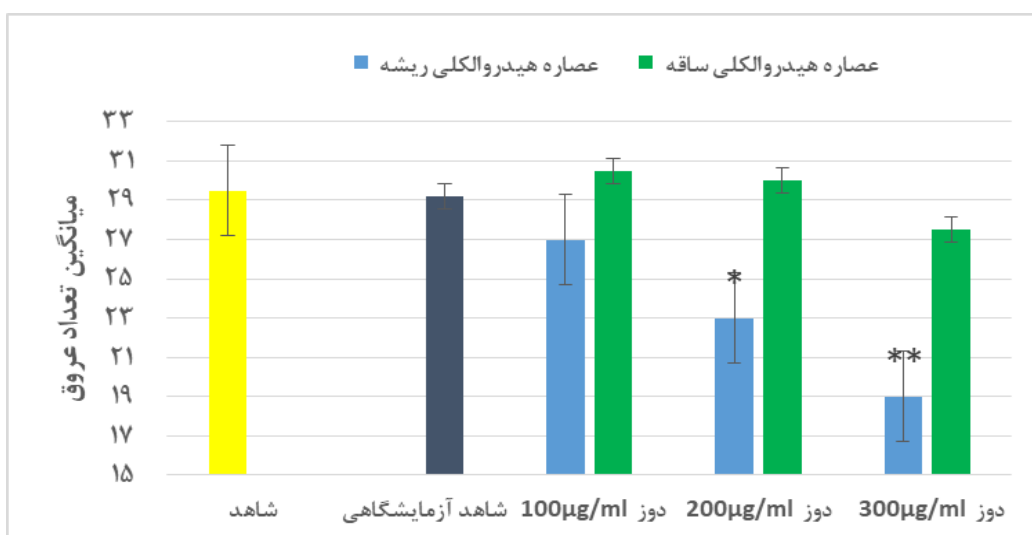
ستونی برای توصیف اطلاعات استفاده شد. سطح معناداری آماری درصد در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

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

آنالیز آماری

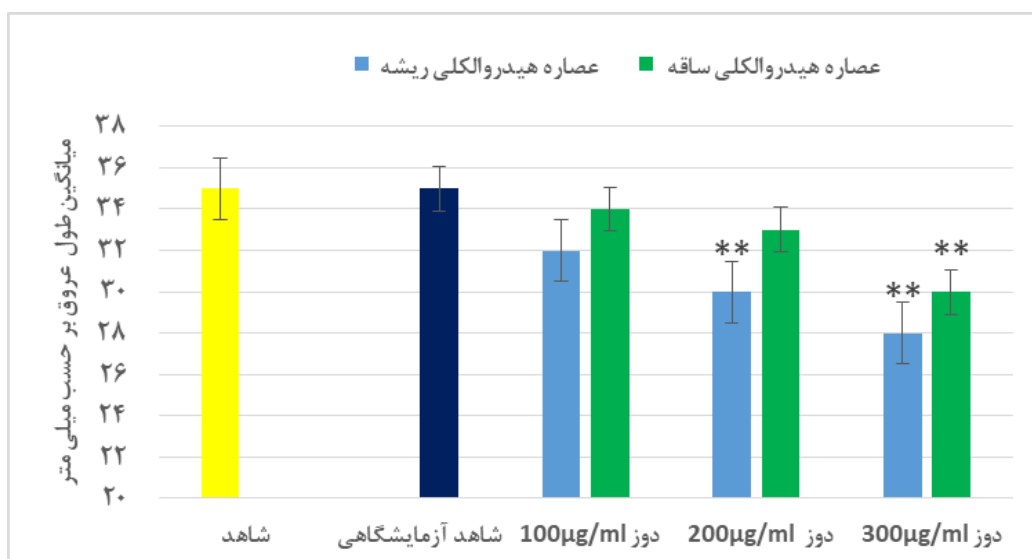
داده‌های جمع‌آوری شده توسط نرم‌افزارهای آماری Excel و SPSS 20 تحلیل شدند. روش‌های آماری استفاده شده در این پژوهش عبارت بودند از: آزمون تی استیودنت (T-student)، آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون توکی (Tukey-Test). همچنین از میانگین، خطای معیار و نمودارهای



نمودار ۱- تعداد انشعاب‌های عروقی در گروه‌های مطالعه‌شده

مقایسه میانگین تعداد عروق در گروه شاهد ($29/5 \pm 2/45$) با شاهد آزمایشگاهی ($29/2 \pm 1/13$) 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 ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه آنغوزه) با گروه شاهد نشان داد که تفاوت معناداری وجود ندارد ($P > 0/05$).

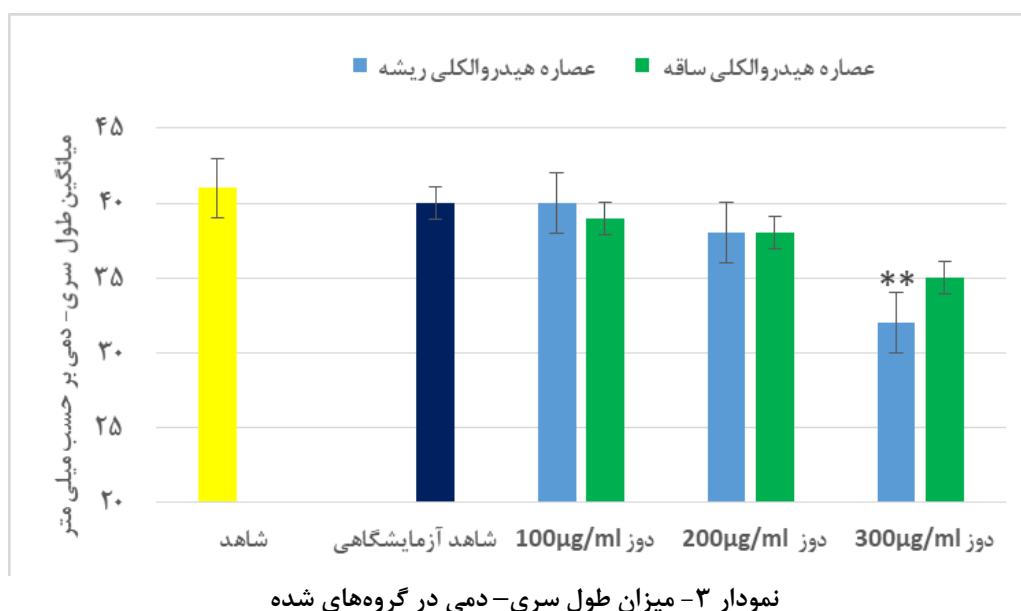
مقایسه میانگین تعداد عروق در گروه شاهد ($29/5 \pm 2/45$) با شاهد آزمایشگاهی ($29/2 \pm 1/13$) نشان داد که اختلاف معناداری بین این دو گروه وجود ندارد ($P > 0/05$). بنابراین، در بررسی‌های بعدی تمام نمونه‌ها با گروه شاهد مقایسه شد. مقایسه میانگین تعداد عروق بین گروه تجربی ۱ (تیمار با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه آنغوزه) با گروه شاهد نشان داد که تفاوت معناداری وجود ندارد ($P > 0/05$). اما مقایسه گروه تجربی ۲ ($23/1 \pm 2/07$) و ۳



نمودار ۲- میزان طول انشعاب‌های عروقی در گروه‌های مطالعه‌شده

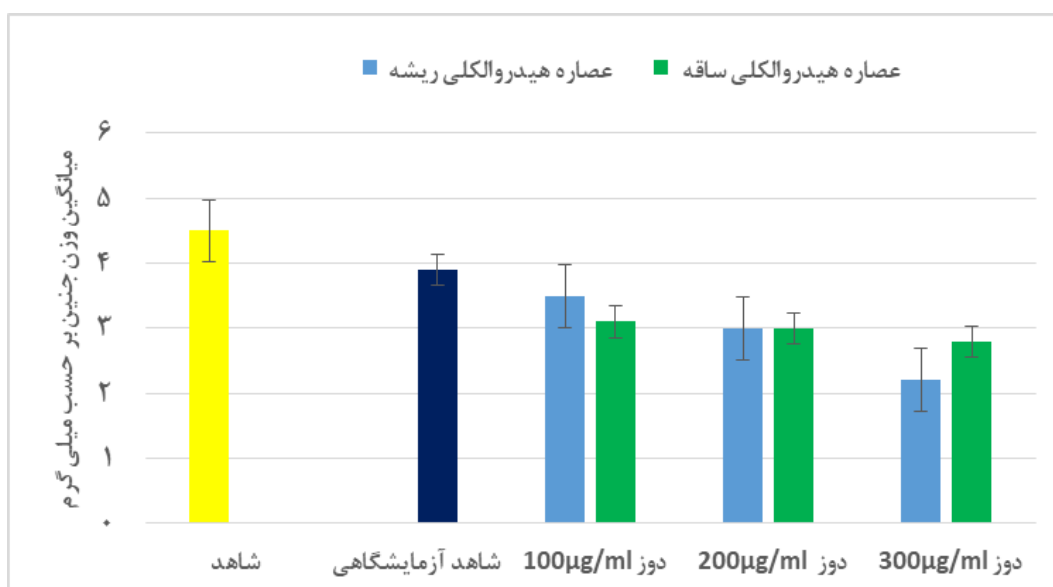
گیاه آنغوزه) با گروه شاهد نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح خطای ۰/۰۱ درصد بود. همچنین مقایسه میانگین طول انشعابات عروقی در نمونه شاهد با گروه‌های تجربی ۴ و ۵ (شامل تیمار با ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ساقه گیاه آنغوزه) نشان داد که اختلاف معناداری بین آنها وجود ندارد. اما مقایسه گروه تجربی ۶ ($1/15 \pm 30/03$) (تیمار با ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ساقه گیاه آنغوزه) با گروه شاهد نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح خطای ۰/۰۱ درصد بود.

مقایسه میانگین طول انشعاب‌های عروقی در گروه شاهد ($1/35 \pm 35/1$) با شاهد آزمایشگاهی ($1/25 \pm 34/9$) 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 ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه آنغوزه) با گروه شاهد نشان داد که تفاوت معناداری وجود ندارد ($P > 0/05$). اما مقایسه گروه تجربی ۲ (به ترتیب تیمار با $1/82 \pm 30/05$) و $1/75 \pm 28/02$) (به ترتیب تیمار با ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه



مقایسه میانگین طول سری - دمی در گروه شاهد ($2/45 \pm 32/2$) (تیمار با ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه آنغوزه) با گروه شاهد نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح خطای ۰/۰۱ درصد بود. همچنین مقایسه میانگین طول سری - دمی 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 آنغوزه) نشان داد که اختلاف معناداری بین آنها وجود ندارد ($P > 0/05$).

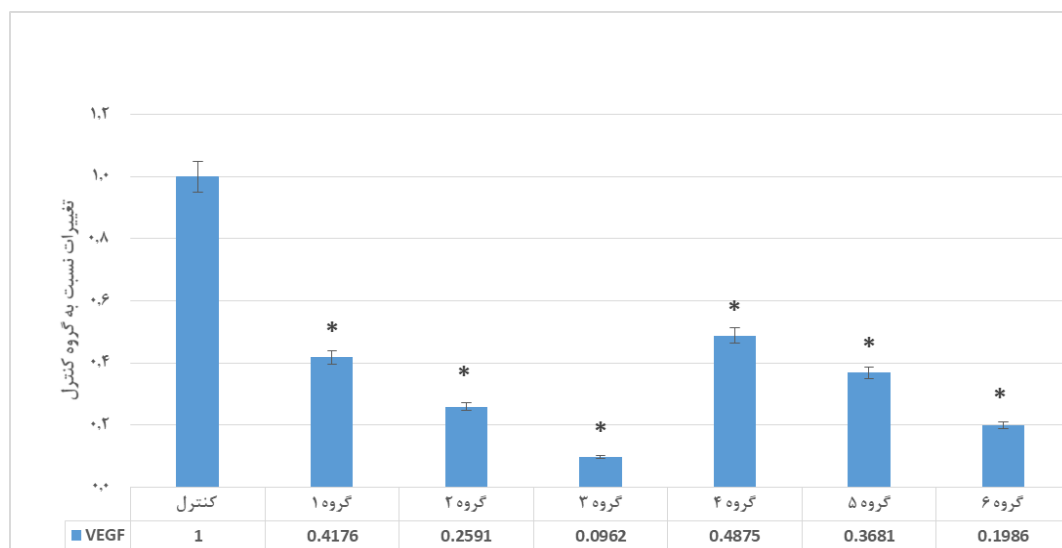
مقایسه میانگین طول سری - دمی در گروه شاهد ($2/55 \pm 41/2$) با شاهد آزمایشگاهی ($1/15 \pm 40/05$) نشان داد که اختلاف معناداری بین این دو گروه وجود ندارد ($P > 0/05$). بنابراین در بررسی‌های بعدی تمام نمونه‌ها با گروه شاهد مقایسه شد. مقایسه میانگین طول سری - دمی بین گروه تجربی ۱ و ۲ (به ترتیب تیمار با ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه آنغوزه) با گروه شاهد نشان داد که تفاوت معناداری وجود ندارد ($P > 0/05$). اما مقایسه گروه تجربی ۳



نمودار ۴- میزان وزن جنین در گروه‌های مطالعه شده

از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه آنغوزه) با گروه شاهد نشان داد که تفاوت معناداری وجود ندارد ($P > 0/05$). همچنین مقایسه میانگین وزن جنین‌ها 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 آنغوزه) نشان داد که اختلاف معناداری بین آنها وجود ندارد ($P > 0/05$).

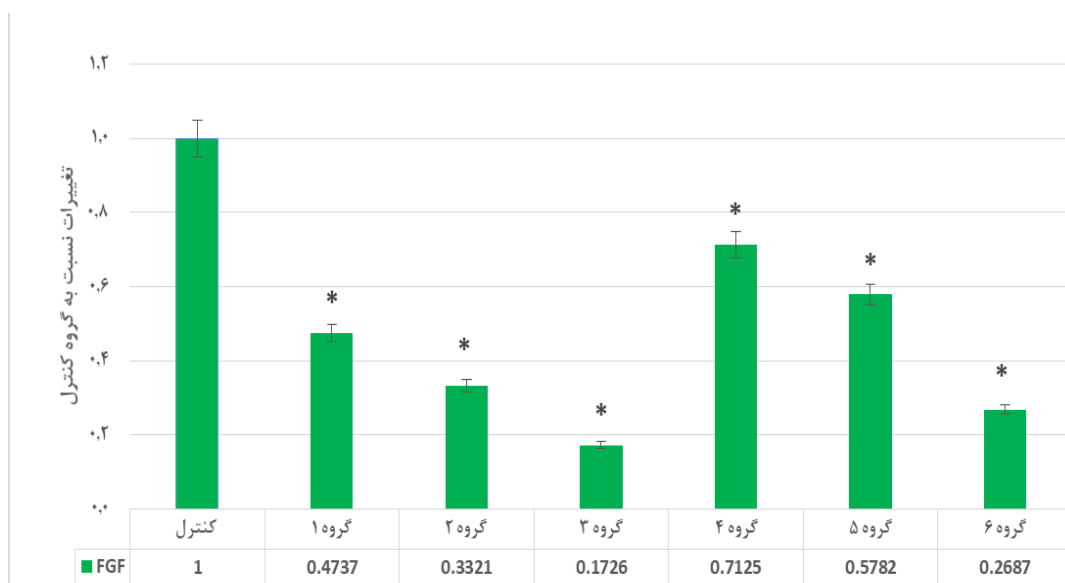
مقایسه میانگین وزن جنین‌ها در گروه شاهد ($4/5 \pm 0/55$) با شاهد آزمایشگاهی ($3/9 \pm 0/2$) نشان داد که اختلاف معناداری بین این دو گروه وجود ندارد ($P > 0/05$). بنابراین در بررسی‌های بعدی تمام نمونه‌ها با گروه شاهد مقایسه شد. مقایسه میانگین وزن جنین‌ها بین گروه‌های تجربی ۱، ۲ و ۳ (شامل تیمار با ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر



نمودار ۵- میزان بیان ژن VEGF در گروه‌های مطالعه شده

آنغوزه) 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 میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ساقه گیاه آنغوزه) 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 میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه



نمودار ۶- میزان بیان ژن FGF در گروه‌های مطالعه شده

بحث

نتایج این بررسی نشان داد عصاره هیدروالکلی گیاه آنغوزه می‌تواند به طور معناداری میزان بیان ژن‌های VEGF و FGF و روند رگ‌زایی پرده کوریوآلانتوتیک تخم‌مرغ جنین‌دار را کاهش دهد. اسید گالبانیک یکی از ترکیب‌های صمغ گیاه آنغوزه 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 آندوتلیال عروق خونی اثر مهاری داشته و سبب کاهش تکثیر و در نتیجه کاهش تعداد و طول انشعاب‌های عروقی شده است (۱۷). Shabestarian و همکاران در مطالعه‌ای اعلام کردند اسید گالبانیک موجود در گیاه آنغوزه 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 میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ریشه گیاه آنغوزه) 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 میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی ساقه گیاه آنغوزه) 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 آنگوزه، موجب تحریک در فعالیت گلوکوتایون اس ترانسفراز، سوپر اکسید دیسموتاز، گلوکوتایون شده است (۲۳). همچنین رزین آنگوزه موجب کاتالاز و بازسازی سیستم آنتی اکسیدانی ناشی از تجویز نیتروزاوره شده است (۲۴). در مطالعه دیگر تجویز ماده سرطانزا روی پوست که موجب تضعیف سیستم آنتی اکسیدانی در سلول‌های پوستی و تشکیل سلول‌های سرطانی می‌شد با پیش درمانی رزین آنگوزه موجب بازسازی سیستم آنتی اکسیدانی و پیشگیری از سرطانی شدن سلول‌های پوست شده است (۲۵). در یک مطالعه تجویز خوراکی آنگوزه موجب مهار دو مرحله گسترش سرطان و همچنین افزایش طول عمر موش‌های سرطانی شده با ماده سرطانزای دی فیل بنر آن ترانس روی پوست شد (۲۶). در یک مطالعه خواص آنتی‌اکسیدانی رزین آنگوزه در مهار آسیب وارده به DNA توسط H_2O_2 در مقایسه با آسکوربیک اسید بررسی شد. نتایج نشان داد که اثر رزین آنگوزه در این مورد قویتر از آسکوربیک اسید است (۲۷). **نتایج پژوهش حاضر با تحقیق فوق هم راستاست.** طبق پژوهش حاضر عصاره هیدروالکلی گیاه آنگوزه سبب کاهش روند آنژیوژنز و کاهش بیان ژن‌های VEGF و FGF در پرده کوریوآلانتویک جنین جوجه می‌شود. گیاه آنگوزه 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 جست‌وجوی داروهای ضدسرطانی نیز افزایش پیدا کرده است. به تازگی توجه محققان به استفاده از ترکیب‌های ضدآنژیوژنز 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 *Salvia officinalis*، انجیر *Ficus carica*، کانابینوئیدها و حتی قارچ‌ها یا آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مانند Bevacizumab.

سلول‌های آندوتلیالی می‌شود (۱۸). Buhr و همکاران دریافتند کامپوتوتسین و توپوتکان که از ترکیب‌های صمغ آنگوزه هستند از رشد سلول‌های آندوتلیال 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 ضد رگ‌زایی، می‌توانند از طریق مهار رگ‌زایی نیز به صورت غیرمستقیم اثر ضدتوموری داشته باشند (۱۹). Sarkar ثابت کرد گیاه آنگوزه حاوی مقدار زیادی ایزوفلاونوئید است که از تکثیر سلول‌های آندوتلیال القاء شده توسط VEGF و FGF ممانعت می‌کند (۲۰). Mallikarjuna در مطالعه طولانی مدت نشان داد که تجویز صمغ آنگوزه از رشد سلول‌های سرطانی پستان ناشی از تجویز نیتروزاوره پیشگیری و زمان ظهور سرطان را به تأخیر می‌اندازد. در این تحقیق دلیل اصلی این تأخیر را اثر مهاری ترکیب‌های موجود در آنگوزه بر کاهش رگ‌زایی در اطراف سلول و بافت سرطانی اعلام شد (۲۱). Jiang و همکاران اعلام کردند آنگوزه 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 ضد رگ‌زایی و ضد متاستاز 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 هیدروالکلی گیاه آنگوزه سبب کاهش روند آنژیوژنز و کاهش بیان ژن‌های VEGF و FGF در پرده کوریوآلانتویک جنین جوجه شد. نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی این گیاه می‌تواند با کاهش روند رگ‌زایی دارای آثار بالقوه در درمان سرطان باشد که البته نیازمند انجام مطالعه‌های بالینی است.

تجویز (Farnesiferol) که یکی از مواد مهم تشکیل‌دهنده رزین آنگوزه است می‌تواند در مهار فاکتور رشد آندوتلیوم 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 آنگوزه به موش آزمایشگاهی موجب مهار رشد سرطان پستان ناشی از

اگرچه تمامی این ترکیبها قادر به مهار آنژیوژنز 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 خوراکی این ترکیبها به پروتئینازها مقاوم هستند. در مطالعه‌های مختلف به آثار ضدسرطانی آنگوزه 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 آنگوزه در بیماری‌های متعدد از جمله سرطان و بررسی آثار آن در تأیید یافته‌های این پژوهش بررسی شود.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد عصاره هیدروالکلی گیاه آنگوزه دارای آثار ضدسرگزایی است. بنابراین بر اساس نتایج پژوهش حاضر عصاره هیدروالکلی گیاه آنگوزه 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 IR.IAU.MSHD.REC.1402.101 ثبت شده است.

تشکر و قدردانی

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

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافی را گزارش نکرده‌اند.

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 compounds Concentrations 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, Ghalenoei 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- β , 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.