# بررسی اثر عصاره‌ی اتانولی صمغ گیاه آنغوزه بر رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه

* **سید دامون صدوقی:** دانشجوی دکتری تخصصی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، ،مشهد، ایران. (*نویسنده مسئول). damoon.sadughi@Gmail.com
**سعیده ظفربالانژاد:** استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران. Mojgan_zafar@yahoo.com
**جواد بهارآرا:** استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران. Baharara@yahoo.com
**خدیجه نژاد شاهرخ آبادی:** استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران. Shahrokhabay@yahoo.com
**راهله رهباریان:** استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. Ra_rahbarian@yahoo.com
**حشمت سپهری مقدم:** استادیار، گروه کشاورزی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. Sepehri.h@pnurazavi.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۹

**چکیده**

**زمینه و هدف:** مهار رگ‌زایی هدف اصلی درمان سرطان و برخی بیماری‌ها می‌باشد. آنغوزه یک گیاه دارویی با اثرات سیتوتوکسیک است. هدف اصلی این پژوهش بررسی اثرات ضد رگ‌زایی صمغ آنغوزه می‌باشد.

**روش کار:** ۴۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار نژاد Hy-line به‌طور تصادفی به ۴ گروه: شاهد سالم، شاهد آزمایشگاهی، تجربی ۱ (تیمار با غلظت ۱۰۰ µg/ml عصاره) و تجربی ۲ (تیمار با غلظت ۲۰۰ µg/ml عصاره) تقسیم شدند. در روز هشتم انکوباسیون در انتهای پهن تخم مرغ‌ها پنجره‌ای باز شد و روی پرده کوریوآلانتوئیک اسفنج ژلاتینی قرار داده شد. به گروه‌های تیمار ۱۰ میکرولیتر عصاره آنغوزه، به گروه شاهد ۱۰ میکرولیتر آب مقطر و به گروه شاهد آزمایشگاهی ۱۰ میکرولیتر حلال دی‌متیل‌سولفوکساید تزریق شد. در روز دوازدهم انکوباسیون از عروق تمام نمونه‌ها عکس برداری شد و مجموع طول و تعداد عروق خونی در اطراف محل تیمار توسط آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey در سطح $p<۰/۰۵$ تحلیل شد.

**یافته‌ها:** میانگین تعداد و مجموع طول انشعابات عروقی در گروه شاهد آزمایشگاهی در مقایسه با تعداد و مجموع طول انشعابات عروقی در گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد. میانگین تعداد و مجموع طول انشعابات عروقی در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی صمغ آنغوزه در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$).

**نتیجه‌گیری:** عصاره اتانولی صمغ آنغوزه مطابق با روش‌های این پژوهش اثر مهاری بر رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه دارد. به‌نظر می‌رسد از ترکیبات موجود در صمغ آنغوزه می‌توان جهت مهار رگ‌زایی در بافت‌های سرطانی استفاده کرد.

**کلیدواژه‌ها:** رگ‌زایی، صمغ آنغوزه، پرده کوریوآلانتوئیک، جنین جوجه.

## مقدمه

یکی از اهداف در درمان سرطان، مهار رگ‌زایی (Angiogenesis) در سلول‌های سرطانی می‌باشد. رشد و تکامل عروق خونی جدید از طریق جوانه زدن سلول‌های آندوتلیال عروق اولیه رگ‌زایی نامیده می‌شود (۱). در حالت‌های فیزیولوژیک مثل چرخه تولید مثل (تخمک گذاری، قاعدگی، لانه گزینی، بارداری) و بهبود زخم‌ها و همین‌طور حالت‌های پاتولوژیک مثل دیابت، آرتریت روماتوئید و سرطان‌ها رگ‌زایی ایجاد می‌شود (۲). فرایند رگ‌زایی به تومورها این امکان را می‌دهد که توسعه یابند. همچنین مشاهده شده است افزایش خون‌رسانی به تومورهای سرطانی منجر به متاستاز می‌شود. تومورهای بدخیم دارای انشعابات عروقی فراوانی هستند و رشدشان سریع است. گسترش سیستم عروقی احتمال تهاجم سلول‌های توموری را از طریق وارد شدن به جریان خون و انتشار به اندام‌های دیگر افزایش می‌دهد (۳). علاوه بر این نشان داده شده است که تشکیل سیستم عروقی در تومورهای بدخیم با قدرت متاستاز تومور رابطه مستقیم دارد. به طور کلی در بافت‌های سالم و پایدار فاکتورهایی که از رگ‌زایی ممانعت می‌کنند

غالب هستند؛ اما در بافت‌هایی که به سرعت تقسیم می‌شوند مولکول‌هایی که فرایند رگ‌زایی را تحریک می‌کنند غلبه دارند؛ به عبارت دیگر در بافت‌های طبیعی فاکتورهای ضد رگ‌زا بیشتر از فاکتورهای رگ‌زا بوده، بنابراین رگ‌زایی رخ نمی‌دهد (۴). عواملی مانند هیپوکسی، کاهش pH، افزایش اسید لاکتیک، پاسخ‌های ایمنی التهابی و موتاسیون در آنکوژن‌ها و سرکوب کننده‌های تومور که باعث افزایش غلظت فاکتورهای رگ‌زا و یا کاهش غلظت فاکتورهای ضد رگ‌زا شوند، این تعادل را بر هم زده و رگ‌زایی صورت می‌گیرد (۵). فاکتورهای رگ‌زا توسط سلول‌های آندوتلیال، سلول‌های التهابی یا توموری به شکل اتوکرین و یا پاراکرین ترشح شده و منجر به رگ‌زایی می‌شوند. مهمترین فاکتورهای رگ‌زا عبارتند از فاکتور رشد آندوتلیال عروقی (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF: Fibroblast Growht Factor)، فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF: Platelet Derived Growth Factor) و آنژیوپوئیتین (۶). در ابتدا دانشمندان بر این عقیده بودند که سلول‌های توموری موادی را ترشح می‌کنند که باعث گشاد شدن رگ‌های خونی شده و به این ترتیب مواد غذایی برای رشد تومور فراهم می‌شود؛ اما امروزه اعتقاد بر این است که سلول‌های توموری موادی ترشح می‌کنند که باعث جوانه زدن رگ‌های قبلی و رگ‌زایی می‌شود (۷). گیاه آنغوزه با نام علمی Ferula assa-foetida گیاهی علفی، دارای ریشه راست و نسبتا ضخیم که دارای ساقه‌ای قوی، خشن و فیبری می‌باشد (۸). ترکیبات اصلی آنغوزه شامل رزین (۴۰-۴۶ درصد)، صمغ (۲۵ درصد) و روغن‌های فرار (۱۰-۱۷ درصد). رزین آن حاوی فرولیک اسید و استرهای آن شامل سزکوئی‌ترپن‌ها، کومارین‌ها و سایر ترپنوئیدها است. صمغ آن محتوی گلوکز، گالاکتوز، رامنوز، پلی‌ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها و روغن‌های فرار آن حاوی ترکیبات سولفوره و ترپنوئیدها می‌باشد (۱۰،۹). ترکیبات سولفوردار صمغ آنغوزه شامل دی، تری و تتراسولفید است. همچنین ترکیبات آمبلیفرون، فرانسیفرول، فرولیک اسید و مشتقات کومارینی فوئتیدین و کامولونول نیز در صمغ آنغوزه وجود دارد (۱۲،۱۱). گزارش شده است عصاره‌ی آبی و الکلی صمغ آنغوزه در شرایط آزمایشگاهی دارای اثرات سایتوتوکسیک و کشندگی بر روی کیست ژیاردیا لامبلیا می‌باشد (۱۳). در مطالعه دیگری مشخص شد عصاره‌ی صمغ آنغوزه اثرات ضد لیشمانیایی مطلوبی دارد. این اثرات به خواص سایتوتوکسیک عصاره‌ی صمغ آنغوزه نسبت داده شد (۱۴). گزارش شده است عصاره صمغ آنغوزه در غلظت‌های بالا می‌تواند موجب تخریب اسپرم و آسیب DNA شود (۱۵). مشخص شد عصاره‌ی اتانولی صمغ آنغوزه موجب تغییرات مورفولوژیک در سلول‌های طبیعی L929 و سلول‌های سرطانی HepG2 می‌شود. همچنین موجب کاهش معنی‌داری در میزان زنده ماندن سلول‌های طبیعی L929 و سلول‌های سرطانی HepG2 شد. این اثرات به خواص سایتوتوکسیک عصاره‌ی اتانولی صمغ آنغوزه نسبت داده شد (۱۶). صمغ آنغوزه حاوی ترکیباتی است که با سلول‌های سرطانی در سطوح مختلف برهمکنش کرده و می‌تواند سبب افزایش اثرات تومورکشی پرتو داروها و داروهای شیمیایی شود. همچنین اثرات ضد رگ‌زایی و ضد متاستازی آن تا حدودی از طریق کاهش بیان آنزیم متالوپروتئیناز ماتریکس (MMP-2) و افزایش بیان مهار کننده بافتی متالوپروتئیناز یک (TIMP1) می‌باشد. لازم به ذکر است که آنزیم‌های مذکور در تنظیم رگ‌زایی و تهاجم سلول توموری نقش مهمی دارند (۱۷). با توجه به اینکه برای گیاه آنغوزه اثرات سایتوتوکسیک پیشنهاد شده است و از طرفی یکی از مکانیسم‌های اصلی درگیر در رشد و متاستاز تومورها رشد عروق خونی و رگ‌زایی می‌باشد، این مطالعه با هدف بررسی اثر عصاره‌ی اتانولی صمغ گیاه آنغوزه بر رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه انجام شد.

## روش کار

این پژوهش یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی است که در آزمایشگاه تحقیقاتی تکوین جانوری گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در سال ۹۲-۱۳۹۱ انجام شد. در این مطالعه، از تخم

مرغ‌های نطفه‌دار نژاد Ross به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده شد. تعداد ۴۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار به طور تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه‌ها شامل: شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تیمار شده با عصاره اتانولی صمغ آنغوزه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشند. عصاره‌گیری به روش سوکسله انجام گرفت. ۲۵ گرم پودر خشک شده صمغ گیاه آنغوزه با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد توسط دستگاه سوکسله به مدت ۲۴ ساعت استخراج شده و پس از آن با حذف حلال توسط اون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد عصاره تام به دست آمد. عصاره تهیه شده در حلال دی‌متیل‌سولفوکساید با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. غلظت‌های تهیه شده تماما از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد و استریل گردید (۱۸). تخم مرغ‌ها به مدت ۸ روز در شرایط طبیعی و در دستگاه انکوباسیون در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد قرار داده شدند. در روز هشتم انکوباسیون در شرایط استریل ایجاد شده توسط هود لامینار بخشی از پوسته انتهای پهن تخم مرغ‌ها برداشته شد و با پنس استریل پرده غشایی انتهای تخم مرغ‌ها برداشته و روی پرده کوریوآلانتوئیک یک اسفنج ژلاتینی (آلبومین سفیده تخم مرغ و محلول آگار در نرمال سالین به نسبت مساوی) به ابعاد ۱×۴×۴ میلی‌متر قرار داده شد. گروه شاهد درشرایط طبیعی نگهداری و به اسفنج ژلاتینی روی پرده کوریوآلانتوئیک توسط میکروپیپت میزان ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد، گروه شاهد آزمایشگاهی با ۱۰ میکرولیتر حلال دی‌متیل‌سولفوکساید تیمار شد و گروه‌های تیمار با ۱۰ میکرولیتر عصاره اتانولی صمغ آنغوزه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار شدند. در تمامی گروه‌ها محل تزریق، زمان تزریق و میزان تزریق عصاره یکسان می‌باشد. از تمام گروه‌ها در روز دوازدهم انکوباسیون از محدوده محل قرارگیری اسفنج ژلاتینی به کمک فوتواسترئومیکروسکوپ تحقیقاتی مجهز به دوربین عکاسی (ziess, Germany) و دوربین دیجیتال (Cannon, Japan) تصاویری با درشتنمایی ۲۶ برابر تهیه شد. مجموع طول و تعداد انشعابات عروقی در اطراف ناحیه تیمار (۴ مربع به ابعاد ۱۰۰×۱۰۰ پیکسل در ۴ طرف اسفنج ژلاتینی) به طور تصادفی توسط نرم افزار ImageJ (ویرایش ۲) اندازه‌گیری شد. داده‌ها به وسیله نرم افزار آماری SPSS (ویرایش ۲۰) به کمک آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey در سطح $p<۰/۰۵$ تحلیل شدند.

**یافته‌ها**

بر اساس نتیجه آزمون آنالیز واریانس یکطرفه تفاوت معنی‌داری در میانگین تعداد و مجموع طول انشعابات عروقی در گروه شاهد آزمایشگاهی در مقایسه با گروه شاهد وجود نداشت. عدد p بدست آمده برای میانگین تعداد ۰/۱۲۳ و برای مجموع طول انشعابات عروقی ۰/۰۹۹ می‌باشد. میانگین تعداد و مجموع طول انشعابات عروقی در غلظت‌های ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی صمغ آنغوزه در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد عدد p بدست آمده برای میانگین تعداد ۰/۰۱۸ و برای مجموع طول انشعابات عروقی ۰/۰۲۹ می‌باشد. میانگین تعداد و مجموع طول انشعابات عروقی در غلظت‌های ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی صمغ آنغوزه در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد عدد p بدست آمده برای میانگین تعداد ۰/۰۱۱ و برای مجموع طول انشعابات عروقی ۰/۰۱۲ می‌باشد.

به منظور مشخص نمودن اینکه چه گروه‌هایی با همدیگر تفاوت آماری معنی داری دارند، از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد تفاوت معنی‌داری در میانگین تعداد و مجموع طول انشعابات عروقی در گروه شاهد آزمایشگاهی در مقایسه با گروه شاهد وجود نداشت. عدد p بدست آمده برای میانگین تعداد ۰/۲۰۹ و برای مجموع طول انشعابات عروقی ۰/۱۲۷ می‌باشد. میانگین تعداد و مجموع طول انشعابات عروقی در غلظت‌های ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی صمغ آنغوزه در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد عدد p بدست آمده

جدول ۱- نتایج میانگین تعداد انشعابات عروقی به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه

| گروه‌ها (n=۱۰) | متغیر | میانگین تعداد± انحراف معیار | ANOVA (p-value) | Tukey(p-value) |
|---|---|---|---|---|
| شاهد | | ۳۶/۲۰±۵/۲۶ | | |
| شاهد آزمایشگاهی | | ۳۴/۰۰±۷/۷۴ | ۰/۱۲۳ | ۰/۲۰۹ |
| تیمار با غلظت ۱۰۰ عصاره‌ی صمغ آنغوزه | | ۱۹/۱۰±۳/۳۴ | *۰/۰۱۸ | *۰/۰۱۳ |
| تیمار با غلظت ۲۰۰ عصاره‌ی صمغ آنغوزه | | ۱۳/۴۰±۴/۷۶ | *۰/۰۱۱ | *۰/۰۰۵ |

* معنی‌داری در سطح p<۰/۰۵

جدول ۲- نتایج میانگین مجموع طول انشعابات عروقی به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه

| گروه‌ها (n=۱۰) | متغیر | میانگین طول± انحراف معیار | ANOVA (p-value) | Tukey(p-value) |
|---|---|---|---|---|
| شاهد | | ۲۰/۶۵±۳/۸۵ | | |
| شاهد آزمایشگاهی | | ۱۹/۱۹±۴/۱۹ | ۰/۰۹۹ | ۰/۱۲۷ |
| تیمار با غلظت ۱۰۰ عصاره‌ی صمغ آنغوزه | | ۹/۱۱±۵/۳۸ | *۰/۰۲۹ | *۰/۰۱۷ |
| تیمار با غلظت ۲۰۰ عصاره‌ی صمغ آنغوزه | | ۷/۷۱±۴/۰۰ | *۰/۰۱۲ | *۰/۰۰۸ |

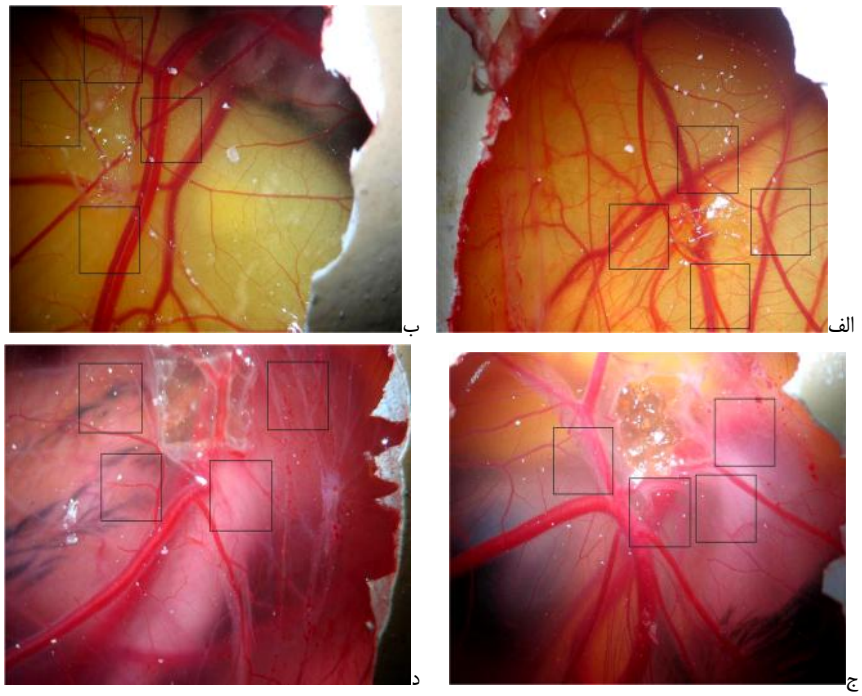
* معنی‌داری در سطح p<۰/۰۵

برای میانگین تعداد ۰/۰۱۳ و برای مجموع طول انشعابات عروقی ۰/۰۱۷ می‌باشد. میانگین تعداد و مجموع طول انشعابات عروقی در غلظت‌های ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره اتانولی صمغ آنغوزه در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد عدد p بدست آمده برای میانگین تعداد ۰/۰۰۵ و برای مجموع طول انشعابات عروقی ۰/۰۰۸ می‌باشد.

در تصاویر فوق فلش بزرگ محل اسفنج ژلاتینی و فلش‌های کوچک کاهش محسوس انشعابات عروقی (طول و تعداد) را در نمونه تیمار با عصاره اتانولی صمغ آنغوزه نشان می‌دهد. چهار مربع سیاه رنگ در اطراف اسفنج ژلاتینی، سطح اندازه گیری به ابعاد ۱۰۰×۱۰۰ پیکسل را نشان می‌دهد که به صورت تصادفی در اطراف اسفنج قرار داده شده است.

## بحث و نتیجه گیری

بر اساس نتایج این پژوهش عصاره‌ی اتانولی صمغ گیاه آنغوزه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰




شکل۱- الف) گروه شاهد، ب) گروه شاهد آزمایشگاهی، ج) گروه تجربی ۱: تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، د) گروه تجربی ۲: تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (بزرگنمایی ۲۶ برابر)

میکروگرم بر میلی‌لیتر، تعداد و طول انشعابات عروقی را به طور موضعی و وابسته به غلظت در اطراف محل تیمار در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه کاهش داد (شکل ۱). بدین صورت که با افزایش غلظت عصاره، میانگین مجموع تعداد و طول انشعابات عروقی در اطراف محل تیمار به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. با توجه به اینکه اثر ضد رگ‌زایی صمغ گیاه آنغوزه در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر اساس نتایج این پژوهش به اثبات رسیده است به نظر می‌رسد می‌توان از ترکیبات موجود در صمغ گیاه آنغوزه با انجام تحقیقات بیشتر به عنوان مکملی همراه با داروهای شیمی درمانی به منظور مهار رگ‌زایی در تومورها استفاده نمود. اسید گالبانیک ترکیبی است که از صمغ گیاه آنغوزه بدست می‌آید و دارای اثرات سیتوتوکسیک و باعث کاهش تکثیر سلولی می‌شود بنابراین می‌توان گفت اسید گالبانیک موجود در عصاره این گیاه روی تکثیر سلول‌های آندوتلیال عروق خونی اثر مهاری داشته و باعث کاهش تکثیر و در نتیجه کاهش تعداد و طول انشعابات عروقی شده است (۲۰،۱۹). گزارش شده است فروتینین موجود در صمغ گیاه Ferula ovina موجب القای آپوپتوزیس در سلول‌ها می‌شود. با توجه به اینکه فروتینین از صمغ گیاه Ferula assa-foetida بدست آمده است بنابراین می‌توان کاهش ایجاد شده در طول و تعداد انشعابات عروقی در اطراف محل تیمار را به اثرات آپوپتوزی فروتینین نسبت داد (۲۱). در پژوهشی مشخص شد فارنسی فرول که یکی از مواد مهم تشکیل دهنده صمغ آنغوزه می‌باشد، می‌تواند باعث مهار فاکتور رشد آندوتلیوم عروقی (VEGF) شود مهار این فاکتور رشد، موجب مهار سلول‌های سرطانی در تکثیر، مهاجرت، تهاجم، تشکیل عروق و تولید بافت همبند می‌شود. همچنین مشخص شد سزکوئی‌ترپن‌های موجود در صمغ آنغوره اثرات سایتوتوکسیک بر سلول‌ها دارند (۲۲،۲۳). در پژوهشی مشخص شد تجویز خوراکی صمغ آنغوزه به موش آزمایشگاهی موجب مهار رشد سرطان پستان ناشی از نیتروز اوره می‌شود (۲۲). در مطالعه طولانی مدت نشان داده شد تجویز صمغ آنغوزه از رشد سلول‌های سرطانی پستان ناشی از تجویز نیتروز اوره پیشگیری و زمان نهان تا ظهور سرطان را به تاخیر می‌اندازد (۲۴). مطالعات نشان داد ترکیبات موجود در صمغ آنغوزه موجب کاهش تولید نیتریک اکساید در سلول‌های آندوتلیال عروقی که نقش مهمی در پیشرفت رگ‌زایی و رشد تومور دارد، می‌شود. از جمله فعالیت‌های دیگری که این ترکیبات دارند شامل اتصال به آنتی‌بادی CD13 بیان شده توسط اجزای عروق خونی و مهار فعالیت آن، کاهش بیان ژنهای MMP-9 و VEGF و مهار گیرنده‌های VEGF و EGF و همینطور مقابله با مسیر پیام رسانی داخل سلولی تیروزین کینازها می‌باشد (۲۵). آنزیم متالوپروتئیناز تولیدی توسط سلول‌های سرطانی نقش مهمی در تحریک، تهاجم سلول‌های سرطانی و ایجاد التهاب دارد. در مطالعه‌ای مشخص شد تجویز صمغ آنغوزه موجب مهار فعالیت این آنزیم و در نتیجه مهار تهاجم سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۶،۲۵). بر اساس تحقیقات انجام شده اپی‌سزکویی‌ترپن‌ها و کومارین‌های موجود در صمغ آنغوزه از طریق تنظیم بیان فاکتور رشد سلول اندوتلیال مشتق از پلاکت و همینطور فاکتور رشد ترانسفورم کننده بتا (TGFβ) سبب کاهش رگ‌زایی می‌شوند. همچنین این ترکیبات از سنتز نیتریک اکساید و بیان TNFα ممانعت می‌کند. مطالعات با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی نیز نشان داد این ترکیبات از تکثیر سلول‌های اندوتلیال عروق خونی ممانعت کرده و سبب کاهش رشد و عدم متاستاز تومور می‌شوند (۲۷). در پژوهشی مشخص شد آنغوزه حاوی ترکیباتی نظیر آزافوئتیدین فروکولیسین است این ترکیبات از طریق مکانیسم‌های متعددی همچون برهمکنش با آنزیم‌های سیکلواکسیژناز ۲، لیپواکسیژناز ۵ و VEGFR مسیر پیام رسانی داخل سلولی HER-2 و همچنین پروتئین رونویسی هسته‌ای NF-KB، سبب مهار رگ‌زایی می‌گردد. این احتمال وجود دارد آزافوئتیدین سبب تقویت اثرات ضد سرطانی داروی تاموکسیفن از طریق فعالیت ضد رگ‌زایی می‌شود (۲۸،۲۹). در پژوهشی مشخص شد عصاره‌ی اتانولی صمغ آنغوزه در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در

شرایط آزمایشگاهی موجب مرگ سلول‌های طبیعی L929 و سلول‌های سرطانی HepG2 می‌شود (۱۶). با توجه به اینکه عصاره‌ی اتانولی صمغ آنغوزه در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب کاهش معنی‌داری در طول و تعداد انشعابات عروقی در اطراف محل تیمار شد، می‌توان نتایج بدست آمده را به اثرات سایتوتوکسیک عصاره‌ی اتانولی صمغ آنغوزه نسبت داد. تاکنون تحقیقات بسیاری روی اثرات ضد میکروبی، ضد انگلی و ضد قارچی صمغ گیاه آنغوزه انجام شده است و تقریبا تمامی آن‌ها اثرات ضد تکثیری صمغ گیاه آنغوزه را اثبات کرده‌اند (۳۰). با توجه به اینکه در بیشتر پژوهش‌های انجام شده بررسی اثرات سایتوتوکسیک، ضد تکثیری و ضد رگ‌زایی صمغ گیاه آنغوزه در شرایط in vitro بوده است، این پژوهش برای اولین بار اثرات ضد رگ‌زایی صمغ گیاه آنغوزه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را در شرایط in vivo بررسی کرد و اثرات مهاری آن بر طول و تعداد انشعابات عروقی به اثبات رسید؛ بنابراین امید است نتایج این پژوهش بتواند در زمینه ساخت داروهای جدید با منشاء گیاهی به منظور مهار رگ‌زایی در تومورهای سرطانی مورد استفاده قرار گیرد. مطابق با روش‌های این پژوهش عصاره اتانولی صمغ گیاه آنغوزه اثر مهاری بر رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه دارد و تشکیل رگ‌های خونی را به طور موضعی در محل تیمار کاهش می‌دهد؛ بنابراین به نظر می‌رسد از ترکیبات موجود در صمغ آنغوزه می‌توان جهت مهار رگ‌زایی در سلول‌ها و بافت‌های سرطانی استفاده کرد.

## تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان مقاله از تمام اساتید محترمی که نقطه نظرات آن‌ها نقش ارزشمندی در ارتقاء کیفیت مقاله داشته است، سپاسگزاری و قدردانی می‌نمایند.

## منابع

1. Maroof H, Salajegheh A, Anthony Smith R, King-Yin Lam A. Role of microRNA-34 family in cancer with particular reference to cancer angiogenesis. Experimental and Molecular Pathology. 2014;95(2):298-304.

2. Fox S, Gasparini G, Harris A. Angiogenesis pathological prognosis and their link to trial design and anticancer drugs. Lancet Oncol. 2001;2(5):278-89.

3. Saharinen P, Eklund L, Pulkki K, Bono P, Alitalo K. VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. rends in Molecular Medicine. 2011;17(7):347-62.

4. Otrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the important molecular mechanisms. Blood Cells Mol Dis. 2007;39(2):212-20.

5. Giuliano S, Pages G. Mechanisms of resistance to anti-angiogenesis therapies. Iochimie. 2013; 95(6):1110-19.

6. Eklund L, Bry M, Alitalo K. Mouse models for studying angiogenesis and lymphangiogenesis in cancer. Molecular Oncology. 2013;7(2):259-82.

7. Baharara J, Daneshjou D, Zafar-Balanezhad S, Shahrokh-Abadi KH. The effects of coadministration of honey bee venom and low frequency electromagnetic field on the inhibition of angiogenesis in chick chorioallantoic membrane. Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences. 2014;18(4):354-60.

8. Khosravi H, Mehrabi A. Economic study of Ferula harvesting in Tabass region. Iranian J Natural Res. 2006; 58(4):933-44.

9. Bandyopadhyay D, Basak B, Chatterjee A, Lai TK, Banerji A, Banerji J, et al. Saradaferin, a new sesquiterpenoid coumarin from Ferula assa foetida. Natural product Res. 2006;20(10):961-5.

10. Lopez A. Assa Foetidin and ferocolicin, two sesquiterpenoid cumarins from Ferula assa foetida. Tetraherdon letters. 1998;29(13):1557-60.

11. Iranshahy M, Iranshahi M. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of asafoetida (Ferula assa-foetida oleo-gum-resin)-a review. J Ethnopharmacol. 2011;134(1):1-10.

12. Ahmadvand H, Amiri H, Dehghani Elmi Z, Bagheri Sh. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Ferula-assa-foetida Leaves Essential Oil. Iranian Journal of Pharmacology and Therapautics. 2013;2(24):52-7.

13. Rezaiemanesh MR, Shirbazou SH. In-vitro giardicidal effect of aqueous and alcoholic extracts of Asafoetida on Giardia lamblia cyst. Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2012; 19(1):22-33.

14. Barati M, Sharifi I, Sharififar F. Antileishmanial activity of Artemisia aucheri, Ferula asafoetid and Gossypium hirsutum extracts on

Leishmania major promastigotes in vitro. Journal of Army University of Medical Sciences. 2010; 8(3):166-72.

15. Esmaeili Dehaj M, Khajeh-Bahabadi Z, Rezvani- Bafroei ME. Investigating the effect of oral consumption of tear assafoetida on hepatic, renal, cardiac, and blood biochemical parameters of rats. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2013;21(5):641-50.

16. Sadooghi SD, Nezhad Shahrokh Abadi Kh, Zafar Balanzhad S, Baharara J. Investigating the cytotoxic effect of ethanolic extract of Ferula assa-foetida resin on HepG2 cell line. Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences. 2013; 17(4):323-30.

17. Zare AR, Solouki M, Omidi M, Irvani N, Mahdi Nezad N, Rezazadeh Sh. callus induction and plant rege-neration in ferula assa foetida L. (asafetida), an endangered medicinal plant. Trakia Journal of Sciences. 2010;8(1):11-18.

18. Sadooghi SD, Zafar Balanzhad S, Baharara J, Nezhad Shahrokh Abadi Kh. Investigating the synergic effects of ethanolic extract of allium sativum L and electromagnetic field with low frequency on angiogenesis in chick chorioallantoic membrane (in vivo). J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2013;21(4):493-504.

19. Cha MR, Choi YH, Choi CW, Kim YS, Kim YK, Ryu SY, etal. Galbanic acid, a cytotoxic sesquiterpene from the gum resin of Ferula asafoetida, blocks protein farnesyltransferase. Planta Med. 2011;77(1):52-4.

20. Mahendra P, Bisht S. Ferula asafoetida: Traditional uses and pharmacological activity. Pharmacogn Rev. 2012;6(12):141-6.

21. Matin MM, Nakhaeizadeh H, Bahrami AR, Iranshahi M, Arghiani N, Rassouli FB. Ferutinin, an apoptosis inducing terpenoid from Ferula ovina. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(5):2123-8.

22. Lee JH, Choi S, Lee Y, Lee HJ, Kim KH, Ahn KS, et al. Herbal compound farnesiferol C exerts antiangiogenic and antitumor activity and targets multiple aspects of VEGFR1 (Flt1) or VEGFR2 (Flk1) signaling cascades. Mol. Cancer Ther. 2010; 9(2):389-99.

23. Kasaian J, Iranshahy M, Masullo M, Piacente S, Ebrahimi F, Iranshahi M: Sesquiterpene lactones from Ferula oopoda and their cytotoxic properties. J Asian Nat Prod Res. 2014;16(3):248- 53.

24. Mallikarjuna GU, Dhanalakshmi S, Raisuddin S, Rao AR. Chemo modulatory influence of Ferula asafetida on mammary epithelial differentiation, hepatic drug metabolizing enzymes, antioxidant profiles and N-methyl N-nitrosourea induced mammary carcinogenesis in rats. Breast Cancer Res Treat. 2003;81(1):1-10.

25. Shahverdi AR, Saadat F, Khorramizadeh MR, Iranshahi M, Khoshayand MR. Two matrix metalloproteinases inhibitors from Ferula persica var.persica. Phytomedicine. 2006;13(9-10):712-17.

26. Narayan S, Curcumin, a multi-functional chemopreventive agent, blocks growth of colon cancer cells by targeting betacatenin–mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways. J Mol Histol. 2004;35(3):301-7.

27. Dehpour AA, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Nabavi SM. Antioxidant activity of the methanol extract of Ferula assafoetida and its essential oil composition. Grasas y Aceites. 2009;60(4):405-2.

28. Banerji A, Mallick B, Chatterjee A, Budzikiewicz H and Breuer M. Assafoetidin and ferocolicin, two sesquiterpenoid coumarins from Ferula assafoetida Regel. Tetrahedron. 1988;29:1557-60.

29. Hanafi-Bojd MY, Iranshahi M, Mosaffa F, Tehrani SO, Kalalinia F, Behravan J. Farnesiferol A from Ferula persica and galbanic acid from Ferula szowitsiana inhibit P-glycoprotein-mediated rhodamine efflux in breast cancer cell lines. Planta Med. 2011;77(14):1590-3.

30. Lee CL, Chiang LC, Cheng LH, Liaw CC, Abd El-Razek MH, Chang FR, Wu YC. Influenza A H(1)N(1) Antiviral and Cytotoxic Agents from Ferula assa-foetida. J Nat Prod. 2009;72(9):1568-72.

biology of angiogenesis: Review of the most

***Original Article*** http://rjms.iums.ac.ir

# Investigating the effect of ethanolic extract of *Ferula assa-foetida*'s resin on angiogenesis in chick chorioalantoic membrane

*__Seyed Damoon Sadoughi__, Ph.D Student, Young Researchers and Elite Club, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran. (*Corresponding author). damoon.sadughi@Gmail.com
**Saide Zafar-Balanezhad**, Assistant Professor, Biology Department, Sciences Faculty, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
**Javad Baharara**, Professor, Biology Department, Sciences Faculty, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
**Khadijeh Nejhad Shahrokhabadi**, Assistant Professor, Biology Department, Sciences Faculty, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
**Raheleh Rahbarian**, Assistant Professor, Biology Department, Sciences Faculty, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran.
**Heshmat Sepehri-Moghadam**, Assistant Professor, Agriculture Department, Sciences Faculty, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran.

## Abstract

**Background**: Inhibition of angiogenesis is the main goal of cancer treatment and other diseases. Ferula assa-foetida is a medicinal plant with cytotoxic effects. The aim of this study was to investigate the anti-angiogenic effects of Ferula assa-foetida's resin.

**Methods**: 40 Hy-line fertilized eggs were divided into 4 groups: control, sham, experimental 1 (treated with 100 µg/ml of extract), experimental 2 (treated with 200 µg/ml of extract). On the eighth day of incubation it was created a window in the bottom of the eggs and gelatin sponge was placed on chorioallantoic membrane. 10 microliters of *Ferula assa-foetida*'s resin extract was injected to treated groups. 10 microliters of distilled water was injected to control group and 10 microliters of dimethyl sulfoxide was injected to sham-exposed group. All samples were photographed on the 12th day of incubation and the length and numbers of vessels were analyzed by ANOVA and Tukey's post hoc ($p<0.05$)

**Results**: The mean of number and length for vessels in the control group and mean of number and length in sham-exposed group was not significant. There was a significant decrease in mean number and length of vessels at concentration of 100 and 200 µg/ml of Ferula assa-foetida's resin extract compared with control group.

**Conclusion**: According to this research, ethanolic extract of Ferula assa-foetida's resin has an inhibitory effect on angiogenesis in chick chorioalantoic membrane. It seems that compounds of Ferula assa-foetida's resin can be used to inhibit angiogenesis in cancer tissues.

**Keywords**: Angiogenesis, Resin of Ferula assa-foetida, Chorioalantoic Membrane, Chick Embryo.