



## مطالعه اثر آویشن شیرازی بر آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوییک جنین جوجه

راضیه حسینی: موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران  
**مهدی نام آوری:** موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران (\* نویسنده مسئول) [Namavari@yahoo.com](mailto:Namavari@yahoo.com)  
**نادر قلعه گلاب:** موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران  
**علی شیرازی نژاد:** موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران  
**ثمین علیپور:** گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

رگ زایی،  
عصاره آویشن،  
تخم‌مرغ جنین دار،  
عروق کوریوآلانتوییک

**زمینه و هدف:** آنژیوژنز یا تولید عروق خونی جدید پدیده‌ای است که هم در شرایط فیزیولوژیک و هم پاتولوژیک (بیماری‌هایی از جمله سرطان) رخ می‌دهد و نقش کلیدی در رشد تومور، مهاجم و متاستاز سرطان ایفا می‌کند. بنابراین مهار آنژیوژنز می‌تواند یک راهکار درمانی مناسب در بیماری‌های سرطانی مطرح شود. با وجود مطالعات زیادی که در زمینه اثرات ضد سرطانی آویشن شیرازی در شرایط درون تنی و بیرون تنی انجام شده است اما تاکنون مطالعه‌ای جهت اثرات ضد رگ زایی آن به عنوان هدفی در مهار سرطان در مدل تخم‌مرغ جنین دار انجام نشده است.  
**روش کار:** در این مطالعه اثر عصاره آبی آویشن شیرازی با دوز  $250 \mu\text{g/ml}$  و عصاره هیدروالکلی آن که حاوی ماده مؤثره تایمول و کارواکربول می‌باشد با دوز  $0.01 \mu\text{l/ml}$  جهت بررسی پرده کوریوآلانتوییک تخم‌مرغ‌های جنین دار استفاده شده است.  
**یافته‌ها:** نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان می‌دهد عصاره آبی و هیدروالکلی آویشن شیرازی می‌تواند به طور معنی‌داری میزان رگ زایی در پرده کوریوآلانتوییک تخم‌مرغ را تحت تأثیر قرار داده و این روند را کاهش دهد ( $P=0.05$ ). به طوری که تزریق عصاره آویشن شیرازی با دوز  $250 \mu\text{g/ml}$  و عصاره هیدروالکلی با دوز  $0.01 \mu\text{l/ml}$  باعث کاهش طول ( $P=0.00$ ) و تعداد انشعابات عروقی بر پرده کوریوآلانتوییک تخم‌مرغ جنین دار شده است ( $P=0.00$ ).  
**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر عصاره آبی آویشن شیرازی و عصاره هیدروالکلی آن که حاوی تایمول و کارواکربول می‌باشد بر روی آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوییک جنین جوجه مؤثر بوده و باعث کاهش رشد عروق خونی شده است که احتمالاً به دلیل وجود درصد بالای تایمول و کارواکربول در این گیاه می‌باشد. این کاهش آنژیوژنز همراه با ناهنجاری‌های مورفولوژیکی نمی‌باشد و نیاز به مطالعات بیشتری در ارتباط با مکانیسم‌های احتمالی این ترکیبات می‌باشد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۱۷

تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۱۲/۰۸

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت‌کننده:** موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز

شیوه استناد به این مقاله:

Hosseini R, Namavari M, Ghalegolab N, Shirazinejad A, Alipour S. The Effects of zataria multiflora on Angiogenesis of Chorioallantoic Membrane of Chick Embryo. Razi J Med Sci. 2021;28(12):206-217.

\*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با **CC BY-NC-SA 3.0** صورت گرفته است.



Original Article

## The Effects of *Zataria multiflora* on Angiogenesis of Chorioallantoic Membrane of Chick Embryo

**Razieh Hosseini:** Shiraz Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran

**Mehdi Namavari:** Shiraz Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran (\*Corresponding author) Namavari@yahoo.com

**Nader Ghalegolab:** Shiraz Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran

**Ali Shirazinejad:** Shiraz Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran

**Samin Alipour:** Microbiology Department, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

### Abstract

**Background & Aims:** Angiogenesis is a multi-stage phenomenon that involves the initial germination, separation and regeneration of new blood vessels from previous ones and is essential for many physiological functions of the body. If angiogenesis is performed insufficiently or excessively, it can lead to pathological lesions and injuries. In the treatment of various tumors and cancers, inhibition of angiogenesis proposed as a more effective solution than killing cancer cells directly. Despite significant advances in chemotherapy, the survival rate is unsatisfactory due to drug resistance. Therefore, new strategies should be considered. The use of herbal remedies in the treatment of various diseases has been common since ancient times all around the world. Herbs contain various compounds including flavonoids, tannins, steroids, saponins, alkaloids, terpenoids, quinones, cardiac glycosides and coumarins that these compounds can have potential in the treatment of various diseases caused by pathological lesions of angiogenesis. Recently, many researchers have focused on the discovery of natural and synthetic drugs as anti-angiogenesis compounds so that they can be used as a treatment for various cancers or at least part of tumor treatment protocols. *Zataria multiflora* is a plant from the mint genus and native to southwest Asia. In various studies biological activities of thyme essential oil including its anti-cancer effects and antioxidant properties have been mentioned. But so far no study has been done on its anti-angiogenic effects as a target in cancer control in the embryonic chicken egg model. The aim of this study was to investigate the effects of aqueous extract of *Zataria multiflora* and its hydroalcoholic extract on angiogenesis and morphological changes on embryonic chicken eggs as a laboratory model.

**Methods:** After complete washing of the prepared plant, 5 g of thyme dried powder was boiled in 100 ml of sterile distilled water at 100 ° C for 5 minutes and then the liquid obtained is filtered and it was kept at 4 ° C until its use. The hydroalcoholic extract was also prepared from Barij Essential Oil Company, which is commercially available as gastrolite drops. After counting the vero cells, 7000 cells were considered for each 96-well plate. To determine the suitable dose, different dilutions of extracts were prepared as follows: 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml and 125 µg/ml and from hydroalcoholic extract, dilutions of 1/10, 1/100, 1/1000 and 1/10000 were used in DMEM culture medium. After the desired time, the supernatant was replaced with 50 µl of 12 mM MTT solution and incubated for 4 hours. After this time, 200 µl of dimethyl sulfoxide was used to dissolve the formazan crystals in each well. The plate's optical absorption was read at 570 nm with an ELISA reader.

**In ovo inoculation:** 30 Specific Pathogen Free (SPF) embryonated chicken eggs were prepared from Razi Vaccine and Serum Research Institute and divided into three groups of 10 (control, treatment group with thyme aqueous extract and treatment group with

### Keywords

Angiogenesis,  
*Zataria multiflora*  
extract,  
Embryonated chicken  
egg,  
Chorioallantoic blood  
vessels

Received: 09/10/2021

Published: 27/02/2022

hydroalcoholic extract). On the second day of incubation in completely sterile condition eggs in the control group received 10 microliters of sterile normal saline, in the first group 10 microliters of Zataria multiflora extract with a dose of 250 µg/ml and for the second group 10 microliters of hydroalcoholic extract with a dose of 0.001 µl/ml. On the twelfth day of incubation, images of blood vessels on the surface of the chorioallantoic membrane of all specimens were prepared using a photo-stereomicroscope and the number and length of vascular bifurcations were measured for all specimens using image J software. At the end of the study, the morphological status and weight of embryos in each group were assessed and recorded. For statistical analysis of the results with the help of SPSS software, version 22 and using one-way analysis of variance ANOVA and a significant level of  $P < 0.05$  was considered.

**Results:** After culturing vero cells with different dilutions, 250 µg/ml and 0.001 µl/ml were the best dose of aqueous extract and hydroalcoholic extract respectively. Because these doses did not show a significant difference compared to the control group ( $P > 0.05$ ). After 12 days of incubation the number and length of vessels from the chorioallantoic membrane were calculated. In a comparative study of the mean total length of vascular branches, a significant difference was observed between the control group and the treatment group with aqueous extract and also with the group treated with hydroalcoholic extract.  $P = 0.00$  and  $P = 0.00$ , respectively. Regarding the number of vascular branches, a significant difference was observed between the group treated with thyme aqueous extract and the control group  $P = 0.00$  and this difference between the group treated with hydroalcoholic extract and the control group was also seen  $P = 0.00$ . Although the use of the extract reduced the length of the embryos, but this difference was not statistically significant ( $P = 0.10$ ). In the case of hydroalcoholic extract, no significant difference was seen with the control group ( $P = 0.67$ ). Regarding the mean embryos weight, there was no significant difference between the control group and the groups treated with aqueous extract and hydroalcoholic extract,  $P = 0.19$  and  $P = 0.097$ , respectively. No morphological abnormalities were observed in the embryos of all three groups.

**Conclusion:** The results of this study showed that Zataria multiflora extract can significantly affect the rate of angiogenesis on the chorioallantoic membrane of embryos and reduce this process. In angiogenesis, blood vessel endothelial cells are stimulated by angiogenic factors such as vascular endothelial growth factors (VEGFs) and fibroblast growth factors (FGFs), which secrete plasminogen activators and proteases that eventually lead to the release of endothelial cells become new blood vessels by destroying the basement membrane of blood vessels. Due to the importance and relationship of these factors with vascular angiogenesis in tumors, one of the therapeutic goals of tumors is the use of compounds that can reduce the expression of these angiogenic factors. In the present study, the use of Zataria multiflora extract significantly reduced the length and number of blood vessel branches in the chorioallantoic membrane and this significant reduction has been observed when using its active ingredient, thymol and carvacrol, which is probably due to the role of thymol and carvacrol in reducing the expression of genes involved in angiogenesis stimulants. In the present study, despite the reduction of angiogenesis, morphological abnormalities were not observed in treated embryos, which was probably due to the presence of some soluble antioxidants in the extract, including carvacrol and various polyphenols. However, there is still a need for further research into the effects of Zataria multiflora in animal models with different doses, gene expression, intracellular signals and histological studies.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** Razi Vaccine and Serum, Shiraz Branch

#### Cite this article as:

Hosseini R, Namavari M, Ghalegolab N, Shirazinejad A, Alipour S. The Effects of zataria multiflora on Angiogenesis of Chorioallantoic Membrane of Chick Embryo. Razi J Med Sci. 2021;28(12):206-217.

**\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.**

## مقدمه

آنژیوژنز یا رگ زایی یک پدیده چندمرحله‌ای است که شامل جوانه زدن اولیه، جداسازی و بازسازی عروق خونی جدید از عروق قبلی می‌باشد و برای بسیاری از عملکردهای فیزیولوژیک بدن مانند رشد، محافظت و تکامل بافت‌های مختلف ضروری است (۱). در صورتی که آنژیوژنز به مقدار ناکافی و یا بیش از حد انجام شود منجر به ضایعات و آسیب‌های پاتولوژیک می‌گردد (۲). آنژیوژنز بیش از حد باعث رتینوپاتی دیابتی، سرطان، التهاب مفاصل، دژنراسیون ماکولار وابسته به سن می‌شود. در حالی که عدم خون رسانی کافی به علت آنژیوژنز ضعیف، منجر به مرگ بافت در بسیاری از بیماری‌ها مانند زخم ایسکمیک و بیماری‌های عروق کرونر قلب می‌شود. این پدیده همچنین برای بازسازی استخوان لازم و ضروری می‌باشد (۳). با وجود پیشرفت‌های علمی در سراسر جهان، سرطان هنوز به عنوان یک مشکل اولیه در ارتباط با مرگ و میر افراد مطرح است و بسیار سخت است که بتوان یک راه درست و صحیح برای درمان آن ارائه کرد. بر اساس گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی، سرطان سالیانه باعث مرگ ۱۵ میلیون نفر در سراسر جهان می‌شود (۴). آنژیوژنز یا تولید عروق خونی جدید، برای تکامل و تحریک پرورده‌های پاتولوژیک بسیاری از اختلالات شامل رشد تومورها و متاستاز از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. بنابراین مهار آنژیوژنز می‌تواند یک راهکار مفید و مؤثر در درمان تومورها محسوب شود (۵) به طوری که مهار آنژیوژنز به عنوان یک راهکار موثرتری نسبت به کشتن سلول‌های سرطانی به صورت مستقیم، در درمان تومورها و سرطان‌های مختلف مطرح شده است چون از این طریق تامین مواد مغذی و اکسیژن به سلول‌های سرطانی نیز مهار شده و رشد سلول‌های سرطانی نیز به طور غیر مستقیم متوقف خواهد شد (۵). علاوه بر جراحی و رادیوتراپی، شیمی درمانی نیز یکی از روش‌هایی است که به طور گسترده برای درمان سرطان استفاده می‌شود (۶). داروهایی که برای شیمی درمانی استفاده می‌شوند به سرعت سلول‌های سرطانی که در حال گسترش هستند را از بین می‌برند اما این داروها به سلول‌های نرمال و طبیعی بدن نیز آسیب می‌رسانند که منجر به ایجاد اختلالات

دیگری در بدن می‌شوند (۷). علیرغم پیشرفت‌های قابل توجه در زمینه شیمی درمانی اما درصد زنده‌مانی افراد به علت مقاومت‌های دارویی که رخ می‌دهد رضایت بخش نیست و مانع پیشرفت پیش‌آگهی بیماری می‌شود (۸). بنابراین راهکارهای جدید جهت جلوگیری از ایجاد مقاومت دارویی در درمان انواع سرطان‌ها باید مدنظر قرار گیرد.

استفاده از گیاهان دارویی از زمان‌های بسیار قدیم در طب سنتی و درمان بیماری‌های مختلف در سراسر جهان مرسوم بوده است (۹). گیاهان حاوی ترکیبات مختلفی از جمله فلاونوئیدها، تانن‌ها، استروئیدها، ساپونین‌ها، آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، کوئینون‌ها، گلیکوزیدهای قلبی و کومارین می‌باشند که این ترکیبات می‌توانند پتانسیل بالقوه‌ای در درمان بیماری‌های مختلف ناشی از ضایعات پاتولوژیک آنژیوژنز را دارا باشند (۱۰). همچنین استفاده از ترکیبات طبیعی به علت دارا بودن ساختارهای شیمیایی و اثرات فارماکولوژیکی متنوع می‌توانند به عنوان ترکیبات مؤثر و مفیدی در مقابله با مقاومت‌های دارویی که در درمان سرطان‌های مختلف رخ می‌دهد مورد توجه قرار گیرند (۱۱). اخیراً توجه زیادی از محققان به کشف داروهای طبیعی و سنتزی به عنوان ترکیبات ضد آنژیوژنز معطوف شده است تا بتوانند آن‌ها را به عنوان درمان سرطان‌های مختلف و یا حداقل بخشی از پروتکل‌های درمانی تومورها مطرح کنند (۱۲، ۱۳).

آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* یک گیاه از تیره نعنائیان و بومی جنوب غربی آسیا است که عمدتاً در کشورهای ایران، افغانستان و پاکستان یافت می‌شود (۱۴). در این گیاه ترکیبات مؤثری از جمله p-cymene به میزان ۱۰ درصد، تیمول ۱۶ درصد و کارواکرول ۵۲ درصد وجود دارد (۱۵). کارواکرول یک فنول مونوترپنیک قوی است که در اسانس روغنی برخی از اعضای خانواده نعنائیان یافت می‌شود (۱۶). آویشن شیرازی خواص متعددی دارد از جمله در بهبود علائم آسم می‌توان از آن استفاده کرد (۱۷) همچنین در مطالعات متعددی به اثرات ضد سرطانی (۱۸)، ضد التهاب (۱۹) و خواص آنتی‌اکسیدانی (۲۰) آن اشاره شده است. اسانس روغنی آویشن نیز یکی از انواع اسانس‌های مفید است که حاوی تیمول و کارواکرول

در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه جوشانده و سپس مایع به‌دست‌آمده به وسیله کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر و در در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده از آن نگهداری شد (۲۸). از این محلول جهت تهیه رقت‌های مختلف عصاره در طی انجام پروژه استفاده گردید. عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی نیز از شرکت باربیج اسانس که تحت عنوان قطره گاسترولیت به‌صورت تجاری موجود است تهیه گردید.

### بررسی سایتوتوکسیسیته عصاره آبی و

### هیدروالکلی آویشن شیرازی: جهت انجام آن از

تست MTT طبق روش رفیعی و نام آوری (۳۲) استفاده گردید. پس از شمارش سلول‌های vero تعداد ۷۰۰۰ سلول برای هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای و جهت بررسی هر رقت ۸ خانه تکراری در نظر گرفته شد. به این صورت که برای همه چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت سلولی DMEM همراه با سرم جنین گوساله، و آنتی‌بیوتیک‌ها با مقادیر ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین و ضد قارچ آمفوتریسین ۲۵ میکروگرم استفاده شد. سپس رقت‌های مختلف از عصاره‌ها به‌صورت زیر تهیه شد: از عصاره آبی آویشن شیرازی رقت‌های مختلف  $1000 \mu\text{g/ml}$ ،  $500 \mu\text{g/ml}$ ،  $250 \mu\text{g/ml}$  و از عصاره هیدروالکلی آویشن (گاسترولیت) برای تعیین دوز مناسب نیز رقت‌های  $10/1$ ،  $100/1$ ،  $1000/1$  و  $10000/1$  در محیط کشت DMEM جهت تزریق به سلول‌های vero استفاده گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط چاهک‌ها با محیط جدید حاوی رقت‌های مختلف عصاره آبی و عصاره هیدروالکلی آویشن تعویض گردید و برای مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور  $\text{CO}_2$  دار و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت زمان مورد نظر محیط رویی با ۵۰ میکرولیتر محلول MTT ۱۲ میلی مولار جایگزین و برای مدت ۴ ساعت انکوبه گردید و بعد از گذشت این زمان جهت حل کردن کریستال‌های فورمازان از دی‌متیل سولفوکساید با مقدار ۲۰۰ میکرولیتر برای هر خانه استفاده گردید و برای مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. سپس با استفاده

می‌باشد و در مطالعات مختلف به فعالیت‌های بیولوژیکی آن‌ها از جمله اثرات ضد سرطانی آن در شرایط *in vitro* و *in vivo* (۲۱-۲۴) و خواص آنتی‌اکسیدانی (۲۵) آن‌ها اشاره شده است. با وجود مطالعات زیادی که در زمینه اثرات ضد سرطانی آویشن شیرازی در شرایط *in vitro* و *in vivo* انجام شده است (۲۶-۲۹) اما تاکنون مطالعه‌ای جهت اثرات ضد رگ زائی آن به عنوان هدفی در مهار سرطان در مدل تخم‌مرغ جنین دار انجام نشده است. با توجه به اینکه داروهای گیاهی که در طب سنتی استفاده می‌شوند حاوی ترکیبات مختلفی هستند در این مطالعه ضمن بررسی اثر عصاره آبی آویشن شیرازی از اسانس هیدروالکلی آن که حاوی ماده مؤثره تایمول و کارواکرول است بر مهار رگ زایی در پرده کوریوآنتوتیک تخم‌مرغ‌های جنین دار نیز استفاده شده است. یکی از مدل‌های آزمایشگاهی جهت بررسی آنژیوژنز، استفاده از تخم‌مرغ جنین دار و بررسی پرده کوریوآنتوتیک آن می‌باشد که در ارتباط با وضعیت عروق زایی، مهاجم سلول‌های توموری و متاستاز از این روش می‌توان استفاده کرد (۳۰). از طرفی استفاده از تخم‌مرغ جنین دار یک روش ساده و مقرون‌به‌صرفه می‌باشد و چون پرده کوریوآنتوتیک یک سیستم بسته است، نیمه عمر ترکیبات مختلفی که استفاده می‌شوند نسبت به مدل‌های حیوانی بیشتر خواهد بود. همچنین این امکان فراهم خواهد بود تا بتوان از ترکیباتی که به مقدار خیلی کم در دسترس هستند جهت ارزیابی اثرات ضد سرطانی آن‌ها در مطالعات تجربی از این روش استفاده کرد (۳۱). با توجه به اثرات ضد سرطانی آویشن شیرازی و ماده مؤثره آن (کارواکرول و تایمول) و با نظر به اینکه تاکنون اثرات آن بر روی آنژیوژنز پرده کوریوآنتوتیک تخم‌مرغ جنین دار بررسی نشده است هدف از این مطالعه بررسی اثرات عصاره آبی گیاه آویشن شیرازی و عصاره هیدروالکلی آن بر روی رگ زایی و تغییرات مورفولوژیکی بر روی تخم‌مرغ جنین دار به عنوان یک مدل آزمایشگاهی می‌باشد.

### روش کار

**آماده سازی عصاره آبی آویشن شیرازی:** پس از شست شوی کامل گیاه تهیه شده، آویشن شیرازی در سایه خشک و پودر آن تهیه شد. ۵ گرم از پودر آویشن

از دستگاه خوانش الایزا جذب نوری پلیت، در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

**توزیع به تخم مرغ جنین دار:** تعداد ۳۰ عدد تخم مرغ جنین دار SPF از موسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه و در دستگاه جوجه کشی تحقیقاتی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۶۰-۷۰٪ قرار گرفتند (۱۲). در روز دوم انکوباسیون در شرایط کاملاً استریل بخشی از پوسته تخم مرغها برداشته و توسط لامل و پارافین استریل پنجره‌ای با ابعاد ۱\*۱ سانتی متر ایجاد گردید و سپس تخم مرغها به انکوباتور منتقل شدند. در روز هشتم انکوباسیون پنجره‌ها در شرایط استریل برداشته شد و روی پرده کوریوآلانتوئیک جوجه‌ها یک اسفنج ژلاتینی قرار داده شد. تخم مرغها به سه گروه ۱۰ تایی (کنترل، گروه درمانی با عصاره آبی آویشن و گروه درمانی با عصاره هیدروآلکلی) تقسیم شدند. به تخم مرغهای گروه کنترل ۱۰ میکرولیتر نرمال سابلین استریل، گروه درمانی اول ۱۰ میکرولیتر عصاره آویشن شیرازی با دوز ۲۵۰ μg/ml و برای گروه درمانی دوم ۱۰ میکرولیتر عصاره هیدروآلکلی با دوز ۱ μl/ml ۰/۰۰۱ تزریق شد. سپس محل پنجره‌ها مجدداً پوشانیده شده و تخم مرغها به انکوباتور منتقل شدند.

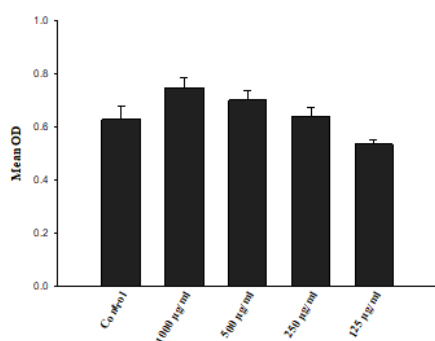
در روز دوازدهم انکوباسیون تصاویر از عروق خونی سطح پرده کوریوآلانتوئیک تمام نمونه‌ها با استفاده از فوتو استروئومیکروسکوپ تحقیقاتی تهیه و با کمک نرم افزار J image تعداد و طول انشعابات عروقی در سطح مقطع یکسان برای تمام نمونه‌ها اندازه گیری شد. در پایان کار طول سری-دمی، وضعیت مورفولوژیکی و وزن جنین‌های هر گروه نیز بررسی و ثبت گردید. لازم به ذکر است که کلیه مراحل انجام این پژوهش طبق دستورالعمل اخلاقی موسسه واکسن و سرم سازی رازی انجام شده است.

**آنالیز آماری:** تمامی داده‌ها از نظر آماری با کمک نرم افزار SPSS، نسخه ۲۲ و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و تست Tukey بررسی گردید. نتایج به صورت میانگین و خطای معیار ارائه گردیده است. سطح معنی داری نیز  $P < 0/05$  در نظر گرفته شده است.

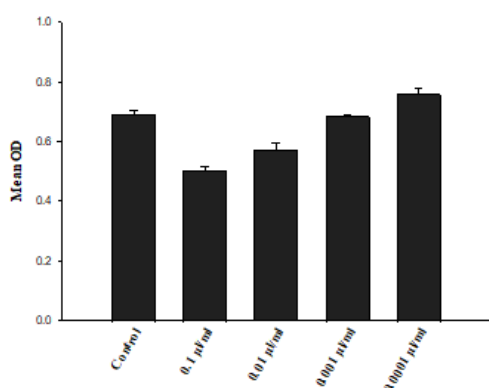
## یافته‌ها

**بررسی سائیتوتوکسیسیته عصاره آبی و هیدروآلکلی آویشن شیرازی:** پس از کشت سلول‌های vero با رقت‌های مختلف عصاره‌ها بهترین دوز عصاره آبی آویشن شیرازی ۲۵۰ μg/ml (نمودار ۱) و برای عصاره هیدروآلکلی رقت ۰/۰۰۱ μl/ml (نمودار ۲) در نظر گرفته شد. چون این دوزها نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری نشان ندادند ( $P=0/05$ ). به ترتیب برای عصاره آبی آویشن شیرازی دوز ۲۵۰ μg/ml و برای عصاره هیدروآلکلی رقت ۰/۰۰۱ μl/ml  $P=0/001, 0/46$ .

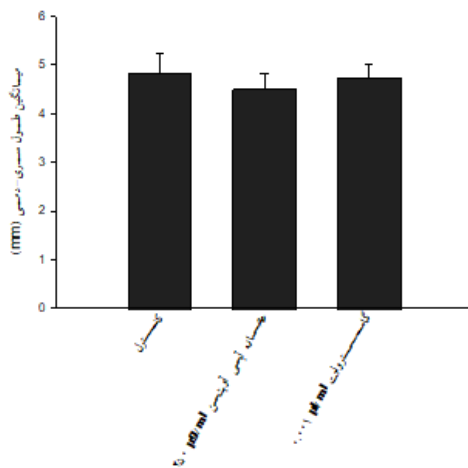
**بررسی عروق پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه:** پس از گذشت ۱۲ روز از انکوباسیون، از عروق کوریوآلانتوئیک عکس‌های مورد نظر تهیه شد (تصویر ۱). سپس تعداد و طول عروق محاسبه گردید. در بررسی مقایسه‌ای میانگین مجموع طول انشعابات



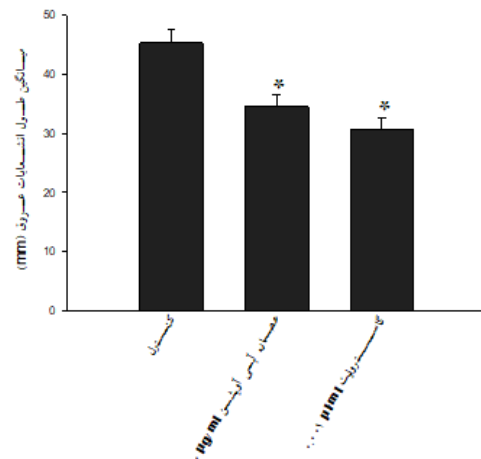
**نمودار ۱-** بررسی تاثیر دوزهای مختلف عصاره آبی آویشن شیرازی بر روی سلول‌های vero



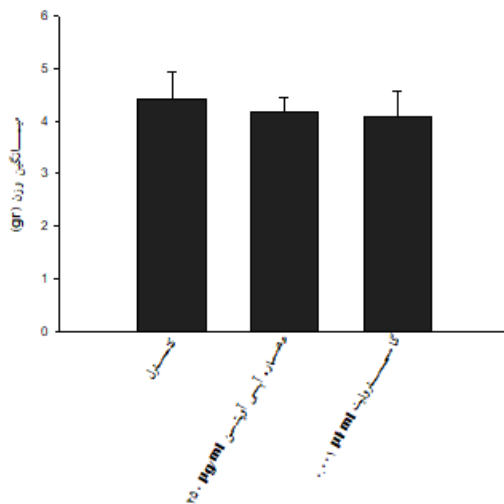
**نمودار ۲-** بررسی تاثیر دوزهای مختلف عصاره هیدروآلکلی آویشن شیرازی (گاسترولیت) بر روی سلول‌های vero



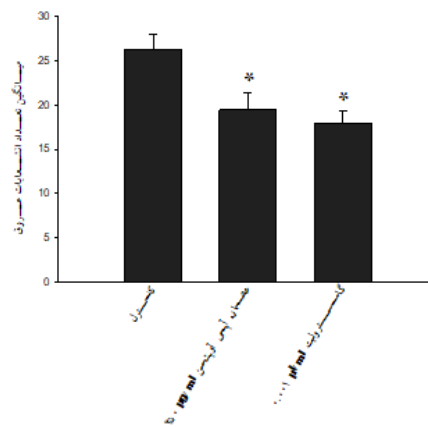
نمودار ۵- میانگین طول سری-دمی در گروه‌های مختلف



نمودار ۳- میانگین طول انشعابات عروقی در گروه‌های مختلف  
نسبت به گروه کنترل  $P < 0.05^*$



نمودار ۶- میانگین وزن جنین‌ها در گروه‌های مختلف



نمودار ۴- میانگین تعداد انشعابات عروقی در گروه‌های مختلف  
نسبت به گروه کنترل  $P < 0.05^*$

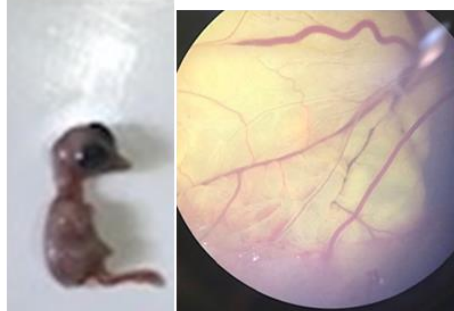
نظر آماری معنادار نیست ( $P=0/1$ ). در مورد گاسترولیت نیز اختلاف معناداری با گروه کنترل دیده نشده است ( $P=0/67$ ) (نمودار ۵). در ارتباط با میانگین وزن جنین‌ها، اختلاف معناداری بین گروه کنترل و گروه‌های درمان شده با عصاره آبی و گاسترولیت دیده نمی‌شود به ترتیب  $P=0/19$  و  $P=0/097$  (نمودار ۶). در بررسی ظاهری جنین‌های هر سه گروه هیچ‌گونه ناهنجاری مورفولوژیکی در جنین‌ها مشاهده نشده است (تصویر ۱).

### بحث

در این مقاله، اثر عصاره آبی و هیدروالکلی گیاه آویشن به‌منظور بررسی اثرات ضد رگ زایی آن با

عروقی بین گروه کنترل و گروه درمانی با عصاره آبی آویشن و همچنین با گروه درمان شده با عصاره هیدروالکلی اختلاف معناداری دیده می‌شود؛ به ترتیب  $P=0/00$  و  $P=0/00$  (نمودار ۳). در ارتباط با تعداد انشعابات عروقی نیز بین گروه درمانی با عصاره آبی آویشن و گروه کنترل اختلاف معناداری دیده می‌شود ( $P=0/00$ ) و این اختلاف بین گروه درمان شده با عصاره هیدروالکلی و گروه کنترل نیز دیده می‌شود ( $P=0/00$ ) (نمودار ۴). در مقایسه میانگین طول سری - دمی بین گروه کنترل و گروه‌های درمانی اگرچه استفاده از عصاره باعث کاهش طول جنین‌ها شده است اما این اختلاف از

کنترل

عصاره آبی آویشن  
250 µg/mlگاسترولیت  
0.001 µl/ml

تصویر ۱- تعداد و طول انشعابات عروقی در پرده کوریوآلانتوئیک و وضعیت مورفولوژیکی جنین های ۱۲ روزه در گروه های مختلف

مانند پیاز با نام علمی *Allium ascalonicum* (۳۸)،  
مریم گلی *salvia officinalis* (۳۹)، انجیر *Ficus Carica* (۴۰)،  
کانابینوئیدها (۴۱)، و حتی قارچها (۴۲)، یا  
آنتی بادی های مونوکلونال مانند *Bevacizumab* (۴۳).  
اگرچه تمامی این ترکیبات قادر به مهار آنژیوژنز هستند  
اما به نظر می رسد ترکیباتی که از گیاهان و داروهای  
گیاهی تهیه می شوند از نظر اقتصادی مقرون به صرفه تر  
هستند از طرفی به مقدار زیاد در دسترس هستند  
همچنین در صورت استفاده از آنها به صورت خوراکی،  
این ترکیبات به پروتئینازها مقاوم هستند. در مطالعات  
مختلف به اثرات ضد سرطانی آویشن شیرازی در شرایط  
*in vitro* اشاره شده است از جمله شریفی فر و همکاران  
(۲۰۱۷) به اثرات سایتوتوکسیسیته آویشن شیرازی با  
غلظت ۴۴,۲۲ µg/ml بر روی رده سلولی کارسینوما

استفاده از تخم مرغ جنین دار مورد آزمایش قرار گرفت.  
مدل بررسی پرده کوریوآلانتوئیک تخم مرغ جنین دار به  
عنوان یکی از مدل های حیوانی مهم برای ارزیابی  
ویژگی های ضد سرطانی مواد مختلف به شمار می آید  
(۳۳). نتایج این بررسی نشان داد عصاره آویشن شیرازی  
می تواند به طور معنی داری میزان رگ زایی بر پرده  
کوریوآلانتوئیک تخم مرغ را تحت تأثیر قرار داده و این  
روند را کاهش دهد. در سال های اخیر میزان سرطان در  
جهان روند صعودی داشته است و بنابراین تلاش در  
جهت جستجوی داروهای ضد سرطانی نیز افزایش پیدا  
کرده است. اخیراً توجه محققان به استفاده از ترکیبات  
ضد آنژیوژنز با منابع مختلف معطوف شده است (۳۴)،  
(۳۵) از جمله پروتئین: مهارکننده تریپسین کونیتز (۳۶)،  
فراکسیون های غضروف کوسه (۳۷)، ترکیبات گیاهی



پایداری نانوذرات نقره و به عنوان یک حامل در بروز اثرات ضد سرطانی نقش داشته‌اند (۲۸). تایمول و کارواکرول از جمله فنولیک مونوترپنوئیدهای شناخته شده هستند که در بسیاری از گیاهان به عنوان اجزاء فعال حضور دارند. تایمول نیز دارای اثرات ضد التهابی، ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی می‌باشد که اثرات ضد سرطانی آن از طریق مهار رشد سلولی می‌باشد و در مطالعه‌ای به اثرات تایمول بر روی رده سرطانی AGS از طریق مسیر داخل میتوکندری و سیگنال های caspase اشاره شده است (۴۷) در مطالعه ی Jamatsing D. در سال ۲۰۱۷ به اثرات ضد سرطانی این دو ترکیب بر روی دو رده سرطانی کلون و پانکراس اشاره شده است (۴۸). همچنین در مطالعه ی دیگری به اثرات ضد کارسینوژنیک تایمول و کارواکرول به صورت وابسته به دوز بر روی سلول های سرطانی تخمدان (SKOV-3) به وسیله تست MTT تاکید شده است (۴۹). در مطالعه حاضر استفاده از عصاره آویشن شیرازی باعث کاهش معنادار طول و تعداد انشعابات عروق خونی در پرده کوریوآنتوتیک شده است و این کاهش معنادار در زمان استفاده از ماده مؤثره آن که تایمول و کارواکرول می‌باشد نیز مشاهده شده است که احتمالاً ناشی از نقش تایمول و کارواکرول در کاهش بیان ژن های دخیل در فاکتورهای محرک آنژیوژنز می‌باشد. در مطالعات دیگری نیز به اثرات ضد سرطانی کارواکرول بر روی رده های سرطانی مختلف مانند MDA-MB 231 و cervical cancer cells نیز اشاره شده است (۵۰، ۵۱) که تأکیدی بر نتایج حاصل از مطالعه انجام شده می‌باشد. در تحقیق حاضر با وجود کاهش آنژیوژنز در اثر استفاده از عصاره آبی و عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی که همراه با کاهش خون رسانی و متابولیت های مورد نیاز بدن و تغذیه موجود زنده می‌باشد اما تأثیری بر جنین جوجه نداشته است و ناهنجاری های مورفولوژیکی در جنین های تیمار شده دیده نشده است. از طرفی استفاده از عصاره های فوق تأثیر منفی بر طول سری-دمی و وزن جنین ها نداشته است که احتمالاً مشاهدات فوق به دلیل حضور برخی آنتی اکسیدان های محلول در عصاره از جمله کارواکرول و پلی فنول های مختلف بوده است (۲۰) که در مطالعات مختلف به اثرات آن ها اشاره شده است از جمله در مطالعه محبتی و

انسانی SW-48 و با غلظت  $42/33 \mu\text{g/ml}$  بر روی رده سلولی HT-29 اشاره کرده‌اند (۲۹). در مطالعه حاضر نیز جهت دستیابی به دوز مناسب و غیر سمی ابتدا با روش MTT دوز مناسب جهت تزریق به تخم مرغ جنین دار انتخاب گردید که طبق نمودارهای شماره ۱ و ۲ دوزهای  $250 \mu\text{l/ml}$  و  $0/001 \mu\text{l/ml}$  به ترتیب برای عصاره آبی و عصاره هیدروالکلی آویشن در نظر گرفته شد و پس از تزریق به تخم مرغ های جنین دار عروق موجود بر پرده کوریوآنتوتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. در آنژیوژنز، سلول های اندوتلیال عروق خونی به وسیله ی فاکتورهای آنژیوژنیک مانند فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی (VEGFs) و فاکتورهای رشد فیبروبلاست (FGFs) تحریک می‌شوند که این فاکتورها باعث ترشح فعال کننده های پلاسمینوژن و پروتازها می‌شوند که در نهایت منجر به آزاد شدن سلول های اندوتلیال از طریق تخریب غشاء پایه عروق خونی، مهاجرت، تکثیر و تمایز به یک رگ خونی جدید می‌شوند (۴۴، ۴۵). به نظر می‌رسد سلول های اندوتلیال عروق موجود در تومورها، یک یا چند نوع از این فاکتورهای آنژیوژن مانند VEGF و FGF را به مقدار زیادی تولید می‌کنند (۴۶). با توجه به اهمیت و ارتباط این فاکتورها با آنژیوژنز عروق در تومورها یکی از اهداف درمانی تومورها استفاده از ترکیباتی است که بتوانند باعث کاهش بیان این فاکتورهای آنژیوژنیک شوند (۱۲). از جمله مطالعه‌ای که بر روی عصاره برگ انجیر بر روی عروق کوریوآنتوتیک جنین جوجه و بیان ژن VEGF انجام شده است که باعث مهار تشکیل عروق خونی جدید از طریق کاهش VEGF شده است (۳۱). در مطالعه انجام شده نیز استفاده از عصاره آویشن شیرازی باعث کاهش آنژیوژنز در عروق کوریوآنتوتیک شده است که ممکن است به دلیل کاهش بیان فاکتور محرک VEGF باشد. در مطالعه ی بهارآرا و همکاران (۲۰۱۸) به اثرات القاء کننده آپوپتوز (مرگ سلولی) نانوذرات نقره به همراه عصاره آویشن شیرازی بر روی سلول های سرطانی HeLa اشاره شده است و این ترکیب باعث مهار متاستاز از طریق کاهش بیان ژن متالوپروتئیناز و (VEGF-A) شده است. با توجه به اینکه عصاره آویشن شیرازی حاوی ترکیبات مختلفی از جمله فلاونوئید، ترپنوئید، و اجزاء پروتئینی می‌باشد این ترکیبات احتمالاً باعث

508.

2. Khandia R, Munjal A, Bangrey R, Mehra R, Dhama K, Sharma N. Evaluation of silver nanoparticle mediated reduction of neovascularisation (angiogenesis) in chicken model. *Adv Anim Vet Sci*. 2015;3(7):372-6.

3. Saran U, Piperni SG, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:109.

4. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RG, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA: Cancer J Clin*. 2017;67(3):177-93.

5. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*. 2001;61(3):253-70.

6. MacDonald V. Chemotherapy: managing side effects and safe handling. *Can Vet J*. 2009;50(6):665.

7. Carelle N, Piotto E, Bellanger A, Germanaud J, Thuillier A, Khayat D. Changing patient perceptions of the side effects of cancer chemotherapy. *Cancer*. 2002;95(1):155-63.

8. Shaffer BC, Gillet JP, Patel C, Baer MR, Bates SE, Gottesman MM. Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resist Updat*. 2012;15(1-2):62-9.

9. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med*. 2006;27(1):1-93.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(6):3670-95.

14. Sajed H, Sahebkar A, Iranshahi M. *Zataria multiflora* Boiss. (Shirazi thyme)—an ancient condiment with modern pharmaceutical uses. *J Ethnopharmacol*. 2013;145(3):686-98.

15. Shafiee A, Javidnia K. Composition of essential oil of *Zataria multiflora*. *Planta Med*. 1997;63(04):371-2.

16. Aristatile B, Al-Numair KS, Veeramani C, Pugalendi KV. Effect of carvacrol on hepatic marker enzymes and antioxidant status in d-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009;23(6):757-65.

همکاران (۲۰۱۸) که به اثرات آنتی اکسیدانی عصاره آویشن شیرازی و کارواکرول در رت هایی که به صورت تجربی با آدریامایسین دچار هیپاتوتوکسیسیته شده بودند اشاره کرده است (۵۲) و در مطالعه ما نیز استفاده از عصاره آبی و هیدروالکلی آویشن که حاوی کارواکرول نیز می باشد بر روی رشد جنین و وزن گیری آن ها تأثیر منفی نداشته است. با این وجود در این زمینه همچنان نیاز به تحقیقات بیشتری در زمینه بررسی اثرات آویشن شیرازی در مدل های حیوانی با دوزهای بالاتر، دوره مصرف طولانی تر، میزان بیان ژن ها، تغییرات ملکولی داخل سلول ها و بررسی های بافت شناسی می باشد.

### نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر عصاره آبی آویشن شیرازی و عصاره هیدروالکلی آن که حاوی تایمول و کارواکرول می باشد بر روی آنژیوزنز پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه مؤثر بوده و باعث کاهش رشد عروق خونی شده است که احتمالاً به دلیل وجود درصد بالای تایمول و کارواکرول در این گیاه می باشد و می تواند به عنوان یک ترکیب در تعدیل رگ زایی تومورهای مختلف مورد استفاده قرار گیرد. اگرچه این کاهش آنژیوزنز در پرده کوریوآلانتوئیک همراه با ناهنجاری های مورفولوژیکی نمی باشد و کاهش وزن و طول سری-دمی در جنین ها مشاهده نشده است اما نیاز به مطالعات بیشتری در ارتباط با مکانیسم های احتمالی این ترکیبات در مدل های مختلف حیوانی می باشد.

### تقدیر و تشکر

هزینه های انجام این مطالعه توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز در قالب پروژه تحقیقاتی به شماره ۹۶۱۲۵۶-۱۳۳-۱۸-۸۴-۲ تأمین گردیده است و در آزمایشگاه تحقیقاتی موسسه مراحل اجرایی آن انجام گرفته است.

### References

1. Logsdon EA, Finley SD, Popel AS, Gabhann FM. A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *J Cell Mol Med*. 2014;18(8):1491-

17. Boskabady MH, Tabanfar H, Gholamnezhad Z, Sadeghnia HR. Inhibitory effect of *Zataria multiflora* Boiss and carvacrol on histamine (H1) receptors of guinea-pig tracheal chains. *Fundam Clin Pharmacol*. 2012;26(5):609-20.
18. Shokrzadeh M, Azadbakht M, Ahangar N, Naderi H, Saravi SS. Comparison of the cytotoxic effects of *Juniperus sabina* and *Zataria multiflora* extracts with *Taxus baccata* extract and Cisplatin on normal and cancer cell lines. *Pharmacogn Mag*. 2010;6(22):102.
19. Silva FV, Guimaraes AG, Silva ER, Sousa-Neto BP, Machado FD, Quintans-Júnior LJ, et al. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. *J Med Food*. 2012;15(11):984-91.
20. Khazdair MR, Ghorani V, Alavinezhad A, Boskabady MH. Pharmacological effects of *Zataria multiflora* Boiss L. and its constituents focus on their anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects. *Fundam Clin Pharmacol*. 2018;32(1):26-50.
21. Salehi F, Behboudi H, Kavooosi G, Ardestani SK. Monitoring ZEO apoptotic potential in 2D and 3D cell cultures and associated spectroscopic evidence on mode of interaction with DNA. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-14.
22. Azadi M, Jamali T, Kianmehr Z, Kavooosi G, Ardestani SK. In-vitro (2D and 3D cultures) and in-vivo cytotoxic properties of *Zataria multiflora* essential oil (ZEO) emulsion in breast and cervical cancer cells along with the investigation of immunomodulatory potential. *J Ethnopharmacol*. 2020;112865.
23. Jamali T, Kavooosi G, Safavi M, Ardestani SK. In-vitro evaluation of apoptotic effect of OEO and thymol in 2D and 3D cell cultures and the study of their interaction mode with DNA. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-19.
24. Khan I, Bahuguna A, Kumar P, Bajpai VK, Kang SC. In vitro and in vivo antitumor potential of carvacrol nanoemulsion against human lung adenocarcinoma A549 cells via mitochondrial mediated apoptosis. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-15.
25. Kavooosi G, Rabiei F. *Zataria multiflora*: chemical and biological diversity in the essential oil. *J Ess Oil Res*. 2015;27(5):428-36.
26. Amiri FT, Karimi S, Khalatbary AR, Mohammadi HR, Hosseinimehr SJ. Hydroalcoholic extract of *Zataria multiflora* mitigates cisplatin-induced oxidative stress, apoptosis and hepatotoxicity in mice. *Marmara Pharm J*. 2017;21.
27. Ahani N, Sangtarash MH, ESKANDANI MA, Houshmand M. *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil Induce Apoptosis in Two Human Colon Cancer Cell Lines (HCT116 & SW48). *Iran J Public Health*. 2020;49(4):753-762.
28. Baharara J, Ramezani T, Hosseini N, Mousavi M. Silver nanoparticles synthesized coating with *Zataria multiflora* leaves extract induced apoptosis in HeLa cells through p53 activation. *Iran J Pharm Res*. 2018;17(2):62-67.
29. Sharififar F, Miri-Moghaddam M, Nematollahi-Mahani S, Forootanfar H, Asgharian Rezee M. Cytotoxicity effect of *Zataria multiflora* Boiss. on two human colon carcinoma cell lines. *Res J pharmacogn*. 2017;4(4):65-70.
30. Lokman NA, Elder AS, Ricciardelli C, Oehler MK. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *Int J Mol Sci*. 2012;13(8):9959-70.
31. 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.
32. Rafei N, Namavari M. Barrasi asare zedeangali osarehaye abi zanjabil va shirinbayan bar rooye takyakhte neospora caninum. *Vet Res Biol Prod*. 2019;3(124):47-54. (Persian)
33. Ghandehari S, HomayouniTabrizi M, Ardalan P. Evaluation of Anti-angiogenic Activity of Silver Nanoparticle Synthesis by *Rubia tinctorum* L (Ru-AgNPs) Using Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay. *J Arak Uni Med Sci*. 2018;21(1):82-90.
34. Norooznezhad AH, Norooznezhad F, Ahmadi K. Next target of tranilast: inhibition of corneal neovascularization. *Med Hypotheses*. 2014;82(6):700-2.
35. Sauder DN, DeKoven J, Champagne P, Croteau D, Dupontb É. Neovastat (AE-941), an inhibitor of angiogenesis: Randomized phase I/II clinical trial results in patients with plaque psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2002;47(4):535-41.
36. Shakiba Y, Mansouri K, Mostafaie A. Anti-angiogenic effect of soybean kunitz trypsin inhibitor on human umbilical vein endothelial cells. *Fitoterapia*. 2007;78(7-8):587-9.
37. Hassan ZM, Feyzi R, Sheikhan A, Bargahi A, Mostafaie A, Mansouri K, et al. Low molecular weight fraction of shark cartilage can modulate immune responses and abolish angiogenesis. *Int Immunopharmacol*. 2005;5(6):961-70.
38. Motlagh HRM, Mansouri K, Shakiba Y, Keshavarz M, Khodarahmi R, Siami A, et al. Anti-angiogenic effect of aqueous extract of shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs in rat aorta ring model. *Yakhteh Med J*. 2009;11(2):190-5.
39. Keshavarz M, Bidmeshkipour A, Mostafaei A, Mansouri K, Mohammadi MH. Anti tumor activity of *Salvia officinalis* is due to its anti-angiogenic, anti-migratory and anti-proliferative effects. *Cell J*. 2011;12(4): 477-482

40. Mostafaei A, Mansouri K, Norouznezhad A, Mohammadi MH. Anti-angiogenic activity of Ficus carica latex extract on human umbilical vein endothelial cells. *Cell J*. 2011;12(4):525-528
41. Keshavarz M, Norouznezhad A, Mansouri K, Mostafaei A. Cannabinoid (JWH-133) therapy could be effective for treatment of corneal neovascularization. *Iran J Med Hypoteses Idea*. 2010;4(3).
42. Mansouri K, Mahamed-Khosroushahi L, Rasouli H. Anti-angiogenic/inflammatory behavior of mushroom ganoderma lucidum extract could be effective for treatment of corneal neovascularization: A hypothesis. *J Rep Pharm Sci*. 2014;3:14-8.
43. Nguyen A, Hoang V, Laquer V, Kelly KM. Angiogenesis in cutaneous disease: part I. *J Am Acad Dermatol*. 2009;61(6):921-42.
44. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(4):201-7.
45. Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler HP. Molecular mediators of angiogenesis. *J Burn Care Res*. 2010;31(1):158-75.
46. Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, Pintucci G, Mignatti P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *J Cell Physiol*. 2009;219(2):449-58.
47. Kang SH, Kim YS, Kim EK, Hwang JW, Jeong JH, Dong X, et al. Anticancer effect of thymol on AGS human gastric carcinoma cells. *J Microbiol Biotechnol*. 2016;26(1):28-37.
48. Rajput JD, Bagul SD, Bendre RS. Design, synthesis, biological screenings and docking simulations of novel carvacrol and thymol derivatives containing acetohydrazone linkage. *Res Chem Int*. 2017;43(8):4893-906.
49. Elbe H, Yigitturk G, Cavusoglu T, Baygar T, Ozgul Onal M, Ozturk F. Comparison of ultrastructural changes and the anticarcinogenic effects of thymol and carvacrol on ovarian cancer cells: which is more effective? *Ultrastruct Pathol*. 2020;44(2):193-202.
50. Mehdi SJ, Ahmad A, Irshad M, Manzoor N, Rizvi MMA. Cytotoxic effect of carvacrol on human cervical cancer cells. *Biol Med*. 2011;3(2):307-312.
51. Arunasree K. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*. 2010;17(8-9):581-8.
52. Mohebbati R, Paseban M, Soukhtanloo M, Jalili-Nik M, Shafei MN, Yazdi AJ, et al. Effects of standardized Zataria multiflora extract and its major ingredient, carvacrol, on adriamycin-induced hepatotoxicity in rat. *Biomed J*. 2018;41(6):340-7.