[DOI: 10.18502/ssu.v27i6.1603]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 16:20 IRST on Sunday December 6th 2020

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و هفتم، شماره شش، شهریور ۱۳۹۸
تاریخ دریافت:۱۳۹۷/۳/۰۶
تاریخ پذیرش:۱۳۹۷/۷/۰۷

بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گیاه گلدر *(Otostegia Persica)* بر میزان آنژیوژنز و سطح بیان فاکتور VEGFR در پرده کوریوآلانتوییک جنین جوجه

زهرا عباس نژاد[۱]، مریم طهرانی پور*[۲]، سعیده ظفربالانژاد[۳]، نسترن امین طاهری[۴]

مقاله پژوهشی

مقدمه: آنژیوژنز یا رگ‌زایی، تشکیل مویرگ‌های جدید از عروق اولیه است که در حالات مختلف پاتولوژیک از قبیل رشد تومور، متاستاز، آرتریت روماتوئید، دیابت و هم‌چنین در فرایندهای فیزیولوژیک مانند رشد و نمو اندام، ترمیم زخم و تولید مثل نقش دارد. گلدر از خانواده نعناعیان دارای اثرات آنتی آپوزپتوزیس وآنتی اکسیدانی می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثرات عصاره الکلی گیاه گلدر برتغییر بیان ژن VEGFR در آنژیوژنز پرده کوریوالانتوئیک جنین جوجه است.

روش بررسی: دراین مطالعه تجربی ۶۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار نژاد ROSS به‌طور تصادفی به ۵ گروه شامل شاهد، شاهد آزمایشگاهی، تیمار با عصاره هیدروالکلی دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند. در روز دوم انکوباسیون پنجره‌هایی روی تخم‌مرغ‌ها ایجاد و در روز هشتم، یک اسفنج ژلاتینی با قطر۴ ×۴×۱ (حاوی آلبومین و محلول آگار در نرمال سالین) بر روی غشای کوریوالانتوئیک قرار داده وعصاره با دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به آن اضافه شد. روز دوازدهم ، قد و وزن جنین‌ها هم‌چنین شبکه عروقی پرده کوریوالانتوئیک توسط استرئومیکرسکوپ عکس‌برداری و سپس به کمک نرم‌افزار Image J طول و تعداد انشعابات مویرگی اطراف اسفنج اندازه‌گیری گردید. نتایج توسط نرم‌افزار Minitab 16 با آزمون آماری t-test و ANOVA درسطح معناداری ($P < ۰/۰۵$) تحلیل شدند.

نتایج: میانگین قد و وزن جنین‌ها (p=۰/۳۳۹)، تعداد و طول انشعابات عروقی در گروه شاهد نسبت به شاهد آزمایشگاهی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P= ۰/۸۶). میانگین تعداد عروق در تمام گروه‌های تیمار افزایش معنی‌داری نشان داد (P< ۰/۰۰۰۱). بیان ژن VEGFR در تمام گروه‌های تجربی نسبت به شاهد آزمایشگاهی افزایش یافته است.

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی گیاه گلدر دارای اثرات رگ‌زایی می‌باشد که در افزایش طول عروق، قد و وزن جنین‌ها و هم‌چنین بیان ژن VEGFR موثر است.

واژه‌های کلیدی: آنژیوژنز، گیاه گلدر، VEGFR، پرده کوریوالانتوئیک، جنین جوجه

ارجاع: عباس‌نژاد زهرا، طهرانی‌پور مریم، ظفر بالانژاد سعیده، امین طاهری نسترن. **بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گیاه گلدر *(Otostegia persica)* بر میزان آنژیوژنز و سطح بیان فاکتور VEGFR در پرده کوریوآلانتوییک جنین جوجه.** مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۸؛ ۲۷ (۶): ۱۷۰۰-۱۶۸۶.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
۲- دانشیار، دکترای تخصصی فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
۳-استادیار،دکترای علوم جانوری گرایش تکوین، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
٤ - کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۵۵۱۱۰۳۷۰، پست الکترونیکی: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir ، صندوق پستی ۴۱۳-۹۱۷۳۵

[DOI: 10.18502/ssu.v27i6.1603]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 16:20 IRST on Sunday December 6th 2020

مقدمه

آنژیوژنز یا رگ‌زایی، تشکیل مویرگ‌های جدید از عروق اولیه است که در حالات مختلف پاتولوژی از قبیل رشد تومور، متاستاز، آرتریت روماتوئید، دیابت و هم‌چنین در فرایندهای فیزیولوژیک مانند رشدونمو اندام، ترمیم زخم، تولید مثل، تخمک‌گذاری، قاعدگی، لانه‌گزینی دخالت دارند (۱). در صورت بهم‌خوردن تعادل بین فاکتورهای القاءکننده و مهارکننده آنژیوژنز، شرایط برای بروز بعضی بیماری‌ها بوجود می‌آید (۱،۲). هنگامی که بافت‌ها دچار هیپوکسی می‌شوند، این بافت‌های آسیب دیده اقدام به سنتز و رهاسازی فاکتورهای آنژیوژنیک می‌کنند. سپس فاکتورهای مذکور با اتصال به گیرنده‌های خود واقع بر روی سلول اندوتلیال، منجر به فعال شدن آن‌ها می‌شوند. در مرحله بعد پروتئازها از این سلول‌ها رها شده تا غشای پایه را حل کنند با حل شدن غشاء پایه سلول‌های اندوتلیال مهاجرت کرده و تکثیر می‌یابند. علاوه بر این مولکول‌های اتصالی مانند اینتگرین نیز به گسترش رگ‌های خونی در جوانه‌زدن کمک می‌کنند. در ادامه متالوپروتئینازهای ماتریکس برای تجزیه ماتریکس خارج سلولی و آغاز بازسازی مجدد آن تولید می‌گردند. سپس برهم‌کنش آنژیوپوتئیتن موجب تعدیل تشکیل رگ می‌گردد (۱،۲). VEGF یکی از مهم‌ترین فاکتورهای تحریک‌کننده آنژیوژنز بوده که اعمال میتوژنتیکی وآنژیوژنزی خود را با واسطه دو رسپتور تیروزین‌کینازی به نام‌های گیرنده‌های VEGF 1 و VEGF 2 که بر روی سلول‌های اندوتلیال عروق قرار دارند، اعمال می‌کند. مطالعات نشان داده است که VEGF نوع Aو B دارای بیشترین قدرت آنژیوژنزی هستند در حالی‌که VEGF های نوع C وD در لنفوژنز موثرند (۳). همه VEGFها باعث فسفریله شدن خودبه‌خود گیرنده‌ها شده و همانندسازی سلول‌های اندوتلیال و مهاجرت آن‌ها را تحریک می کنند. جمع‌شدن سلول‌های اندتلیال و تشکیل ساختمان لوله‌ای عروق نیازمند فعال شدن VEGFR-1 روی سطح سلول‌های تازه تمایز یافته می‌باشد (۳). بسیاری از ترکیبات ضدرگ‌زایی که اکنون در مرحله آزمایشات کلینیکی قرار دارند، ترکیبات طبیعی هستند (۱۵). تولید دارو از فرآورده‌های طبیعی به سرعت در حال رشد و توسعه می‌باشد، این ترکیبات استراتژی بسیار امید بخش برای شناسایی عوامل ضدرگ‌زایی و ضدسرطان می‌باشند (۴).

Adams و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثرات ضدرگ‌زایی آنالوگ‌های کورکومین را بر فرآیند رگ‌زایی بررسی نمودند، تحقیقات این گروه نشان داد، این ترکیبات توانایی مهار رگ‌زایی بیشتری نسبت به داروی سیس‌پلاتین (متداول در شیمی‌درمانی) دارند (۵). هم‌چنین اثرات ضدسرطانی راپامایسین بر فرآیند رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه نیز بررسی و اثبات شده است (۵). در سال ۲۰۰۹ اثرات فعالیت ضدرگ‌زایی عصاره آبی موسیر در مدل حلقه آئورت موش صحرایی مطالعه و نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، عصاره آبی پیازچه‌های موسیر دارای فعالیت مهار رگ‌زایی چشم‌گیر، بدون اثر سمی بر روی سلول‌ها در دامنه غلظتی ۵۰ تا ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد، بنابراین عصاره موسیر می‌تواند یک نامزد مناسب برای تحقیقات بیشتر به‌عنوان یک داروی مورد استفاده در حالات پاتولوژیک وابسته به رگ‌زایی معرفی شود (۴). در سال ۲۰۱۰ نقش میدان الکترومغناطیسی بافرکانس ۵۰ هرتز بر مهار رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه مورد بررسی قرار گرفت، این مطالعات نشان داد، میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم و شدت ۲۰۰ گوس دارای اثر مهاری بر رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه است و تعداد و طول انشعابات عروقی را در مقایسه با نمونه‌های شاهد کاهش می‌یابد. لذا پیشنهاد شده است که کاربری توام میدان الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز با روش‌های شیمی‌درمانی جهت‌درمان بیماری‌های مرتبط با رگ‌زایی می‌تواند مورد توجه بیشتری قرار گیرد (۳،۴).

در سال ۲۰۱۱ اثرات ضد رگ‌زایی سدیم والپروات و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم بر فرآیند رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه نیز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد، میدان الکترومغناطیسی با شدت ۴۰۰ گوس می‌تواند اثرات ضد رگ‌زایی سدیم والپروات را افزایش دهد (۴). در حال حاضر بسیاری از داروهای شیمیایی، حاصل

[DOI: 10.18502/ssu.v27i6.1603]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 16:20 IRST on Sunday December 6th 2020

فرآورده‌های به‌دست آمده با منشاء طبیعی از جمله گیاهان یا مشتقی از آن‌ها هستند. تجویز ترکیبات گیاهی که با فرایند چند گانه رگ‌زایی برهم‌کنش می‌کنند، به تقویت اثرات مثبت شیمی‌درمانی مرسوم می‌انجامد. به عبارت بهتر، هدف قرار دادن اندوتلیوم عروق با استفاده از عوامل درمانی غیرسمی با دوز پایین و مداوم ممکن است، موجب کنترل گسترش تومور شده بدون این‌که سمیت اضافی در پی داشته باشند (۳).

گیاه گلدر (کاسه گل یا گودر) از تیره Labiatae یا Lamiaceae از جنس persica است. برخی از ترکیبات مهم گلدر فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی از جمله مورن، کوئرستین هستند (۴). کامفرول و ایزووتکسین (C-glucoflavone) و هم‌چنین ترانس‌سینامیک‌اسید از عصاره متانولی‌گلدر مشخص شد (۵). اسیدکافئیک، اسیدبنزوئیک ρ هیدروکسی، بتاسیتوسترول و استات نیز در عصاره متانولی گلدر توسط آیت‌اللهی و همکاران، در سال2007 جدا شدند.

هدف از این پژوهش بررسی احتمالی اثرات عصاره هیدروالکلی گیاه گلدر بر تغییرات ژن VEGFR در آنژیوژنز در پرده کوریوالانتوئیک جنین جوجه می‌باشد با توجه به این‌که گیاه گلدر به طور شایع توسط مردم برای درمان بیماری‌های مختلف مصرف می‌شود و تاکنون اثر رگ‌زایی این گیاه بر روی موجودات زنده بررسی نشده است لذا این مطالعه با هدف مذکور طراحی شد. با توجه به تحقیقات مربوط به کشف و شناسایی فاکتورهای آنژیوژنیک وعوامل مهار کننده آنژیوژنز جهت درمان بیماری‌های مختلف از جمله ترمیم زخم‌ها و انواعی از تومورها که با آنژیوژنز ارتباط تنگاتنگی داشته و به آن وابسته هستند و روش‌های مهار آنژیوژنز که با هدف تداخل با این فرآیند مهم جهت‌گیری نموده‌اند مسیر امیدوارکننده‌ای برای درمان بیماری‌های وابسته به آنژیوژنز محسوب می‌شوند. به منظور کاهش عوارض جانبی روش‌های رایج درمانی از داروهای گیاهی به‌عنوان یک منبع جدید با قابلیت بالا و سمیت و هزینه کم برای روش‌های درمانی مناسب و بر اساس اقدامات علمی از این گیاه محلی برای توسعه دارویی استفاده شود.

روش بررسی

متد عصاره گیری

برای انجام این مطالعه تجربی در یک بشر استریل مقدار ۰/۰۳ گرم پودر آگار را در۵ میلی لیتر محلول نرمال سالین در دمای اتاق حل نموده و آن در ضمن هم زدن به آهستگی تا نقطه جوش گرم شد. سپس بشر حاوی آگار در سالین در بن ماری با دمای ۴۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در بشر استریل دیگری مقدار مساوی با آگارسالین، آلبومین رقیق (سفیده تخم مرغ معمولی) ریخته و آن را نیز در بن ماری دمای ۴۹ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. وقتی هر دو بشر هم دما شدند، آلبومن به بشر محتوی آگارسالین اضافه و هم زده سپس به مخلوط حاصل پنی سیلین–استرپتومایسین (۱میلی‌لیتر برای ۶۰ میلی‌لیتر محلول) افزود و در پلیت با ضخامت مورد نظر (یک میلی متر) ریخته شد. این ترکیب برای مدت ۲ الی ۳ هفته در یخچال قابل نگهداری است. گیاه گلدر از شهرستان ایرانشهر جمع آوری شد و توسط هرباریوم دانشگاه آزاد واحد مشهد شناسایی و کد هرباریوم ۹۷۲۹ گرفت. سرشاخه‌های گیاه گلدر پس از خشک کردن به‌وسیله هاون به‌صورت پودر درآورده شده و سپس داخل کاغذ صافی قرار گرفته و در دستگاه سوکسله جهت عصاره گیری قرار داده شد.

تهیه عصاره هیدروالکلی

۵۰ گرم از پودر خشک سر شاخه گیاه گلدر داخل کاغذ مخصوص کارتوش ریخته ودر دستگاه سوکسله قرار داده شد. سپس ۳۰۰ سی سی مخلوط آب مقطر واتانول ۹۶ درصد به نسبت مساوی درمحفظه مخصوص دستگاه ریخته شد. هم‌چنان‌که کیسه حرارتی دستگاه آرام آرام گرم می‌شود حلال (آب والکل) نیز گرم شده و عصاره گلدر با حلال مخلوط گشته و به بالن بر می‌گردد. بدین ترتیب از حجم کل محلول کاسته نمی‌شود. عصاره گیری در ۹ ساعت صورت گرفت تا اطمینان حاصل شود که تمام عصاره قابل حل در حلال، از پودر استخراج شده است (۶). دوزهای مورد استفاده از این عصاره ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تعیین شد. با توجه به تحقیق انجام شده درباره اثرعصاره گیاه گلدر برسطح سری گلوکز و

[DOI: 10.18502/ssu.v27i6.1603]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 16:20 IRST on Sunday December 6th 2020

مورفولوژی پانکراس در موش‌های صحرایی دیابتی این دوزها مشخص شد (۷). با توجه به میانگین وزن جنین جوجه در روز ۸ انکوباسیون که تقریباً ۱ گرم بود، میزان عصاره هیدروالکلی مورد نیاز محاسبه شد. عصاره پودر شده را با ۱۰cc نرمال سالین در لوله فالکن مخلوط کرده و هم زده شد تا محلول شفاف و یک‌دست به‌دست آید و به میزان ۱۰میکرولیتر از این محلول در روز هشتم انکوباسیون در شرایط استریل به نمونه‌های گروه تجربی ۲ (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تزریق گردید. در هر مرحله تعداد ۴۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار در دستگاه جوجه‌کشی با دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۵-۵۵٪ قرار گرفتند. در روز دوم انکوباسیون در شرایط استریل هودلامینار، به کمک پنس استریل که قبلاً در اتوکلاو قرار گرفته‌اند. روی سطح پهلویی تخم‌مرغ‌ها یک پنجره به ابعاد تقریبی۵x۵ میلی‌متر مربع ایجاد گردید.

برای ایجاد پنجره، پس از استریل کردن تخم‌مرغ‌ها به کمک اتانول ۷۰٪ و انتقال آن ها به زیر هودلامینار ابتدا سوراخی در سر پهن تخم‌مرغ ایجاد گردید. پس از برداشت پوسته تخم‌مرغ‌ها پنجره به کمک لامل و پارافین استریل پوشانده شده و تخم‌مرغ‌ها به دستگاه جوجه‌کشی منتقل شدند (۸). دستگاه جوجه‌کشی دارای امکان چرخش تخم‌مرغ‌ها به صورت اتوماتیک و دستی می‌باشد که پس از ایجاد پنجره‌ها در سطح پوسته تخم‌مرغ‌ها، وضعیت چرخشی اتوماتیک قطع گردیده و به صورت دستی تخم‌مرغ‌ها حرکت داده می‌شوند. سپس تخم‌مرغ‌ها در ۴ گروه ده‌تایی به‌صورت تصادفی قرار گرفتند. از تمام گروه‌های مورد مطالعه، در روز دوازدهم انکوباسیون به کمک فوتواسترئومیکروسکوپ تحقیقاتی تصاویری از ناحیه قرارگیری اسفنج در پرده کوریوآلانتوئیک با درشت نمایی ۴۰ x تهیه شد. تصاویر با نرم‌افزار Image J در یک مونیتور ۱۵ اینچ مورد بررسی قرار گرفتند.

تخم‌مرغ‌ها پس از بستن محل پنجره تا روز دوازدهم به دستگاه جوجه‌کشی بر گردانده شد. از تمام نمونه‌ها در روز دوازدهم انکوباسیون به کمک فوتواسترئومیکرسکوپ تحقیقاتی عکس تهیه و تعداد و طول انشعابات عروقی با کمک نرم‌افزارImage J شمارش شد سپس جهت بررسی بیان ژن رسپتور VEGF نمونه برداری CAM انجام شد و توسط کیت مخصوص، RNA استخراج و cDNA سنتز شد و واکنش‌های زنجیره PCR با روش‌های RT-PCR انجام شده و در نمونه‌های گروه‌های مختلف داده‌ها با هم مقایسه شدند (۹).

Real- Time PCR

در این روش از کاوشگرها با پروب های هیبریداسیون نشان دار شده با رنگ‌های فلورسانس در انتهای ´۵ یا ´۳ استفاده می‌شود، که امکان بررسی محصول PCR را بدون جداسازی آن‌ها در روش‌های الکتروفورز در ژل آگاروز یا ژل پلی‌اکریل آمید می‌دهد (۱۰) (جدول ۱و۲).

جدول۱: پروتکل Real time PCR برای ژن VEGF R

Final conc	Volume	Component
1x	10µl	SYBR Green PCR Master Mix(2x)
1x	0.4µl	50x ROX dye
100µM	1µl	Forward primer
100µM	1µl	Reverse primer
-----	3µl	Template DNA
----	4.6µl	Sterilized D.W
----	20µl	Total Volume

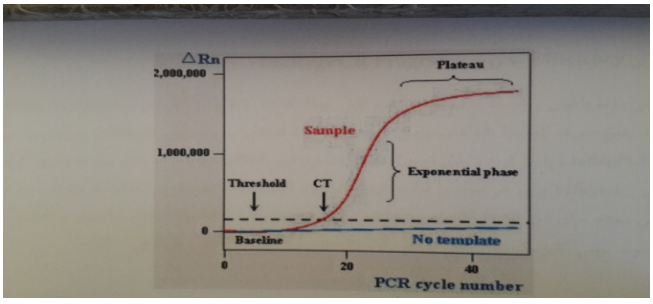
[DOI: 10.18502/ssu.v27i6.1603]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 16:20 IRST on Sunday December 6th 2020

جدول ۲ : توالی پرایمر استفاده برای بررسی بیان ژنVEGF R

GENES	Primer Sequence	TM
VEGF R	Forwad:5´ CCAACAGCCTTGCACGAAC 3’	63◦C
VEGF R	Reverse:5´ TGCTCACGCCAATCCGAAG 3´	63◦C
GAPDH	Forwad:5´ TGCTGGTGCTGAGTATGTCG 3´	60◦C
GAPDH	Reverse:5´ GCATGTCAGATCCACAACGC 3´	60◦C

جدول ۳: برنامه دمایی Real time PCR ژن VEGF R

Cycle	Time	Temp
1	15Mine	95◦C
45	15 Sec	95◦C
	30 Sec	63◦C
	30 Sec	72◦C
1	5Min	72◦C



شکل مراحل Real time PCR

مراحل **Real time PCR**

فاز اولThe baseline region : با وجود این‌که محصول دو رشته‌ای وجود دارد ولی نور آن قابل ردیابی نیست.

فاز دوم The exponential phase : محصول دو رشته‌ای در هر چرخه دو برابر می‌شود و رشد نمایی مربوط به واکنش شروع می‌شود. فاز سوم The liner phase : ترکیبات واکنش و کارایی آن‌ها رو به اتمام است. فاز چهارم The plateau phase: ترکیبات واکنش از بین می‌روند و افزایش در میزان فلورسنت مشاهده نمی شود (۱۰).

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه روش‌های کمی quantitative real – time PCR وابسته به اندازه‌گیری میزان تکثیر قطعات ژنی در هر سیکل PCR با استفاده از ملکول‌های ساطع‌کننده نور فلورسنت هستند و داده‌های فلورسنت جمع‌آوری شده از real-time بایستی توسط روش‌های

[DOI: 10.18502/ssu.v27i6.1603]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 16:20 IRST on Sunday December 6th 2020

آنالیز داده‌ها بررسی شوند تا میزان تفاوت بیان mRNA در ژن هدف در مقایسه با ژن کنترل مشخص گردد (۱۰). انجام Quantitative Real-time PCR تکنیک به کار رفته در این تحقیق Real-time PCR بوده که با این تکنیک میزان بیانmRNA ژن‌های مورد نظر با روش کمی نسبی و با استفاده از رنگ Green Syber ارزیابی گردیده و میزان تکثیر در چرخه‌ای که بیان ژن‌ها قابل ردیابی بود، تحت عنوان Thresholb Ct Cycle نامیده و Ctهای حاصل نسبت به Ct مربوط به بیان ژن Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) مورد ارزیابی قرار گرفت. از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ برای بررسی تفاوت بیان mRNA استفاده گردید و از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده شد (۱۰). در این بررسی یک ژن رفرنس و یک ژن هدف وجود دارد. یک گروه به عنوان کالیبراتور شناخته می‌شود و بیان ژن‌ها نسبت به این کالیبراتور سنجیده می‌شود. بررسی ماکروسکوپی شاخص‌های رشد جنینی: پس از عکس‌برداری از پرده کوریوآلانتوئیک کل نمونه‌ها، جنین‌ها را برداشت کرده و وزن بر حسب گرم و طول سری–دمی(CR) بر حسب سانتی‌متر، با ترازوی دیجیتال محاسبه شد و سپس در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد.

تجزیه و تحلیل آماری

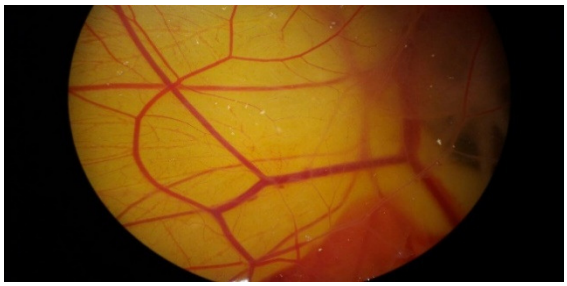
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Imagej توسط آزمون آماری t و آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) در سطح ($P<۰/۰۵$) تحلیل شد. پس از فیکس شدن جنین‌ها، در زیر استرئومیکروسکوپ جنین‌های گروه‌های تیمار را با جنین‌های گروه شاهد مقایسه و به کمک اطلس جنین‌شناسی جوجه، از نظر ناهنجاری‌های مورفولوژیکی بررسی شدند.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه آزاد واحد مشهد تایید شده است.

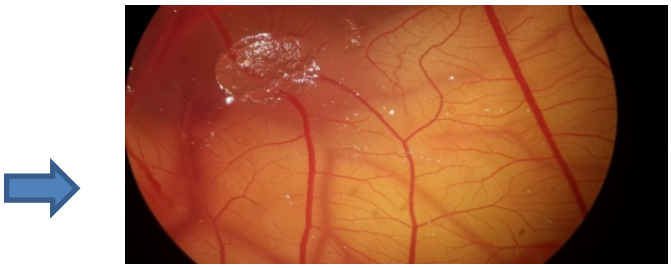
نتایج

در این بررسی یک ژن رفرنس و یک ژن هدف وجود دارد. یک گروه به عنوان کالیبراتور شناخته می‌شود و بیان ژن‌ها نسبت به این کالیبراتور سنجیده می‌شود. نتایج حاصل از مطالعه پرده کوریوالانتوئیک: در روز هشتم انکوباسیون عصاره هیدروالکلی گلدر با دوز ۱۰۰، دوز۲۰۰ و دوز ۴۰۰ تهیه شد. به تخم‌مرغ‌ها میزان ۱۰ میکرولیتر از غلظت‌های ذکر شده تزریق شد و در روز دوازدهم انکوباسیون جنین وپرده‌های آن مورد بررسی قرار گرفتند و توسط فتواسترئومیکروسکوپ از وضعیت عروق عکس‌برداری شد (تصاویر۱تا۶). نمایش عروق در نمونه شاهد آزمایشگاهی (تصویر۲)، تجربی۱ (دوز ۱۰۰، تصویر۳)، تجربی ۲(دوز۲۰۰، تصویر۴) و تجربی ۳ (دوز ۴۰۰، تصویر ۵).

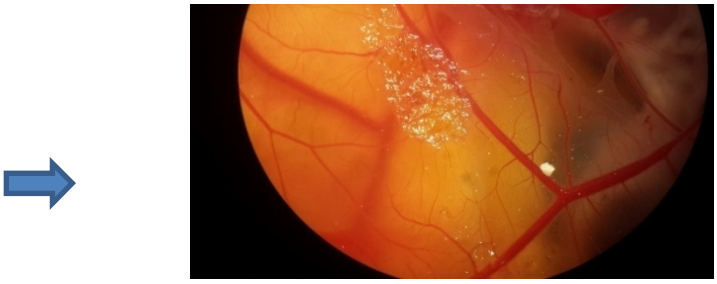


تصویر۱: فتواسترئومیکروسکپ عروق در سطح غشای کوریوآلانتوئیک در نمونه شاهد آزمایشگاهی با بزرگ‌نمایی40X

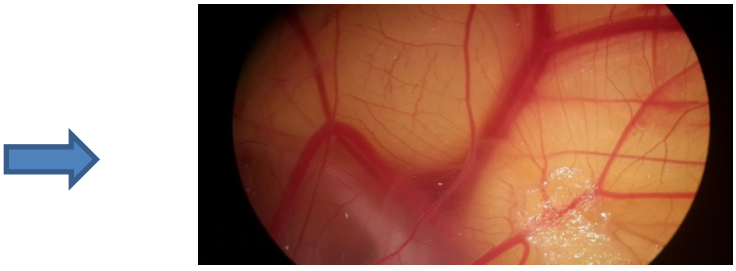
[DOI: 10.18502/ssu.v27i6.1603]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 16:20 IRST on Sunday December 6th 2020



تصویر۲: فتواسترئومیکروسکپ عروق در سطح غشای کوریوآلانتوئیک در نمونه تجربی۱(دوز ۱۰۰) با بزرگ‌نمایی40X



تصویر۳: فتواسترئومیکروسکپ عروق در سطح غشای کوریوآلانتوئیک در نمونه تجربی۲(دوز ۲۰۰) با بزرگ‌نمایی40X

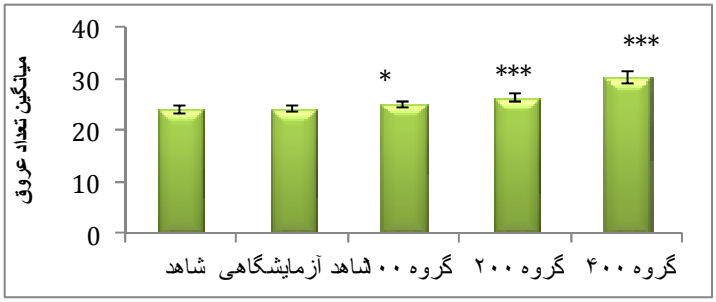


تصویر۴: فتواسترئومیکروسکپ عروق در سطح غشای کوریوآلانتوئیک در نمونه تجربی۳ (دوز ۴۰۰) با بزرگ‌نمایی40X

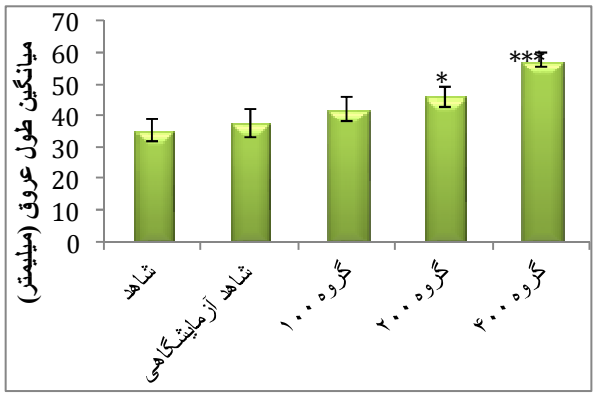
مقایسه میانگین تعداد عروق در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه در گروه شاهد (۰/۸۶۶ mm±۲۴/۰۰۰) با شاهد آزمایشگاهی (۰/۶۰۶ mm±۲۴/۰۸۳) نشان داد که اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (p=۰/۸۶). مقایسه میانگین مجموع طول عروق در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه در گروه ۱۰۰ (۰/۶۹۷ mm ±۲۵/۰۴۲) با گروه شاهد آزمایشگاهی (۰/۶۰۶ mm±۲۴/۰۸۳) اختلاف معنی‌داری را نشان داد (p= ۰/۰۳). مقایسه میانگین مجموع طول عروق در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه در گروه ۲۰۰(۰/۷۶۵mm ± ۲۶/۲۰۸) با گروه شاهدآزمایشگاهی (۰/۶۰۶ mm±۲۴/۰۸۳) افزایش معنی‌داری را نشان داد (P= ۰/۰۰۱). مقایسه میانگین مجموع طول عروق در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه در گروه ۴۰۰ (۱/۲۵۲± ۳۰/۳۷۵) با گروه شاهدآزمایشگاهی (۰/۶۰۶ mm±۲۴/۰۸۳) افزایش معنی‌داری را نشان داد (p</۰۰۰۱).طبق نمودار فوق میانگین تعداد عروق در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه برای گروه شاهد کمترین و برای دوز ۴۰۰ بیشترین است. براساس نمودار چون سطح معنی‌داری برابر با ۰/۰۰۰ و از ۰/۰۵ کمتر است بنابراین با اطمینان ۹۵ درصد می‌توان گفت میانگین مجموع تعداد رگ در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه در پنج گروه یکسان نیست. مقایسه میانگین طول انشعابات عروقی پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه در گروه شاهد (۳/۴۴۵ ± ۳۵/۲۴۵) با شاهد آزمایشگاهی (۴/۳۹۳±۳۷/۴۱۰) نشان داد که اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (p= ۰/۱۶۱). مقایسه میانگین طول انشعابات عروقی پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه بین گروه ۱۰۰ (۳/۸۳۱± ۴۱/۷۳۵) با گروه شاهدآزمایشگاهی اختلاف معنی‌داری نشان

[DOI: 10.18502/ssu.v27i6.1603]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 16:20 IRST on Sunday December 6th 2020

نداد (p= ۰/۲). مقایسه میانگین طول انشعابات عروقی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه بین گروه ۲۰۰ (۳/۳۵۰± ۴۵/۹۰۰) با گروه شاهد آزمایشگاهی افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد (p=۰/۰۲۸). مقایسه میانگین طول انشعابات عروقی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه بین گروه ۴۰۰ (۲/۱۷۹±۵۷/۶۶۸) با گروه شاهد آزمایشگاهی افزایش معنی‌دار نشان می‌دهد (p<۰/۰۰۰۱).



نمودار۱: مقایسه میانگین طول انشعابات عروقی در سطح پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه‌ها در گروه‌های مختلف (*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)



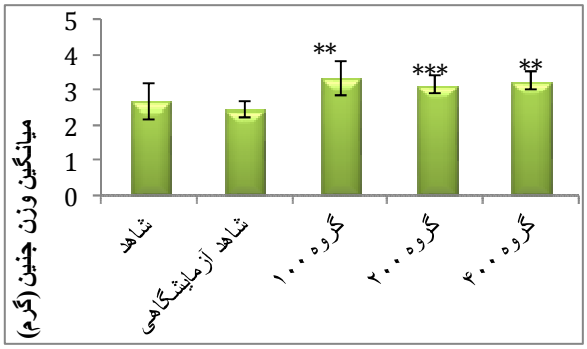
نمودار ۲: مقایسه میانگین طول عروق در سطح پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه‌ها در گروه‌های مختلف

(*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)

براساس نمودار چون سطح معنی‌داری برابر با ۰/۰۰۰۱ و از ۰/۰۵ کمتر است بنابراین با اطمینان ۹۵ درصد می‌توان گفت میانگین طول عروق در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه در پنج گروه یکسان نیست.

مقایسه میانگین وزن جنین جوجه بر حسب گرم در گروه شاهد (۰/۵۱gr± ۲/۶۷) با شاهدآزمایشگاهی (۰/۲۱ gr ± ۲/۴۵) نشان داد که اختلافات معنی‌داری وجود ندارد (p= ۰/۴۷۱). مقایسه میانگین وزن جنین جوجه بر حسب گرم گروه ۱۰۰ (۰/۴۸ gr±۳/۳۳) با گروه شاهدآزمایشگاهی (۰/۲۱ gr± ۲/۴۵) افزایش معنی‌داری را نشان داد (p= ۰/۰۱۳). مقایسه میانگین وزن جنین جوجه بر حسب گرم گروه ۲۰۰ (۰/۲۴ gr ±۳/۱۴) با گروه شاهدآزمایشگاهی (۰/۲۱ gr± ۲/۴۵) اختلاف معنی‌داری را نشان داد (p< ۰/۰۰۰۱). مقایسه میانگین وزن جنین جوجه بر حسب گرم گروه ۴۰۰ (۰/۲۵ gr ±۳/۲۵) با گروه شاهدآزمایشگاهی (۰/۲۱ gr± ۲/۴۵) اختلاف معنی‌داری را نشان داد (p=۰/۰۰۳).

[DOI: 10.18502/ssu.v27i6.1603]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 16:20 IRST on Sunday December 6th 2020

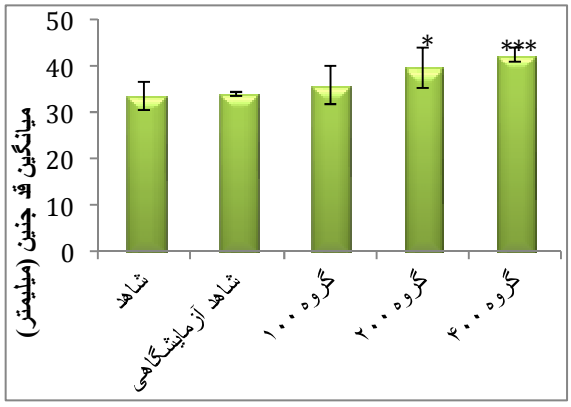


نمودار ۳: مقایسه میانگین وزن جنین (گرم) در گروه‌های مورد مطالعه (* p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)

طبق نمودار فوق میانگین وزن جنین جوجه برای گروه شاهد آزمایشگاهی کمترین و گروه ۱۰۰ بیشترین است. براساس جدول ۹ چون سطح معنی‌داری برابر با ۰/۰۰۱ و از ۰/۰۵ کمتر است بنابراین با اطمینان ۹۵ درصد می‌توان گفت میانگین وزن جنین در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه در پنج گروه یکسان نیست.

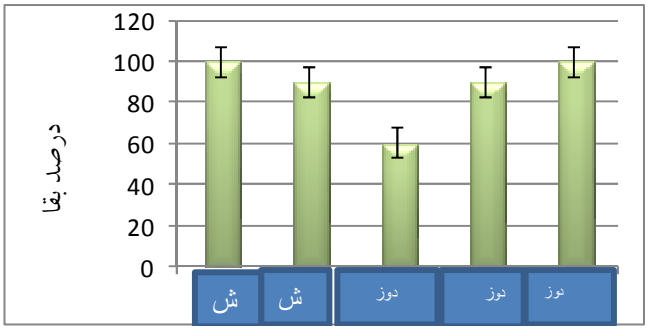
بررسی طول سری-دمی CR جنین جوجه

مقایسه میانگین طول سری-دمی CR جنین جوجه در گروه شاهد (۳۳/۵۳ ±۲/۹۷ mm) با شاهد آزمایشگاهی (۴۷mm/ ۰±۳۴/۰۱) نشان داد که اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (p=۰/۶۸۷). مقایسه میانگین طول سری-دمی CR جنین جوجه گروه۱۰۰ (۳۲/۱۵± ۰/۹۵ mm) با گروه شاهد آزمایشگاهی (۴۷mm/ ۰±۳۴/۰۱) اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (p=۰/۳۳۹). مقایسه میانگین طول سری-دمی CR در گروه ۲۰۰ (۳۹/۶۵± ۴/ ۳۷mm) با گروه شاهد آزمایشگاهی (۳۴/۰۱±۰/۴۷mm) افزایش معنی‌داری را نشان داد (۰/۰۲۳ =P). مقایسه میانگین طول سری-دمی CR در گروه ۴۰۰ (۴۲/۳۰± ۱/ ۵۳mm) با گروه شاهد آزمایشگاهی (۴۷mm/ ۰±۳۴/۰۱) افزایش معنی‌داری را نشان داد. (p<۰/۰۰۰۱) براساس نمودار می‌توان گفت میانگین طول سری دمی CR جنین جوجه در پنج گروه یکسان نیست. در مطالعه حاضر هم‌چنین بررسی تعداد جنین‌های زنده در گروه‌های مورد مطالعه صورت گرفت (نمودار۵).



نمودار۴: مقایسه میانگین قد جنین در گروه‌های مختلف (*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001)

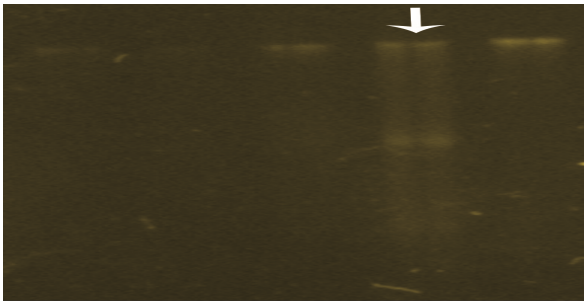
[DOI: 10.18502/ssu.v27i6.1603]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 16:20 IRST on Sunday December 6th 2020



نمودار۵: مقایسه مرگ ومیر در جنین‌های مورد مطالعه

در مطالعه حاضر جنین‌های روز دوازدهم از نظر ناهنجاری‌های مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در هیچ یک از گروه‌های تجربی ناهنجاری مورفولوژیکی به وجود نیامده است. برای تایید کیفیت RNA استخراج شده تست‌های الکتروفورز و نانوداپ انجام گرفت. با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری و دستگاه نانودراپ از کیفیت RNA و استخراج صحیح آن اطمینان حاصل شد. این دستگاه به طور اتوماتیک غلظت RNA را با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر، محاسبه می کند.

پس از آماده سازی نمونه و گذاردن آن در مکان قرارگیری نمونه، دستگاه غلظت نمونه مورد نظر را در طول موج مربوطه، بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر، محاسبه می‌نماید (۱۱).



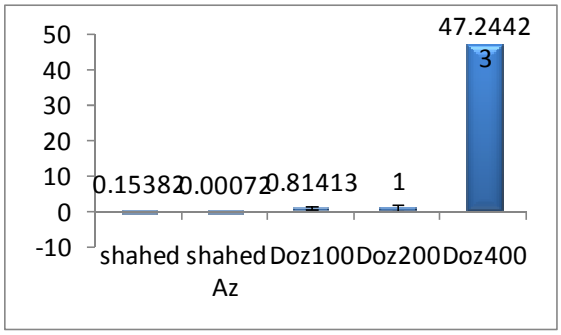
تصویر۵:.تهیه ژل الکتروفورز وتائید RNAها در نمونه‌ها به ترتیب شاهد – شاهد آزمایشگاهی- دوز ۱۰۰-دوز۲۰۰-دوز۴۰۰

از هر گروه ۲ نمونه به ترتیب پشت سر هم قرار داده شد ونتایج بر روی صفحه ژل الکتروفورز نشان داده شد. میان نمونه‌های استخراج شده به ترتیب: یک نمونه شاهد وشاهد آزمایشگاهی ۲ نمونه از گروه‌های تجربی دوز ۱۰۰، دوز ۲۰۰، دوز۴۰۰ عصاره هیدروالکلی گلدر قرار داده شد. در نتیجه بهترین نمونه‌ها از بین هر گروه تیمار انتخاب شد که نتایج نمونه‌های انتخابی در جداول آمده است. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره هیدروالکلی گلدر با افزایش تعداد انشعابات عروقی به عنوان تحریک کننده آنژیوژنز در این فرآیند نقش داشته است. با توجه به تفسیر نمودار بیان‌ژن VEGFR به این نتیجه رسیدیم که عصاره هیدروالکلی گلدر در تمامی گروههای تجربی نسبت به شاهد آزمایشگاهی باعث تحریک بیان ژن VEGFR شده است.

[DOI: 10.18502/ssu.v27i6.1603]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 16:20 IRST on Sunday December 6th 2020

جدول ۱۲: غلظت RNA استخراج شده

گروه	غلظت RNA(ng/µl)
کنترل	۰/۰۲۲
شاهد آزمایشگاهی	۰/۰۲
دوز ۱۰۰	۰/۱
دوز ۲۰۰	۰/۱
دوز ۴۰۰	۰/۰۹



نمودار ۵: مقایسه بیان ژنVEGFR درگروه‌های مورد مطالعه

بحث

در این پژوهشی که بر روی عصاره هیدروالکلی گیاه گلدر انجام گرفت این نتیجه حاصل شد که تزریق این عصاره بر روی پدیده آنژیوژنز پرده کوریوالانتوئیک جنین جوجه تاثیر داشته است. این عصاره باعث افزایش تعداد عروق در پرده کوریوالانتوئیک شد (نمودار ۱). پس می‌توان گفت که نقش تحریک کنندگی آنژیوژنز را ایفا می‌کند از طرفی این عصاره موجب افزایش طول عروق شده است پس در تکثیر سلولی نقش داشته چنانچه بیان ژن VEGFR نیز در دوز ۴۰۰ در مقایسه با شاهد آزمایشگاهی افزایش یافته است این ژن بیشتر در تکثیر سلولی نقش دارد. در جنین‌های مورد مطالعه مشخص شد که جنین‌های گروه تیمار با دوز ۱۰۰ دارای بیشترین وزن نسبت به شاهد آزمایشگاهی هستند (نمودار ۲) قد جنین‌ها در دوز ۲۰۰ ودوز ۴۰۰ افزایش معنا داری نسبت به شاهد آزمایشگاهی داشت (نمودار۳). در مشاهدات مورفولوژیکی در گروه‌های تیمار اثرات تراتوژنی از این عصاره مشاهده نشد. پس نتایج ما در رابطه با اثرات تراتوژنی عصاره هیدروالکلی مخالف با نتایج گلشن ایرانپور و همکاران ۱۳۹۱ است.

از جمله ترکیبات موجود در عصاره گیاه گلدر ترکیبات استروئیدی می‌باشد، از آنجا که تجویز این ترکیبات در موش صحرایی به شکل سیستمیک و یا موضعی، می‌تواند باعث بهبود فرآیند ترمیم زخم ورگ‌زایی گردد (۱۲). درسال ۲۰۰۷، شریفی‌فر و همکاران از تجزیه و تحلیل اسانس گل‌های گلدر ترکیب آلفا-پینن و 1-octen، را به‌عنوان ترکیبات اصلی این گل گزارش کردند. آلفا پنین موجود در آن با تحریک عصب سه قلو (تری ژرمینال)، ایجاد اثرات آرام‌بخشی می‌کند، در کنار آن باعث تحریک ریه هم می‌شود و شخص احساس تنگی‌نفس و ناراحتی در راه‌های هوایی می‌کند (۱۳). احتمال دارد مرگ و میر زیاد جنین‌ها در دوز ۱۰۰ به علت وجود ترکیب آلفاپینن در گلدر باشد (نمودار۴). مطالعه عسکری و همکاران نشان داد که تزریق عصاره گیاه چای کوهی که حاوی آلفا پینن است به

[DOI: 10.18502/ssu.v27i6.1603]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 16:20 IRST on Sunday December 6th 2020

موش‌های باردار باعث اختلال در رشد جنین و ایجاد ناهنجاری در جنین می‌شود (۱۴).از جمله ترکیبات موجود در عصاره گیاه گلدر ترکیبات استروئیدی می‌باشد، از آن‌جا که تجویز این ترکیبات در موش صحرایی به شکل سیستمیک و یا موضعی، می‌تواند باعث بهبود فرآیند ترمیم زخم و رگ‌زایی گردد (۱۵). می‌توان احتمال داد که افزایش طول عروق خونی در گروه تجربی دوز ۴۰۰ به دلیل وجود ترکیبات استروئیدی در گلدر می‌باشد (۱۵،۱۶).

برخی از ترکیبات مهم گیاه گلدر از فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی از جمله مورن و کوئرستین هستند (۱۷). فلاونوئیدهای موجود در این گیاه در روند ترمیم زخم‌ها، به‌عنوان عامل موثری در از بین بردن رادیکال‌های آزاد (به واسطه مهار سنتز نیتریک‌اکساید) محسوب می‌شوند (۱۸). وجود ترکیب‌های فلاونوئیدی در عصاره گیاه گلدر موجب استفاده از این گیاه در طب سنتی به‌عنوان ضد درد والتهاب شده است. به نظر می‌رسد که فلاونوئیدهای موجوددر عصاره گلدر، احتمالاً با مهار یک‌سری از آنزیم‌هایی مانند: ایزوفرم‌های نیتریک اکساید سنتتاز و سیکلواکسیژناز دو، بیوسنتز پروستاگلندین‌ها و نیتریک‌اکسید و دیگر واسطه‌های التهابی را که در مراحل التهابی فعالند، مهار می‌کنند و باعث کاهش التهاب می‌شوند (۱۴،۱۵). بنابراین اثرات تحریک کنندگی آنژیوژنزی که در گروه‌های تجربی مشاهده می‌شود وابسته به دوز می‌باشد احتمالاً وابسته به اثرات فلاونوئیدهاست که در پدیده ترمیم اتفاق می‌افتد، آنژیوژنز در پیشبرد روند ترمیم نقش اساسی دارد.

در پژوهش انجام گرفته حاضر، با توجه به بررسی فرآیند آنژیوژنز می‌توان ارتباطی را بین وجود ترکیبات فنولی و آنژیوژنز برقرار نمود، وجود ترکیبات فلاونوئیدی که در عصاره هیدروالکلی این گیاه فراوری شده است، با افزایش تکثیر سلولی و کاهش فعالیت اکسیژن‌های آزاد در روندهای ترمیمی و ضدالتهابی موثر است. نتایج این تحقیق هم‌سو با نظرات سایر دانشمندان است به‌طوری‌که بیان ژن VEGFR، تعداد و طول انشعابات عروقی در گروه تجربی هیدروالکلی بیشتر است (نمودار ۵) تا (نمودار۸). در تحقیقی بر روی موش‌های صحرایی هایپراورسمیک اثر کامفرول و کوئرستین انجام گرفت که اثرات آنتی‌اکسیدانی این دو ماده و ممانعت از آسیب‌دیدگی مولکول‌های اسیدهای نوکلئیک به اثبات رسیده است (۱۹،۲۰). پس در طرح حاضر نیز به علت وجود کامفرول و کوئرستین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی در پرده کوریوالانتوئیک رگ‌زایی ایجاد شده که هم راستا با تحقیقات دانشمندان قبل می‌باشد. Ruiz و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند، کورستین که یک نوع فلاونوئید است، باعث مهار بیان سیتوکین‌های التهابی می‌شود و در نتیجه التهاب را تضعیف می‌کند (۲۱) بنابراین به نظر می‌رسد که احتمالاً وجود ترکیبات زیادی از جمله: تانن، فلاونوئیدها و تری‌ترپنوئیدها و کورستین درگیاه گلدر باعث شود که روند آنژیوژنز وترمیم با این گیاه به خوبی صورت بپذیرد. مهم‌ترین فاکتور که نقش بسزایی در فرآیند رگ‌زایی ایفا می‌کند فاکتوررشد اندوتلیال وگیرنده‌های آن است. فان و همکاران نشان دادند که گونه گیاهی آلوورا با داشتن ترکیبی به‌نام بتاسیتوسترول از طریق مکانیسم‌های تحریک سلول اندوتلیال ورید نافی انسان و تسهیل بیان فاکتور رشد اندوتلیال ورید و گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال ورید یک گیاه با خاصیت رگ‌زایی است (۲۲،۲۳،۲۴). با توجه به گزارش حاج هاشمی و همکاران که نشان دادند در گیاه گلدر ترکیب بتاسیتوسترول وجود دارد پس می‌توان گفت احتمالاً افزایش رگ‌زایی در این تحقیق مربوط به بتاسیتوسترول می‌باشد (۲۵). در این تحقیق مشخص شد که بیان ژن VEGFR درگروه تیمار، دوز ۴۰۰ با توجه به نمودار۷ افزایش چشم‌گیری نسبت به گروه شاهد آزمایشگاهی نشان داده است. از طرف دیگر، بیان ژن VEGFR در دوز۱۰۰و دوز۲۰۰ در این شرایط در مقایسه با نمونه‌های شاهد آزمایشگاهی تغییر کمتری را نشان داده است و احتمال این است که بیان ژن VEGFR با تزریق گلدر وابسته به دوز آن باشد و با افزایش دوز رگ‌زایی در پرده کوریوالانتوئیک رخ داده است (نمودار۶) و (نمودار۸).

[DOI: 10.18502/ssu.v27i6.1603]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 16:20 IRST on Sunday December 6th 2020

نتیجه‌گیری

آنالیز داده‌ها نشان داد که در تمام گروه‌های تجربی تعداد عروق و طول عروق نسبت به شاهد آزمایشگاهی افزایش یافته است که بیانگر اثرات تحریک‌کنندگی آنژیوژنز در این گروه‌ها است. این افزایش در گروه دوز ۲۰۰ و۴۰۰ معنی‌دار بوده است ($P<۰/۰۵$). هم‌چنین بیان ژن VEGFR در تمام گروه‌ها افزایش یافته است که نیاز به مطالعه اعضای این خانواده به تفکیک را ضروری می‌کند. چون در هیچ جنینی دارای اثرات تراتوژنی مشاهده نشد ودوز ۴۰۰ بیشترین بیان ژن نسبت به شاهد آزمایشگاهی را داشت پس عصاره هیدروالکلی گلدر می‌تواند اثر تحریک کننده رگ‌زایی داشته باشد.

سپاس‌گزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد بودو تمام هزینه انجام تحقیق بر عهده دانشگاه آزاد می‌باشد و از هیچ‌گونه حمایت مالی دیگر برخوردار نبود. بدین‌وسیله از همه همکاران گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد واحد مشهد به خاطر همکاری‌های بی‌دریغشان تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض در منافع: تعارض در منافع وجود ندارد و تمامی مسئولیت هر مطلب منتشر شده، شامل صحت و اعتبار تمامی مطالب آن، از جمله مطالب مربوط به اخلاق در پژوهش، بر عهده نویسندگان می‌باشد.

References:

1- Akbarzadeh S, Bazzi P, Daneshi A, Nabipour I, Pourkhalili K, Mohebbi G, et al. ***Anti-Diabetic Effect of Otostegiapersica Extract on Diabetic Rats.*** J Med Plants Res 2012; 6(16): 3176-80.

2- Ayatollahi SAM, Kobarfard F, Asgarpanah J, Choudhary MI. ***Antiglycation Activity of Otostegia Persica (Burm) Boiss.*** Afr J Biotech 2010; 924: 3645–8.

3- Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. ***Vascular Endothelial Growth Factor Family of Ligands and Receptors: Review***. Blood Cell Mol Dis 2007; 38(3): 258-68.

4- Xiao D, Singh VS. ***Phenethyl Isothiocyanate Inhibits Angiogenesis in Vitro and Ex Vivo***. Cancer Res 2007; 67(5): 2239-46.

5- Shakiba Y, Mansouri K, Arshadi D, Rezaei N. ***Corneal Neovascularization: Molecular Events and Therapeutic Options.*** Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov 2011; 3: 221-31.

6- Asghari G, Nourallahi H, Havaie SA, Issa L. ***Antimicrobial Activity of Otostegia Persican Boiss Extracts***. J Pharmaceutical Science 2006; 1: 53-8.

7- Breivogel CS, Sim-Selley LJ. ***Basic Neuroanatomy and Neuropharmacology of Cannabinoids***. Int Rev Psychiatry 2009; 21(2): 113-21.

8- Baharara J, Zafar-Balanezhad S, NejadShahrokhabadi K. ***The Effects of Different Doses of Atorvastatin on Angiogenesis of Chorioallantoic Membrane of Chick Embryo.*** J Shahrekord Univ Med Sci 2012; 14(2): 82-9. [Persian]

9- Carramolino L, Fuentes J, García-Andrés C, Azcoitia V, Riethmacher D, Torres M. ***Platelets Play an Essential Role in Separating the Blood and Lymphatic Vasculatures During Embryonic Angiogenesis***. Circ Res 2010; 106(7): 1197-201.

10- - Zafar Balanezhad S, Parivar K, Baharara J,Mohseni-Koochesfahani H, Ashraf A. ***The Synergic Effects of Rapamycin and Extremely Low Frequency Electromagnetic Field on***

[DOI: 10.18502/ssu.v27i6.1603]
Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 16:20 IRST on Sunday December 6th 2020

Angiogenesis. J Shahrekord Univ Med Sci 2009; 11(3): 70-78.

11- Dallak M, Al-Khateeb M, Abbas M, Elessa R, Al-Hashem F, Bashir N. ***In Vivo, Acute, Normo-Hypoglycemic, Antihyperglycemic, Insulinotropic Actions of Orally Administered Ethanol Extract of Citrulluscolocynthis (L.) Schrab Pulp.*** Am J Biochem Biotechnol. 2009; 5(3): 119-26

12- Barinaga M. Neurobiology. ***How Cannabinoids Work in the Brain***. Science 2001; 291(5513): 2530-1.

13- Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, Ucar M, Irmak MK. ***Protein Oxidation and Lipid Peroxidation after Renal Ischemia-Reperfusion Injury: Protective Effects of Erdosteine and N-Acetylcysteine.*** Urol Res 2006; 34(1): 41-6.

14- Sharififar F, Mozaffarian V, Moradkhani S. ***Comparison of Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of the Essential Oils from Flowers and Fruits of Otostegia Persica Boiss.*** Pak J Biol Sci 2007; 10(21): 3895-9

15- Tavakkol-Afshari J, Brook A, Mousavi SH. ***Study of Cytotoxic and Apoptogenic Properties of Saffron Extract in Human Cancer Cell Lines.*** Food Chem Toxicol 2008; 46(11): 3443-47.

16- Gerald D, Chintharlapalli S, Augustin HG, Benjamin LE. ***Angiopoietin-2: An Attractive Target for Improved Antiangiogenic Tumor Therapy.*** Cancer Res 2013; 73(6): 1649-57.

17- Harris AL. ***Angiogenesis as a New Target for Cancer Control.*** European J Cancer Supplement 2003; 1(2): 1-12.

18- Nangia-Makker P, Conklin J, Hogan V, Raz A. ***Carbohydrate -Binding Proteins in Cancer, and their Ligands as Therapeutic Agents***. Trends Mol Med 2002; 8(4): 187-92

19- .Szentmihályi K, Vinkler P, Lakatos B, Illés V, Then M. ***Rose Hip (Rosa Canina L.) Oil Obtained From Waste Hip Seeds by Different Extraction Methods.*** Bioresource Technology 2002; 82(2): 195–201.

20- Ayatollahi SAM, Kobarfard F, Asgarpanah J, Choudhary MI. ***Antiglycation Activity of Otostegiapersica (Burm) Boiss.*** Afr J Biotech 2010; 924: 3645–8.

21- Sfar S, Saad H, Mosbah F, Chouchane L. ***Combined Effects of the Angiogenic Genes Polymorphisms on Prostate Cancer Susceptibility and Aggressiveness.*** Mol Biol Rep 2009; 36(1): 37-45.

22- Tannin-Spitz T, Grossman S, Dovrat S, Gottlieb H, Bergman M. ***Growth Inhibitory Activity of Cucurbitacin Glucosides Isolated from Citrullus Colocynthis on Human Breast Cancer Cells***. Biochem Pharmaco 2007; 73(1): 56-67.

23- Ysebaert DK, De GreefKE, De Beuf A, Van Rompay AR, Vercauteren S, Persy VP, et al. ***T Cells as Mediators in Renal Ischemia/Reperfusion Injury.*** Kidney Int 2004; 66(2): 491-6.

24- -Yoo HJ, Kang HJ, Jung HJ, Kim K, Lim CJ, ParkEH. ***Anti-Inflammatory, Anti-Angiogenic and Anti-Nociceptive Activities of Saururus Chinensis Extract.*** J Ethnopharmacol 2008; 120(2): 282-6.

25- Muhammad Khalid S, Yulin D,Rongji D. Wei L, Yuhong Y, Zafar L. ***Appraisal of Antinociceptive and Anti- Inflammatory Potential of Extract and Fractions form the Leaves of Torreyagrandis Fort Ex Lindl.*** J Ethnopharmacology 2010; 127(2): 414-8.

[DOI: 10.18502/ssu.v27i6.1603]

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 16:20 IRST on Sunday December 6th 2020

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 27| NO 6 | Sep 2019

Received: 27 May 2018
Accepted: 29 Sep 2018

The Effects of (*Otostegia Persica*) Hydroalcoholic Extract on VEGF Receptor Gene Expression Changes in the Angiogenesis in Chick Chorioalantoic Membrane

Zahra Abasnezhad[1], Maryam Tehranipour[*2], Saidhe azafar Balanezhad[3], Nastaran Amintaheri[4]

Original Article

Introduction: Angiogenesis is the formation of new vessels from early vessels that has effected in pathologic condition such as growing tumor, metastases, arthritis rheumatoid, diabetes and physiologic condition such as developmental and growing of organ regeneration, wound healing, and reproduction. *Otostegia presica* is a member of Laminacea family, has antioxidant and anti-apoptosis properties. The aim of this study was to investigate the effects of hidroalkoholic extract of *Otostegia presica* on VEGFR expression and angiogenesis in chick chorioallantoic membrane.

Methods: In this research, 60 fertilized Ross eggs were used and randomly were divided into five groups, included: control, sham-exposed, and three experimental groups treated with hidroalkoholic extract of *Otostegia presica* doses 100,200,400 mg/kg. On 2nd day of incubation, a window was opened for eggs under sterile condition. On 8th day, a gelatin sponge with 1×4×4 diameter was placed on chorioalantoic membrane (CAM) and extract fractions with dose of 100,200,400 mg/kg were added. On 12th day, length and weight of embryos were measured and CAM photos were captured. Then number and length of vessels in special area on CAM were measured with Image J. software. Sampling was performed for assessment of VEGFR expression. Data were analyzed by t-test and ANOVA and $p<0.05$ was considered significant.

Results: Comparison between mean of length and weight of embryos and number and length of vessels in controls and sham-exposed did not show significant difference ($P>0.05$). Mean of the number of vessels showed significant increase in all experimental groups ($P<0.05$). VEGFR expression has increased in experimental groups rather than sham-exposed group.

Conclusion: The results showed that hidroalkoholic extract of *Otostegia presica* has have angiogenic effects and increased VEGFR expression in all experimental groups.

Keywords: Angiogenesis, *Otostegia presica*, VEGFR, chorioallantoic membrane

Citation: Abasnezhad Z, Tehranipour M, zafar Balanezhad S, Amintaheri N. **The Effects of (*Otostegia persica*) hydroalcoholic extract on VEGF receptor gene expression changes in the angiogenesis in chick chorioalantoic membrane.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2019; 27(6): 1686-1700.

[1]Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran
[2]Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran
[3]Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran
[4]Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran
***Corresponding author: Tel:** 09155110370, **email:** maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir