

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات ضد رگ‌زایی نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده با اسانس گیاه رازیانه
(*Foeniculum vulgare*)محمد شریف‌الحسینی^۱، علی اسحاقی^{۲*}، غلامحسین واعظی^۱، هومن شجیعی^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

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

*مسئول مکاتبات: ashaghi@gmail.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1967416.1424

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۸

چکیده

رگ‌زایی یک فرایند فیزیولوژیکی است که شامل تشکیل رگ‌های خونی جدید از عروق قبلی است. آنژیوژنز، یک فرایند فیزیولوژیکی است که به توسعه و پیشرفت بیماری‌های مختلف از جمله رشد تومور و متاستاز، بیماری‌های قلبی عروقی و التهابی کمک می‌کند. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی رگ‌زایی تومور است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که سطح VEGF و VEGF-R اغلب در بافت‌های تومور تنظیم می‌شود و بیان بیش از حد VEGF رشد و متاستاز تومور را افزایش می‌دهد. هدف این پژوهش سنتز نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و بررسی اثرات ضد رگ‌زایی آن می‌باشد. به منظور بررسی اثرات ضد رگ‌زایی نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس رازیانه، آزمایش بر روی پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه (CAM) استفاده گردید همچنین بیان دو ژن مهم دخیل در فرایند رگ‌زایی یعنی VEGF و رسپتور آن (VEGF-R) به کمک روش Real Time-PCR مورد سنجش قرار گرفت. کاهش میزان رشد عروق خونی در مدل پرده کوریو آلانتوئیک جوجه، اثرات ضد رگ‌زایی نانو ذرات را نشان داد. همچنین داده‌های حاصل Real Time-PCR از کاهش بیان دو ژن VEGF و رسپتور آن (VEGF-R) را تأیید کرد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد استفاده از این فرمولاسیون به دلیل ویژگی‌های آنتی‌آنژیوژنیک؛ نانو ذرات سنتز شده، می‌تواند جهت استفاده در مطالعات درمان سرطان مفید باشد.

کلمات کلیدی: رگ‌زایی، نانو ذرات لیپیدی جامد، اسانس گیاه رازیانه، بیان ژن.

مقدمه

می‌توان آنژیوژنز را یک فرآیند ضروری در فیزیولوژی طبیعی دانست که در صورت عدم تعادل بین فاکتورهای القاء‌کننده و مهارکننده آنژیوژنز به هم خورده و شرایط برای بروز برخی بیماری‌ها به وجود می‌آید (۲۰). در بافت‌های طبیعی عوامل آنتی-آنژیوژنیک بیشتر از عوامل آنژیوژنیک می‌باشد بنابراین

آنژیوژنز یا رگ‌زایی، به معنی تشکیل مویرگ‌های جدید از عروق اولیه است که در حالات مختلف پاتولوژیک از قبیل رشد تومور، متاستاز، آرتريت روماتوئید و همچنین در فرآیندهای فیزیولوژیک مانند رشد و نمو ارگان، ترمیم زخم و تولید مثل دخالت دارد (۸).

یک هدف مولکولی امیدوار کننده در درمان سرطان تبدیل شده است (۲۴).

کاهش تنظیم آنژیوژنز برای جلوگیری از رشد و التهاب نئوپلاستیک مفید می‌باشد رشد و پیشرفت تومور به رگ‌زایی تومور و میزان رشد رگ‌های خونی تومور بستگی دارد، بنابراین هدف قرار دادن رگ‌زایی تومور برای کنترل رشد تومور و یا ایجاد اثر مهار بسیار مهم است (۱۱).

طبیعت منبع مهمی برای ایجاد داروهای جدید است و نقش مهمی در ایجاد عوامل ضدسرطان دارد (۱۳). تحقیقات زیادی در مورد محصولات طبیعی در یافتن مولکول‌های فعال زیستی جدید انجام شده است و مطالعات بیشتر در زمینه فعالیت‌های دارویی این ترکیبات برای درک مکانیسم عملکرد آنها مورد نیاز می‌باشد (۷).

محصولات طبیعی به عنوان عوامل ضد سرطان نقش مهمی دارند و بسیاری از داروهای سیتوتوکسیک که امروزه به صورت بالینی استفاده می‌شوند از گیاهان گرفته می‌شوند (۱۰).

بسیاری از ترکیبات طبیعی که به عنوان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان یافت می‌شوند می‌توانند در درمان سرطان موثر بوده و کمترین اثرات جانبی را اعمال نمایند (۲۳).

با این حال استفاده از برخی از این ترکیبات مانند اسانس‌ها به دلیل حلالیت و دسترسی زیستی پایین محدود می‌باشد. فناوری نانو به عنوان روشی جدید برای حمل داروهای ضد سرطان به عنوان یک درمان امیدوار کننده در سرطان شناخته شده است (۱۵).

نانوذرات اندازه‌ای بین ۱ تا ۱۰۰۰ نانومتر دارند و باعث افزایش حلالیت و فراهمی زیستی دارو می‌شوند. در میان بسیاری از نانو ساختارهای مورد استفاده در آنکولوژی، استفاده از نانو ذرات لیپیدی جامد پیشرفت‌های بزرگی در سال‌های اخیر با توجه

آنژیوژنز رخ نمی‌دهد، عواملی مانند هیپوکسی و موتاسیون در انکوژن‌ها و سرکوب‌کننده‌های تومور که باعث افزایش غلظت فاکتورهای آنژیوژنیک و یا کاهش آنتی‌آنژیوژنیک شوند در این تعادل اختلال ایجاد نموده و آنژیوژنز انجام می‌گیرد (۱۹). یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های اختصاصی رگ‌زایی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی یا (VEGF) است که اثر خود را از طریق فعال کردن دو گیرنده VEGFR-1 و VEGFR-2 به انجام می‌رساند (۱۴). علیرغم تلاش‌های چشمگیر برای درمان سرطان، این بیماری هنوز هم یک علت شایع مرگ در سراسر جهان است. در حال حاضر، جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی تنها گزینه‌های درمانی برای درمان سرطان نیستند (۲۶). رشد تومور به آنژیوژنز بستگی دارد، توسعه و کاربرد بالینی درمان ضد آنژیوژنیک در چندین تومور جامد صورت گرفته است (۹). به غیر از خود تومور، ریز محیط زیست تومور منبع مهمی از مولکول‌های رگ‌زایی است، که نقش مهمی در پیشرفت تومور دارد. از این رو، اثر بالقوه یک درمان ضد رگ‌زایی به دانش آنژیوژنیک تومور و محیط آن بستگی دارد، که می‌تواند از منظر رگ‌زایی ارزیابی شود (۱۲). در شرایط طبیعی فیزیولوژیکی، رگ‌زایی کاملاً با تعادل بین فعال‌کننده‌ها و مهارکننده‌های آنژیوژنیک تنظیم می‌شود، در حالی که رگ‌زایی پاتولوژیک، که توسط یک سوئیچ رگ‌زایی ایجاد می‌شود (عدم تعادل بین مولکول‌های پیشبرنده و ضد رگ‌زایی) برای رشد تومور و متاستاز لازم و بسیار مهم می‌باشد (۵).

فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی رگ‌زایی تومور است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که سطح VEGF و VEGFR2 اغلب در بافت‌های تومور تنظیم می‌شود و بیان بیش از حد VEGF رشد و متاستاز تومور را افزایش می‌دهد. بنابراین، سیگنالینگ از طریق VEGF / VEGFR2 به

در دمای محیط و تشکیل نانو ذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس رازیانه، محلول به دستگاه فریز درای منتقل گردید (۱۷).

بررسی میزان رگ‌زایی با استفاده از پرده کوریوآلاتوییک جوجه (تست CAM): در بررسی حاضر برای بررسی تغییرات میزان رگ‌زایی در پرده کوریوآلاتوییک جنین جوجه در حضور نانو ذرات لیپیدی جامد مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ۵۰ عدد تخم مرغ نژاد ROSS از شرکت مرغداران توس مشهد تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید. در ادامه پوسته تخم مرغ‌ها با پنبه آغشته به الک ۷۰٪ ضد عفونی گردید و نمونه‌ها به ماشین جوجه کشی منتقل شدند. پس از ۴۸ ساعت، تخم مرغ‌ها به زیر هود منتقل شده و منفذ کوچکی (پنجره) در روی پوسته آنها ایجاد گردید، سپس با استفاده از چسب و پارافین منفذ ایجاد شده مسدود گردید. در روز هشتم انکوباسیون، نمونه‌ها مجدداً از انکوباتور به زیر هود منتقل شدند، پنجره‌های مسدود شده مجدداً باز گردید و اسفنج ژلاتینی (تشکیل شده از آلبومین تخم مرغ + آگار + آنتی‌بیوتیک) جهت فراهم نمودن بستری مناسب برای دریافت تیمار بر روی پرده کوریوآلاتوییک قرار گرفت. ۴ روز بعد از تیمار (روز ۱۲ پس از انکوباسیون) نمونه‌ها به زیر هود منتقل شدند. پنجره‌ها با ابعاد بزرگ‌تر باز گردید و با استفاده از استرنو میکروسکوپ از پرده کوریو آلاتوییک در محدوده قرارگیری اسفنج تصویر برداری شد. برای ارزیابی اثرات احتمالی تغییر میزان رگ‌زایی بر وزن و قد جنین‌ها، این فاکتورها با استفاده از ترازو و کولیس دیجیتال بررسی و ثبت شدند (۱۸).

بررسی میزان بیان ژن‌های دخیل در رگ‌زایی: بدین منظور در گام نخست کشت سلول‌ها در فلاسک به مدت ۲۴ ساعت صورت می‌پذیرد. پس از آن تیمار هر فلاسک با غلظت نانو ذرات لیپیدی سنتز شده

به روش‌های تهیه و ترکیبات جایگزین نشان داده است (۲۸).

لذا هدف از این تحقیق؛ فرمولاسیون نانو ذرات لیپیدی جامد بارگذاری شده با اسانس رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و بررسی اثرات ضد رگ‌زایی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد: اسانس رازیانه از شرکت طیب کاشان، استتاریک اسید - فسفاتیدیل کولین یا لیستین، از شرکت سیگما آلدریچ، توین ۸۰ از شرکت مرک آلمان، تخم مرغ نژاد ROSS از شرکت مرغداران توس مشهد، کیت استخراج RNA از شرکت نورژن و کیت سنتز cDNA نورژن و سایبرگرین تهیه شدند.

سنتز نانو ذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس گیاه رازیانه: در این بررسی به منظور تهیه نانو ذرات لیپیدی جامد از اسانس گیاه رازیانه از روش هموژناسیون با فشار کششی بالا و امواج فرا صوت استفاده شد. جهت سنتز نانو ذرات لیپیدی جامد از اسانس گیاه رازیانه، دو فاز لیپیدی و آبی مورد نیاز می‌باشد. فاز لیپیدی مورد استفاده در این بررسی شامل اسید استتاریک و فسفاتیدیل کولین (لیستین) بود که در نهایت اسانس نیز به فاز چربی افزوده شد. فاز آبی نیز شامل توین ۸۰ به همراه آب مقطر دیونیزه بود. به این ترتیب دو فاز آبی و لیپیدی به مدت ۵ دقیقه درون بن ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرند تا هم فاز چربی به صورت مایع تبدیل شود و هم هر دو فاز هم دما شوند. پس از طی زمان انکوباسیون، فاز آبی سریعاً به فاز چربی اضافه شد و در ادامه به منظور حفظ دما، فالكون حاوی ترکیب به داخل بشر حمام آب گرم منتقل گردید. سپس به دستگاه اولتراسونیک (مدل prob sonicator ساخت MSE انگلستان) منتقل شد. پس از قرار گیری مخلوط

حجم ۲۰ میکرولیتر رسانیده شد. در ادامه استریپ‌ها به دستگاه Real Time PCR منتقل شده و میزان بیان ژن‌ها ارزیابی گردید. از GAPDH به عنوان ژن کنترل در این بررسی استفاده گردید. توالی پرایمرهای در جدول ۱ نشان داده شده است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: به منظور بررسی تعداد و طول انشعابات عروق خونی و مقایسه آن با گروه کنترل تمامی تصاویر به کمک نرم‌افزار Image J بررسی شدند. میانگین شاخص اندازه‌گیری شده به کمک نرم‌افزار SPSS با آزمون آماری ANOVA و در سطح معنی‌داری $p < 0/05$ تحلیل شد.

مورد نظر به مدت ۴۸ ساعت انجام می‌گیرد. در گام بعد استخراج RNA تام طبق پروتکل شرکت سازنده کیت صورت می‌پذیرد. در وهله بعد سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده کیت انجام می‌پذیرد و انجام Real Time PCR با استفاده از سایبرگرین صورت می‌گیرد. به منظور ارزیابی بیان ژن‌های مختلف باید از RNA به عنوان الگو برای سنتز cDNA استفاده نمود و در نهایت از cDNA سنتز شده جهت بررسی بیان ژن‌ها در واکنش Real Time PCR استفاده کرد. برای انجام این تکنیک، واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که شامل ۱۰ میکرولیتر سایبرگرین، یک میکرولیتر cDNA، ۲ میکرولیتر پرایمر اختصاصی می‌باشد که با آب مقطر دیونیزه به

جدول ۱- توالی پرایمرهای مربوط به ژن‌های مورد بررسی

GAPDH (Forward)	TGCTGGTGCTGAGTATGTGC
GAPDH (Reverse)	GCATGTCAGATCCACAACGG
VEGF-A(Forward)	GACCTGTAAATGTTCTGCAA
VEGF-A (Reverse)	AGAAATCAGGCTCCAGAAACA
VEGFR-2 (Forward)	TCACGCCTTACAGACACCCT
VEGFR-2 (Reverse)	AGGGAGATGTTACGGAGAATG

نتایج

طوریکه در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، تعداد و انشعابات رگ‌ها به شدت کاهش پیدا کرده است. **بررسی میانگین طول عروق خونی:** نتایج مربوط به بررسی میانگین طول عروق خونی در نمونه‌های تیمار شده با نانوذرات در مقایسه با شاهد و شاهد آزمایشگاهی در نمودار ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌گردد بین گروه شاهد و شاهد آزمایشگاهی تفاوت آماری وجود ندارد. اما در نمونه‌های تیمار شده با نانوذرات سنتز شده کاهش چشمگیری در میانگین طول عروق خونی مشاهده می‌گردد. در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر طول

بررسی تغییرات مورفولوژیک رگ‌زایی: همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است در نمونه‌های شاهد (که هیچ تیماری بر روی آن انجام نگردیده است) و شاهد آزمایشگاهی (که نانو ذرات بدون اسانس به آن اضافه گردیده است) میزان رگ‌ها در مقایسه با نمونه‌های تیمار شده با نانو ذرات لیپیدی سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه، بیشتر می‌باشد. با تیمار پرده‌های کوریوآلانتوییک با نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه، همانطور که مشاهده می‌گردد رگ‌های ضعیف‌تری تشکیل شده است؛ به

عروق خونی ۳۸/۷۱ میلی‌متر گزارش شده است که در مقایسه با کنترل (۴۳/۸۹ میلی‌متر) کاهش معنی‌داری $p < 0/01$ * نشان داده است. با افزایش غلظت تیمار به ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، میانگین طول عروق به ۳۶/۹۲ و ۳۱/۱۷ میلی‌متر کاهش یافته است ($p < 0/01$ **) که نشان دهنده اثرات مهار تیمار انجام شده توسط نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه بر رشد عروق خونی در پرده کوریوآلتوییک جوجه می‌باشد و اثرات ضد رگ‌زایی نانو ذرات سنتز شده را تایید می‌کند.

بررسی میانگین تعداد عروق خونی: بررسی تعداد عروق خونی در دو گروه کنترل و کنترل آزمایشگاهی هیچگونه تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. در حالیکه مقایسه تعداد عروق در گروه‌های تجربی در مقایسه با شاهد، کاهش معنی‌داری $p < 0/001$ *** را در هر سه غلظت مورد بررسی نشان می‌دهد. به طوریکه تعداد عروق در غلظت‌های ۲۵، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۳۵/۴۷، ۳۰/۹۷ و ۲۸/۵۲ گزارش شده است که در مقایسه با تعداد عروق در گروه شاهد (۴۱/۲) تفاوت معنی‌داری می‌باشد. به طور کلی کاهش میانگین تعداد عروق خونی در گروه‌های تیمار شده با نانوذرات در مقایسه با گروه‌های تیمار نشده، نشان دهنده اثرات ضد رگ‌زایی نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه سنتز می‌باشد.

بررسی میزان بیان ژن VEGF: بررسی میزان بیان ژن VEGF به عنوان یکی از مهمترین ژن‌های درگیر در پروسه رگ‌زایی در پرده‌های کوریوآلتوییک تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانو ذرات سنتز شده در مقایسه با شاهد نشان می‌دهد که بیان ژن در نمونه‌های تیمار شده کاهش معنی‌داری نشان داده است و در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان بیان در حدود ۴۰ درصد کاهش

نشان داده است $p < 0/05$ * و با افزایش غلظت به ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر؛ کاهش در حدود (به ترتیب) ۷۲ درصد ($p < 0/05$ *) و ۹۱ درصد ($p < 0/001$ ***) مشاهده می‌گردد که نشان دهنده اثرت ضد رگ‌زایی نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه با اعمال مهار بر بیان ژن VEGF به عنوان ژن درگیر در پروسه رگ‌زایی می‌باشد (نمودار ۳).

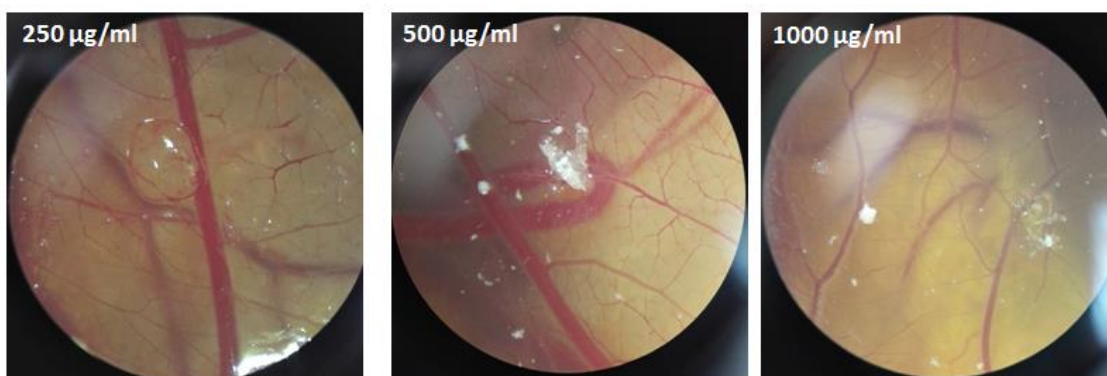
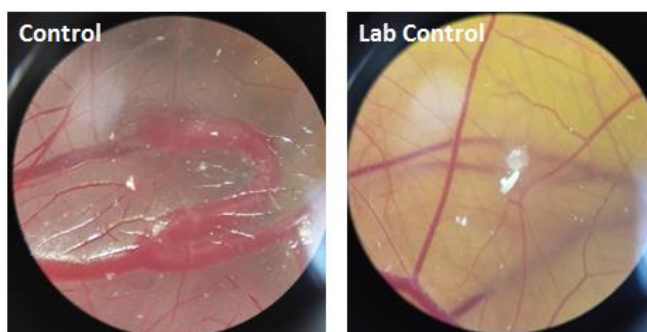
بررسی میزان بیان ژن VEGF-R: نمودار ۴ تغییرات بیان ژن VEGF-R را در نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با نمونه شاهد نشان می‌دهد. ژن VEGF-R از دیگر ژن‌های مهم در پروسه رگ‌زایی به شمار می‌رود که به عنوان گیرنده برای فاکتورهای VEGF عمل می‌نماید. بنابراین مهار این ژن نیز؛ می‌تواند اثر ضد رگ‌زایی نانو ذرات را به خوبی نشان دهد. همانطور که در نمودار نشان داده شده است در هر سه غلظت تیمار شده با نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه، میزان بیان ژن VEGF-R در حدود ۹۰ درصد کاهش را نشان می‌دهد که از نظر آماری معنی‌دار $p < 0/001$ *** می‌باشد.

بررسی فاصله سر تا نشیمنگاه در جنین‌ها: از آنجا که تغییر در میزان رگ‌زایی در طی رشد و نمو جنینی می‌تواند تغییراتی را در جنین در حال رشد ایجاد نماید؛ لذا در این بررسی تغییرات طول و وزن جنین‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی اندازه فاصله سر تا نشیمنگاه یا به عبارتی طول جنین‌ها نشان داد که هیچگونه تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و شاهد آزمایشگاهی وجود ندارد (نمودار ۵). اما مقایسه این فاکتور در نمونه‌های تجربی تیمار شده با نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده با اسانس گیاه رازیانه در مقایسه با شاهد، کاهش معنی‌داری را در دو غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد. در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر

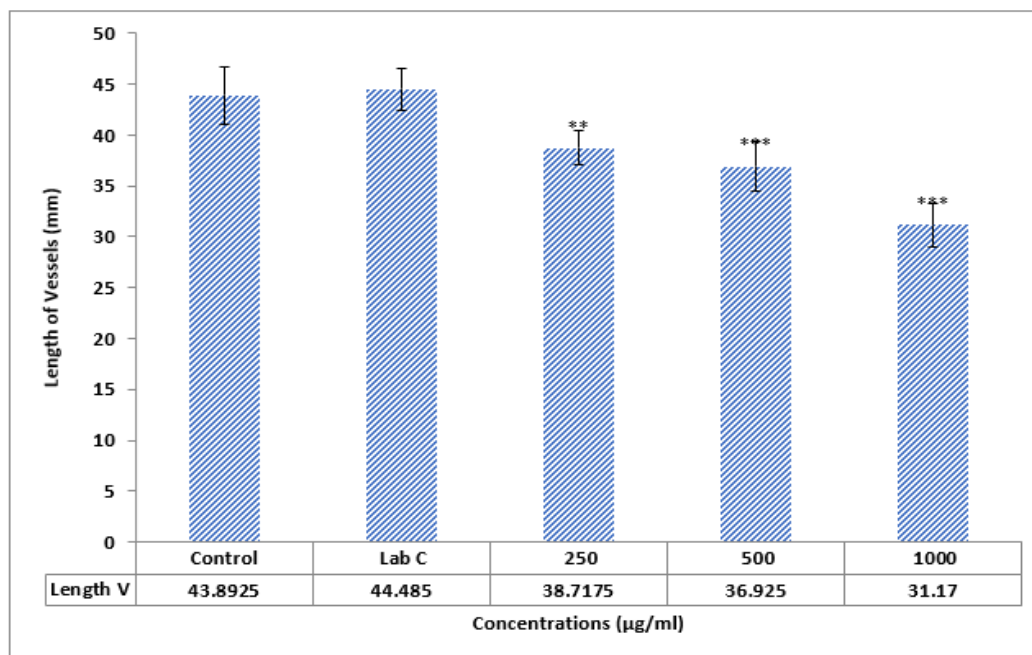
تجربی تیمار شده با نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه در مقایسه با شاهد، کاهش معنی‌داری در وزن جنین‌ها مشاهده شد (نمودار ۶). در جنین‌های تیمار شده با غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، وزن جنین‌ها به ۳/۵۳ گرم کاهش یافت $p < ۰/۰۵$ در حالی که با افزایش غلظت تیمار به ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر این شاخص (به ترتیب) به ۳/۱۲ و ۳/۱۷ گرم کاهش یافت $p < ۰/۰۰۱$ که نشان‌دهنده اثرات مهاری نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه بر رشد جنین‌های تیمار شده می‌باشد.

میلی‌لیتر، کاهش معنی‌داری در ارتباط با طول جنین‌ها در مقایسه با شاهد مشاهده نشد. اما با افزایش غلظت به ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر طول جنین‌ها از ۳۸/۳۷ میلی‌متر به ۳۴/۷۲ میلی‌متر کاهش یافت که از نظر آماری معنی‌دار $p < ۰/۰۱$ می‌باشد. با افزایش غلظت تیمار به ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، کاهش طول به ۳۳/۲۷ میلی‌متر رسید که این میزان کاهش از نظر آماری به صورت $p < ۰/۰۰۱$ گزارش می‌گردد.

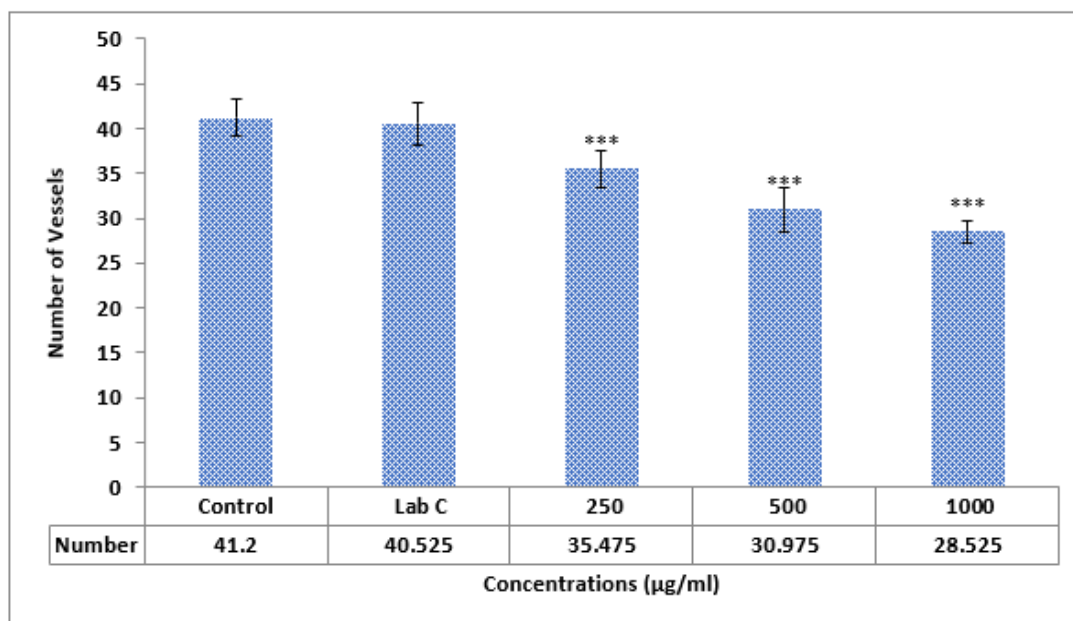
بررسی وزن جنین‌ها: بررسی تغییرات وزن جنین‌ها نشان داد که در دو گروه شاهد و شاهد آزمایشگاهی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد؛ اما در گروه‌های



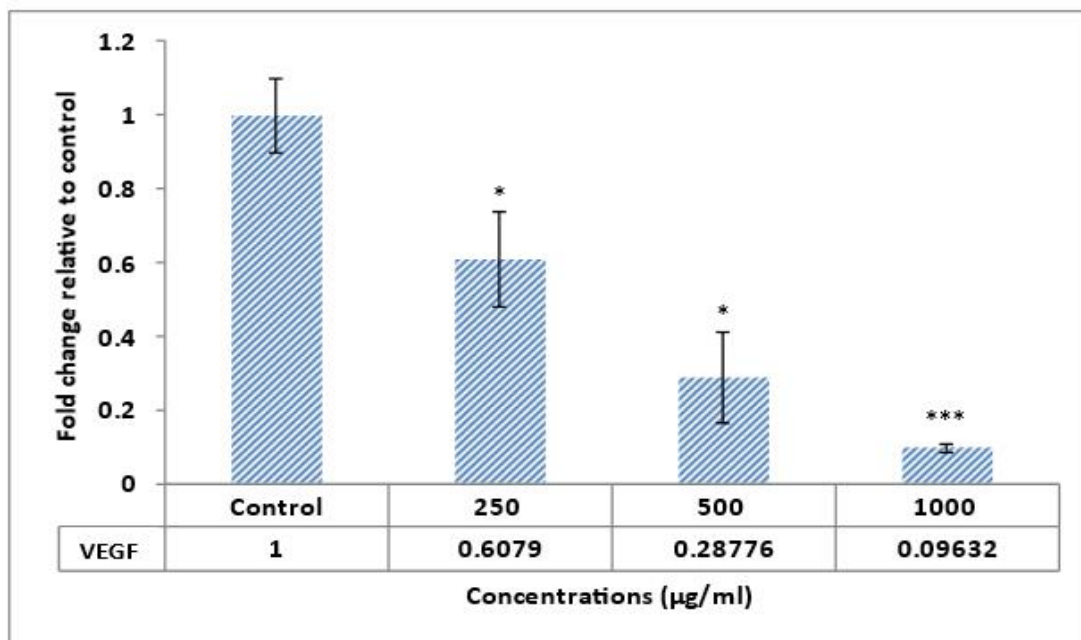
شکل ۱- تغییرات مورفولوژیک رگ زایی در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه در مقایسه با شاهد (که هیچ تیماری بر روی آن انجام نگردید است) و شاهد آزمایشگاهی (که نانو ذرات بدون اسانس بدن اضافه گردیده است) در روز چهارم پس از تیمار توسط استرئو میکروسکوپ مدل نیکون



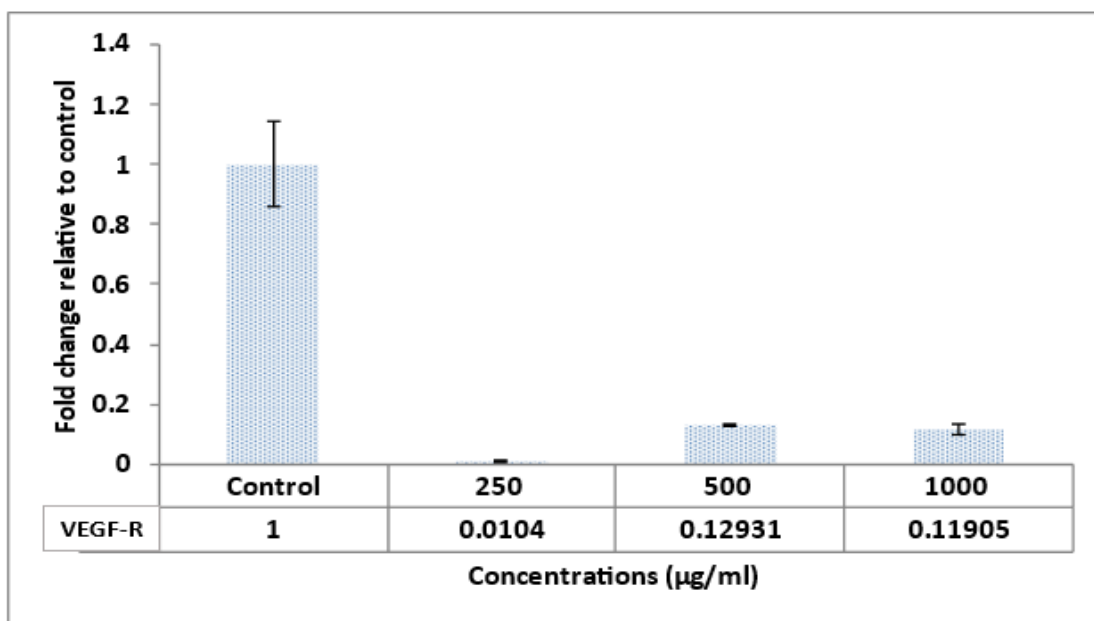
نمودار ۱- میانگین طول عروق خونی در نمونه‌های تیمار شده با نانو ذرات در مقایسه با شاهد و شاهد آزمایشگاهی. $p < 0.001$ ***
 $p < 0.01$ ** و



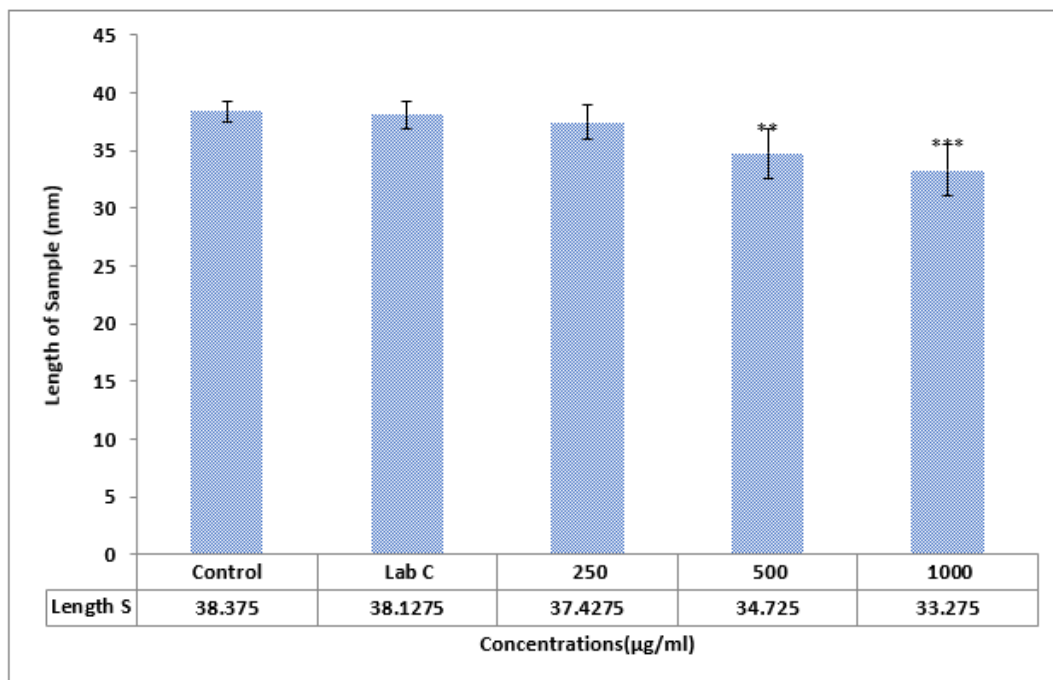
نمودار ۲- بررسی میانگین تعداد عروق خونی در نمونه‌های تیمار شده با نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه در مقایسه با شاهد و شاهد آزمایشگاهی. تعداد عروق در گروه‌های تجربی در مقایسه با شاهد، کاهش معنی‌داری $p < 0.001$ *** را در هر سه غلظت مورد بررسی نشان می‌دهد.



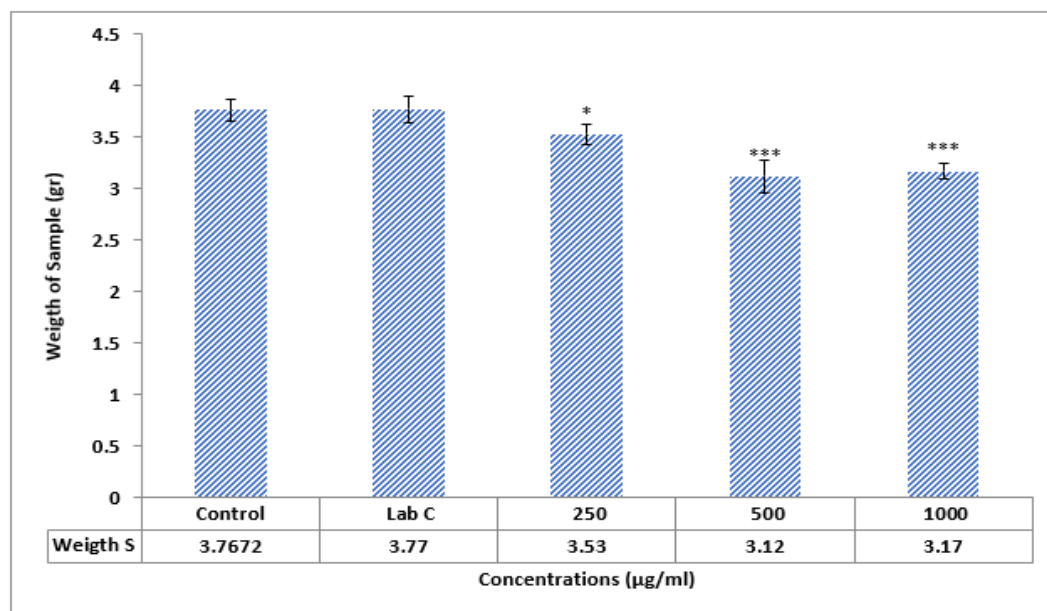
نمودار ۳- تغییرات بیان ژن VEGF در نمونه های تیمار شده با نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه در مقایسه با شاهد. * $p < 0.001$ و $p < 0.05$.



نمودار ۴- تغییرات بیان ژن VEGF-R در نمونه های تیمار شده با نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه در مقایسه با شاهد. $p < 0.001$. در هر سه غلظت تیمار شده با نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه، بیان ژن VEGF-R حدود ۹۰ درصد کاهش را نشان می‌دهد.



نمودار ۵- تغییرات فاصله سر تا نشیمنگاه (طول جنین) در جنین‌های نمونه‌های تیمار شده با نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه در مقایسه با شاهد و شاهد آزمایشگاهی. هیچگونه تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و شاهد آزمایشگاهی وجود ندارد. اما مقایسه این فاکتور در نمونه‌های تجربی تیمار شده با نانو ذرات لیپیدی در مقایسه با شاهد، کاهش معنی‌داری را در دو غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد ($p < 0.01$ و $p < 0.001$).



نمودار ۶- تغییرات وزن جنین‌ها در نمونه‌های تیمار شده با نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه در مقایسه با شاهد و شاهد آزمایشگاهی. $p < 0.05$ و $p < 0.001$. تغییرات وزن جنین‌ها نشان داد که در دو گروه شاهد و شاهد آزمایشگاهی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد اما در گروه‌های تجربی تیمار شده با نانو ذرات لیپیدی جامد سنتز شده توسط اسانس گیاه رازیانه در مقایسه با شاهد، کاهش معنی‌داری در وزن جنین‌ها مشاهده شد.

بحث

متداول تبدیل شده است. مدل CAM یکی از قدرتمندترین و محبوب‌ترین ابزارها برای تجزیه و تحلیل پتانسیل رگ‌زایی ترکیبات مختلف است. CAM در اثر هم آمیختگی لایه‌های مزددرمی دو ساختار آلانتوئیس و کوریون جنین پرندگان ایجاد می‌شود و به عنوان یک شاخص ایده آل بررسی خاصیت ضد رگ‌زایی ترکیبات آزمایشگاهی عمل می‌کند (۱۷). ما در بررسی حاضر از روش CAM به منظور بررسی اثرات ضد رگ‌زایی نانو ذرات سنتز شده استفاده نمودیم و نتایج مطالعه نشان داد نانو ذرات سنتز شده قادرند سبب مهار تشکیل و رشد عروق خونی در نمونه‌های تیمار شده شوند که قابل مقایسه با مطالعات انجام شده در این زمینه می‌باشد. در یک بررسی در سال ۲۰۱۵، نانو ذرات لیپیدی جامد بارگذاری شده با داروی bevacizumab که دارای اثرات ضد سرطانی می‌باشد سنتز گردیدند و نانو ذرات حاصل برای ارزیابی اثرات رگ‌زایی با روش تشکیل تیوپ در سلول‌های بند ناف جنینی تیمار شده مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج این بررسی اثرات ضد رگ‌زایی نانو ذرات بارگذاری شده را تایید نمود (۳). در سال ۲۰۲۱ اثرات ضد رگ‌زایی نانوذرات لیپیدی حاوی عصاره کلپوره را بر فرآیند رگ‌زایی بررسی شد. تحقیقات این گروه نشان داد که این نانوذرات لیپیدی توانایی بالایی در مهار رگ‌زایی در پرده کوریوآلتوتوئیک جنین جوجه دارند (۲۲). نانوذرات لیپیدی جامد بارگذاری شده با پاکلیتاکسل (PTX) تأیید کردند که توانایی ضد رگ‌زایی PTX را در شرایط *in vitro* و *in vivo* بهبود می‌بخشد (۲). رگ‌زایی در تومور به VEGF بستگی دارد، بسیاری از رده‌های سلولی توموری در *In vitro* VEGF ترشح می‌کنند. تولید VEGF و رسپتورش (VEGF-R) به‌طور مستقیم میزان رگ‌زایی در تومور را کنترل

امروزه افزایش مقاومت سرطان‌ها نسبت به درمان‌های رایج مشکل ساز شده است، مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به داروهای شیمیایی منجر به کاهش سطح پاسخ این سلول‌ها نسبت به دارو در نتیجه شکست اقدامات درمانی می‌شود. بنابراین، تحقیق و توسعه داروهای موثرتر و یا با اثرات جانبی کمتر، از اهمیت زیادی برخوردار است (۲۵). همچنین درمان با عوامل ضد رگ‌زایی می‌تواند زمینه امید بخشی را در این خصوص فراهم کند (۶). پدیده تشکیل عروق خونی جدید از رگ‌های قبلی، که به عنوان رگ‌زایی شناخته می‌شود، فرآیند مهمی است که در بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیکی از جمله رشد جنینی، ترمیم زخم، التهاب و ارگانوژنز درگیر است (۲۱). از طرف دیگر رشد تومور و متاستاز نیز؛ به رگ‌زایی بستگی دارد. بنابراین، هدف قرار دادن رگ‌زایی می‌تواند یکی از استراتژی‌های مهم برای جلوگیری از رشد تومور و حمله به بافت‌ها باشد (۶). مطالعات در مورد مهارکننده‌های رگ‌زایی در حیوانات نشان داد که می‌توان با مهار رگ‌زایی در تومور آن را تخریب و نابود نمود. این روش سمیت کمتری دارد و بسیاری از عوارض جانبی که در اثر شیمی درمانی به‌وجود می‌آیند. بسیاری از ترکیبات ضد رگ‌زایی که اکنون در مرحله آزمایشات کلینیکی قرار دارند، ترکیبات طبیعی هستند (۲۷). تولید دارو از فرآورده‌های طبیعی به‌سرعت در حال رشد و توسعه می‌باشد، این ترکیبات استراتژی بسیار امید بخش برای شناسایی عوامل ضد رگ‌زایی و ضد سرطان می‌باشند (۱). سیستم‌های مختلف مدل حیوانی، از ماهی گورخر گرفته تا موش، برای مطالعه روند رگ‌زایی و مشاهده اثرات عوامل ضد رگ‌زایی ایجاد شده است (۴) و از این میان سنجش میزان رگ‌زایی غشای پرده کوریوآلتوتوئیک جوجه به یک روش انتخابی و

وزن اعمال نمایند. کاهش بیان ژن VEGFR نیز اثرات ضد رگ‌زایی نانوذرات سنتز شده را تایید نمود. به نظر می‌رسد نانوذرات لیپیدی جامد سنتز شده از اسانس رازیانه با ویژگی ضد رگ‌زایی می‌تواند به منظور استفاده بالقوه به عنوان یک داروی ضد سرطان بیشتر مورد بررسی قرار گیرد. استفاده از مدل‌های حیوانی دیگر و همچنین مطالعات مولکولی قطعاً می‌تواند یافته‌های حاصل از این مطالعه را بیشتر تأیید نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد دامغان و دانشگاه آزاد مشهد جهت همکاری در جهت انجام این تحقیق کمال تشکر و سپاسگزاری را دارند. هیچگونه تعارض منافی بین نویسندگان وجود ندارد.

منابع

1. Al-Abd A.M., Alamoudi A.J., Abdel-Naim A.B., Neamatallah T.A., Ashour O.M. 2017. Anti-angiogenic agents for the treatment of solid tumors: potential pathways, therapy and current strategies—a review. *Journal of Advanced Research*, 8: 591-605.
2. Banerjee I., De K., Mukherjee D., Dey G., Chattopadhyay S., Mukherjee M., Mandal M., Bandyopadhyay A.K., Gupta A., Ganguly S. 2016. Paclitaxel-loaded solid lipid nanoparticles modified with Tyr-3-octreotide for enhanced anti-angiogenic and anti-glioma therapy. *Acta Biomaterialia*, 38: 69-81.
3. Battaglia L., Galliarate M., Peira E., Chirio D., Solazzi I., Giordano S.M.A., Gigiotti C.L., Riganti C., Dianzani C. 2015. Bevacizumab loaded solid lipid nanoparticles prepared by the coacervation technique: preliminary in vitro studies. *Nanotechnology*, 26: 255102.
4. Beedie S.L., Diamond A.J., Fraga L.R., Figg W.D., Vargesson N. 2017.

می‌کنند، به‌علاوه افزایش میزان VEGF باعث افزایش تولید میکرووزل‌های بین توموری در سرطان سینه می‌گردد. در این مطالعه مشخص شد که نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس رازیانه میزان بیان ژن این دو را کاهش می‌دهد که خاصیت آنتی‌آنژیوژنیک نانوذره بیشتر تأیید می‌شود. از آنجا که رگ‌های خونی منبع تغذیه و عرضه اکسیژن هستند، از اینرو برای زندگی ضروری هستند و نقش مهمی را در روند رشد و توسعه ایفا می‌کنند. بنابراین عروق کوچک در گروه درمان شده با نانوامولسیون‌ها ممکن است به خاطر کاهش تغذیه و عرضه اکسیژن مسئول مرگ جنین‌ها و یا کاهش قد و وزن جنین باشند.

نتیجه‌گیری

برای مهار پیشرفت و متاستاز تومور و سلول‌های هدف رگ‌زایی تراپی روش مناسبی است، در این نوع درمان (سلول‌های اندوتلیال) نسبت به عوامل درمانی حساسیت بیشتری دارند و از طرف دیگر امکان مقاوم شدن به درمان در این سلول‌های طبیعی بسیار اندک است. همچنین در بالغین رگ‌زایی به‌ندرت به‌صورت نرمال دیده می‌شود بنابراین استفاده از این روش برای درمان تومور که رگ‌زایی به‌صورت گسترده در آن رخ می‌دهد عوارض جانبی کمتری دارد و از آنجایی‌که مانع از رسیدن مواد غذایی به سلول‌های توموری می‌شود موجبات مرگ این سلول‌ها را نیز فراهم می‌نماید. از طرف دیگر ضرورت مطالعات بیشتر در زمینه فرآورده‌های طبیعی ضد رگ‌زایی و همچنین مسیرهای مولکولی که منجر به مهار رگ‌زایی می‌شود کاملاً محسوس است. اثر نانوذرات سنتز شده بر رگ‌زایی با روش CAM تأیید گردید نتایج نشان داد نانوذرات قادرند میانگین طول و تعداد عروق خونی را در نمونه‌های تیمار شده کاهش دهند و به دنبال آن اثرات مهار بر فاکتورهای رشد جنین از قبیل قد و

- physiology and pathophysiology. *Endokrynologia Polska*, 62: 444-455.
15. Kashyap D., Tuli H.S., Yeper M.B., Sharma A., Sak K., Srivastava S., Pandey A., Garg V. K., Sethi G., Bishayee A. Natural product-based nanoformulations for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Seminars in Cancer Biology*, 2021: 5-23.
 16. Mangir N.I., Dikici S., Clayessens F., Macneil S. 2019. Using ex ovo chick chorioallantoic membrane (CAM) assay to evaluate the biocompatibility and angiogenic response to biomaterials. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 5: 3190-3200.
 17. Naik M., Brahma P., Dixit M. 2018. A cost-effective and efficient chick ex-ovo CAM assay protocol to assess angiogenesis. *Methods and Protocols*, 1: 19.
 18. Naseri, N., Valizadeh H., Zakeri-Milani P. 2015. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5: 305.
 19. Papetti M., Herman I.M. 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282: C947-C970.
 20. Rana S., Burke S.D., Karumanchi S.A. 2020. Imbalances in circulating angiogenic factors in the pathophysiology of preeclampsia and related disorders. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 226(2S):S1019-S1034.
 21. Risau W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386: 671-674.
 22. Roumi S., Tabrizi M.H., Eshaghi A., Abbasi N. 2021. Teucrium polium extract-loaded solid lipid nanoparticles: A design and in vitro anticancer study. *Journal of Food Biochemistry*, 45: e13868.
 23. Seca A.M., Pinto D.C. 2018. Plant secondary metabolites as anticancer agents: Vertebrate embryos as tools for anti-angiogenic drug screening and function. *Reproductive Toxicology*, 70: 49-59.
 5. Bergers G., Benjamin L.E. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 3: 401-410.
 6. Bhattarai P., Hameed S., Dai Z. 2018. Recent advances in anti-angiogenic nanomedicines for cancer therapy. *Nanoscale*, 10: 5393-5423.
 7. Cragg G.M., Pezzuto J.M. 2016. Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Medical Principles and Practice*, 25: 41-59.
 8. Felmeden D., Blann A., Lip G. 2003. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *European heart journal*, 24: 586-603.
 9. Folkman J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New england journal of medicine*, 285: 1182-1186.
 10. Fridlender M., Kapulnik Y., Koltai H. 2015. Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. *Frontiers in Plant Science*, 6: 799.
 11. Gacche R.N., Meshram R.J. 2014. Angiogenic factors as potential drug target: efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1846: 161-179.
 12. Gout S., Huot J. 2008. Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenvironment*, 1: 69-83.
 13. Hua F., Shang S., Hu Z.W. 2017. Seeking new anti-cancer agents from autophagy-regulating natural products. *Journal of Asian Natural Products Research*, 19: 305-313.
 14. Kajdaniuk D., Marek B., Borgiel-Marek H., Kos-Kudla B. 2011. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-part 1: in

future perspectives. *Nature reviews Clinical oncology*, 12: 115-124.

27. Yadav L., Puri N., Rastogi V., Satpute P., Sharma V. 2015. Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors: a review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9: XE01.

28. Yadollahi R., Vasilev K., Simovic S. 2015. Nanosuspension technologies for delivery of poorly soluble drugs. *Journal of Nanomaterials*, 16375:1-13.

successes in clinical trials and therapeutic application. *International journal of molecular sciences*, 19: 263.

24. Shibuya M. 2011. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti-and pro-angiogenic therapies. *Genes and Cancer*, 2: 1097-1105.

25. Vasan N., Baselga J., Hyman D.M. 2019. A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575: 299-309.

26. Wyld L., Audisio R.A., Poston G.J. 2015. The evolution of cancer surgery and

Anti-Angiogenic Effects of Synthesized Solid Lipid Nanoparticles Containing *Foeniculum vulgare* Essential Oil

Mohammad Sharifalhosseini¹, Ali Eshaghi^{2*}, Gholamhassan Vaezi¹, Hooman Shajiee¹

1- Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

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

Abstract

Angiogenesis is a physiological process that involves the formation of new blood vessels, contributing to the development and progression of various diseases, including metastatic cancers, cardiovascular diseases, and inflammatory conditions. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the main regulators of tumor angiogenesis. Studies show that VEGF and its receptor (VEGF-R) are often upregulated in tumor tissues, and the overexpression of VEGF increases tumor growth and metastasis. This research aimed to synthesize solid-lipid nanoparticles containing *Foeniculum vulgare* essential oil and investigate its anti-angiogenic effects. For this purpose, the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) was used, and the expression of two important genes involved in the angiogenesis process, VEGF and VEGF-R was assessed using Real-Time PCR. The results showed a decrease in the growth rate of blood vessels in the CAM model, indicating the anti-angiogenic effects of the nanoparticles. Also, Real Time-PCR confirmed a decrease in the expression of the VEGF and VEGF-R genes. The results of this study showed that solid-lipid nanoparticles containing *Foeniculum vulgare* essential oil had anti-angiogenic properties and; therefore, can be useful agents for treating cancer.

Keywords: Angiogenesis, Solid Lipid Nanoparticles, *Foeniculum vulgare* Essential Oil, Gene Expression.