فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی ۲۱، جلد ۶ شماره ۲، بهار ۹۲، صفحه ۲۱ تا ۲۶

بررسی اثر دفروکسامین بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه

آتنا دشتی زاده[۱]، **جواد بهارآرا[۲]**، سعیده ظفربالانژاد[۳]، خدیجه شاهرخ آبادی[۴]

۱– دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی، کارشناسی ارشد سلولی تکوین جانوری، مشهد. ایران.

۲– دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی، دانشیار بیولوژی تکوین جانوری، مشهد. ایران. baharara@yahoo.com

۳– دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی، مربی بیولوژی تکوین جانوری، مشهد. ایران.

٤– دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی، استادیار ژنتیک، مشهد. ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۱٦

چکیده

زمینه و هدف:دفروکسامین یک شلاته کننده آهن بوده که در درمان بیماری‌های مسمومیت با آهن،مورد استفاده قرار گرفته و بر فرآیند آنژیوژنز نیز موثر می‌باشد. هدف از این پژوهش بررسی اثر دفروکسامین بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه است.

روش کار: ٤۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار نژاد ROSS در ٤ گروه شاهد، شاهد آزمایشگاهی ۱، تجربی ۱ و۲ که به ترتیب، با دفروکسامین ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولتیمار یافته تقسیم شدند. در روز هشتم انکوباسیون، اسفنج ژلاتینی بر روی پرده کوریوآلانتوئیک قرار داده شد که در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ به ترتیب با ۱۰ میکرولیتر، دفروکسامین۱۰ میکرو مول و ۱۰۰ میکرومول آغشته گردید. روز دوازدهم، تعداد و طول انشعابات عروقی در تمام نمونه‌ها به کمک نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری و اطلاعات به‌دست آمده به کمک نرم‌افزار SPSS توسط آزمون‌های آماری t و ANOVA در سطح P< ۰/۰۵ تحلیل گردید.

یافته‌ها: میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در نمونه‌های گروه شاهد آزمایشگاهی۱ نسبت به گروه شاهد، اختلاف معنی‌داری نداشت (p> ۰/۰۵). میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در گروه تجربی ۱، نسبت به گروه شاهد، کاهش معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). میانگین تعداد انشعابات عروقی در گروه تجربی ۲ نسبت گروه شاهد کاهش معنی‌دار داشت (P< ۰/۰۵) ، اما میانگین طول انشعابات عروقی در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه شاهد، کاهش معنی دار نشان نداد (p> ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: دفروکسامین ، دارای اثرات مهاری بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی:آنژیوژنز، دفروکسامین، پرده کوریوآلانتوئیک.

مقدمه

آنژیوژنز، تشکیل رگ‌های خونی توسط جوانه‌زدن و منشعب شدن از رگ‌هایی که قبلاً وجود داشته، می‌باشد و یک روند اساسی است که برای رشد ارگان جدید و تمایز در طی جنین‌زایی،رشد و ترمیم مورد نیاز است(۷). رگ‌زایی در حالت‌های مختلف پاتولوژیک از قبیل رشد، متاستاز تومور، آرتریت روماتوئید و همچنین در فرآیندهای فیزیولوژیک مانند رشد و نمو اندام، ترمیم زخم و تولید مثل نقش مهمی دارد(۱۱). محققان بر این عقیده‌اند که برای القای آنژیوژنز در شرایط فیزیولوژیک یا پاتولوژیک که مشتمل بر مراحل متعددی است کاهش فشار اکسیژن (hypoxia) در بافت از اهمّیّت زیادی برخوردار می‌باشد (۱۶). در چنین شرایطی بافت دچار هیپوکسی اقدام به سنتز و رهاسازی فاکتورهای آنژیوژنیک همچون فاکتور رشد سلول‌های آندوتلیال(VEGF) می‌کند(۱۹). این فاکتورها پس از اتصال به گیرنده‌های خود بر روی سلول‌های آندوتلیال منجر به فعال شدن آن‌ها می‌شوند با شروع فعالیت آندوتلیال، انواع خاصی از متالوپروتئینازها از سلول‌های فوق ترشح می‌شوند و غشای پایه را در منطقه مذکور تجزیه نموده و با هضم غشای پایه، سلول‌های آندوتلیال

اقدام به مهاجرت و تکثیر می‌نمایند. علاوه بر این، ملکول‌های اتصالی از قبیل اینتگرین α7β5 وα3β7 نیز به فرآیند کشیدن و جلو رفتن جوانه‌های رگ‌های خونی در حال رشد کمک می‌نمایند. در مراحل بعدی فرآیند آنژیوژنز، متالوپروتئینازهای ماتریکس (MMP2) جهت تجزیه ماتریکس خارج سلولی و آغاز بازسازی مجدد آن تولید می‌شوند سپس با برهم‌کنش آنژیوپوئیتین Tie-2 فرآیند تشکیل لوله آغاز می‌گردد در مرحله بعد، EphB-ephrin B نیز تنظیم فرآیند تشکیل لوله‌ها را بر عهده گرفته و در نهایت پری سیت‌ها و سلول‌های ماهیچه‌ای صاف برای پایدار کردن رگ خونی تازه تشکیل شده به این ساختار اضافه می‌شوند(۱۵). از دیگر فاکتورهای مهم آنژیوژنیک دیگر می‌توان فاکتور رشد فیبروبلاستی، آنژیوپویتین و فاکتور رشد مشتق از پلاکت را نام برد (۱۴). دفروکسامین یک شلاته کننده آهن است و از باکتری اکتینوباکتراسترپتومایسزپیلوسوس مشتق شده است و با یون‌های آهن کمپلکس تشکیل می‌دهد و برای درمان بیماری‌های مسمومیت با آهن مانند هماتوکروماتوز، تالاسمی،سندرم دیسپلازی میلوئیدو آنمی آپلاستیک استفاده می‌شود(۸). نام تجاری دفروکسامین مسیلاتDesefral می‌باشد (۱). این دارو بر آنژیوژنز نیز تاثیر می‌گذارد و با کاهش آهن باعث القائ فاکتور هیپوکسی از طریق مهار آنزیم پرولیل ۴- هیدروکسیلاز شده و در نهایت سبب افزایش بیان VEGF می‌شود(۲). Chatsonو همکارانش نیز نشان دادند که کاهش آهن توسط شلاته کننده‌های آهن از جمله دفروکسامین، در برخی از سلول‌های سرطانی، منجر به بیان متفاوت تعدادی از مولکول‌های دخیل در سیکل سلولی.می‌شود و در نتیجه با کمبود آهن، آپوپتوز القائ می‌گردد، طبق گزارش این محقق، توانایی دفروکسامین برای مهار رشد، به اهمیت زیاد آهن در مسیرهای متابولیکی حیاتی مختلف مانند سنتز DNAو تولید ATP، برمی‌گردد (۴). هدف از این‌پژوهش بررسی اثر دفروکسامین با غلظت های ۱۰ و ۱۰۰ میکرو مول بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه است.

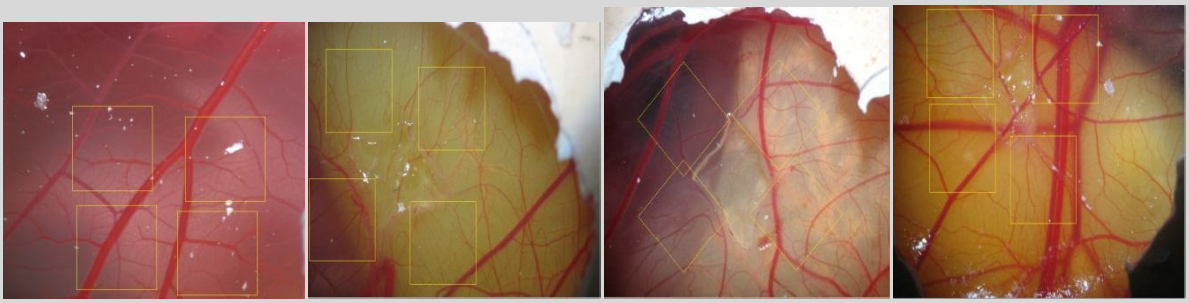
مواد و روش‌ها

این پژوهش تجربی در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست شناسی تکوین جانوری گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شد. جهت انجام این پژوهش، از تخم مرغ‌های نطفه‌دار نژاد ROSS که از شرکت مرغداران طوس مشهد تهیه شده بود، به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده گردید. ۴۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار نژاد ROSS به طور تصادفی در ۴ گروه مساوی توزیع شدند. این گروه ها شامل گروه شاهد، گروه شاهد آزمایشگاهی(تیمار با نرمال سالین)، گروه های تجربی ۱(تیمار با دفروکسامین ۱۰میکرومول) و ۲ (تیمار با دفروکسامین۱۰۰ میکرومول) می باشند. تخم مرغ‌ها در دستگاه جوجه کشی در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۵-۵۵ درصد (دستگاه جوجه‌کشی تحقیقاتی ۵۸ خانه ساخت هلند) قرار گرفتند. در روز دوم انکوباسیون در شرایط کاملاً استریل ایجاد شده توسط هود لامینار (Telstroa, Spain)، بخشی از پوسته تخم مرغ‌ها برداشته و توسط لامل و پارافین استریل پنجره‌ای روی تخم مرغ‌ها ایجاد گردید. سپس تخم مرغ‌ها به انکوباتور برگردانده شد. روز هشتم انکوباسیون، پنجره‌ها در شرایط استریل برداشته و روی پرده کوریوآلانتوئیک جوجه‌ها یک اسفنج ۴×۴ میلی متر قرار داده شد. این اسفنج ژلاتینی (مرکب از آلبومین سفیده تخم مرغ و محلول آگار در نرمال سالین به نسبت مساوی بود) به صورت تازه در شرایط استریل تهیه می‌شود. در روز هشتم انکوباسیون، به نمونه‌های گروه‌های تجربی ۱ مقدار ۱۰ میکرولیتر دفروکسامین۱۰ میکرومول و در گروه تجربی ۲ مقدار ۱۰ میکرولیتر دفروکسامین ۱۰۰ میکرومول به اسفنج ژلاتینی گروه های تجربی افزوده

گردید(پودر دفروکسامین محلول در ۱۰۰ سی سی نرمال سالین) و پس از آن بار دیگر محل پنجره‌ها پوشانده و تخم مرغ‌ها به انکوباتور برگردانده شدند. تشکیل پرده کوریوآلانتوئیک از روز پنجم انکوباسیون شروع می‌شود و در روز هشتم بیش از نیمی از وسعت درون تخم مرغ‌ها را اشغال می‌کند. در این روز قلب کاملاً تشکیل شده است و جدایی خون سیاهرگی و سرخرگی اتفاق افتاده است.از این رو تیمار شبکه عروقی در روز هشتم انکوباسیون می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. در روز دوازدهم، از تمام نمونه‌ها از محدوده محل قرارگیری اسفنج ژلاتینی و از ۴ طرف آن، به کمک فوتواسترئومیکروسکوپ تحقیقاتی(Ziess Germany) تصاویری با درشت نمایی ۴× ۱۰× ۰/۶۵ تهیه شد. داده-های مورد بررسی شامل تعداد و طول انشعابات عروقیاست که به کمک نرم افزارJ Image در یک مونیتور ۱۵ اینچ برای تمام نمونه‌ها اندازه‌گیری و اطلاعات به دست آمده به کمک نرم افزار SPSS توسط آزمون‌های t و ANOVA و تعقیبی دانکن در سطح ۰/۰۵ > P تحلیل گردیدند.

نتایج

در تحلیل آماری اختلاف معنی‌داری ما بین میانگین تعداد (۱۱/۲۶۲ ± ۶۵/۷۵) و طول (۳۱/۶۸۸ mm ±۲۲۲/۷۴) انشعابات عروقی گروه شاهد نسبت به میانگین تعداد (۱۶/۱۴۸ ± ۶۱/۶۱) و طول (۲۸/۶۱۲ mm± ۲۱۸/۹۲) انشعابات عروقی شاهد آزمایشگاهی مشاهده نشده است(p>۰/۰۵). کاهش معنی داری در میانگین تعداد(۱۲/۱۰۱±۴۷/۲۵) و طول (۲۳/۷۳۱mm±۱۸۶/۰۷)انشعابات عروقی گروه تجربی ۱ نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید(p=۰/۰۲۷). نیز میانگین تعداد انشعابات عروقی (۱۷/۲۱۴ ± ۴۴/۵۲) گروه تجربی ۲ نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری داشت (p=۰/۰۰۶). اما متوسط طول انشعابات عروقی نمونه‌های گروه تجربی ۲ نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت (p>۰/۰۵) (نمودار ۱ و ۲) (شکل ۱).



شکل ۱-شبکه عروقی پرده کوریوآلانتوئیکدر روز هشتم انکوباسیون گروه شاهد، شاهد آزمایشگاهی (تیمار با نرمال سالین)، گروه تجربی۲(تیمار با دفروکسامین ۱۰میکرومول)، تجربی ۲(تیمار با دفروکسامین ۱۰۰ میکرومول).

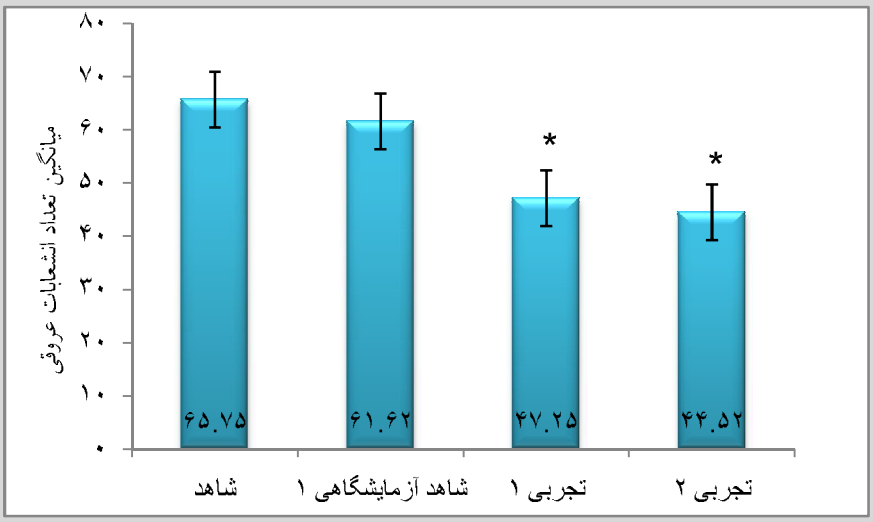
بحث و نتیجه گیری

نتایج به‌دست آمده در بررسی اثر دفروکسامین بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه، مؤید اثر مهار رگ‌زایی توسط دفروکسامین ۱۰ و ۱۰۰ میکرومول است. این نتیجه به صورت کاهش معنی دار در تعداد و طول انشعابات عروقی در نمونه‌های تیمار شده

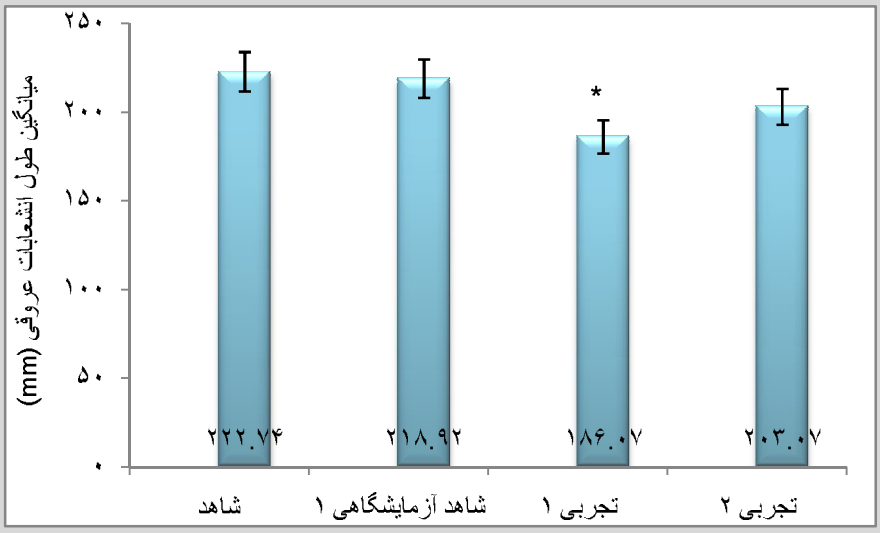
با دفروکسامین با غلظت ۱۰ میکرومول و ۱۰۰ میکرومول می باشد.آنژیوژنز به رشد و تکامل عروق خونی جدید از

طریق جوانه زدن سلول‌های آندوتلیال عروق موجود گفته می‌شود (۱۸). فرآیند رگ‌زایی، به فعل و انفعالات توسط پپتیدها و فاکتورهای تعدیل کننده‌ی متنوعی کنترل می‌شود (۱۰). فاکتور پروآنژیوژنیک VEGF نقش مهمی در آنژیوژنز بازی می‌کند. VEGF و گیرنده‌های آن میانجی‌های کلیدی آنژیوژنز هستند و نیز اهدافی برای چندین عامل فارماکولوژیکی می‌باشند (۱۷). دفروکسامین، از جمله شلاته کننده‌های آهن است که برای درمان بیماری‌های Iron overload (آهن بیش از حد)، استفاده می‌شود. براساس گزارشات Ikeda و همکارانش، دفروکسامین، دارای اثرات پیش رگ‌زایی بوده و منجر به تحریک رشد عروق جدید می‌شود. دفروکسامین با فسفریلاسیون eNOS از طریق مسیر PI3K-AKT منجر به تکثیر سلول آندوتلیال، مهاجرت و تمایز آن‌ها می‌گردد(۸).

وسیع بین سلول‌ها و ملکول‌های مختلفی وابسته است و



نمودار ۱- مقایسه‌ی میانگین تعداد انشعابات عروقی در گروه‌های تیمار شده($p<۰/۰۵$).



نمودار ۲ – مقایسه‌ی میانگین طول انشعابات عروقی در گروه‌های مختلف ($p<۰/۰۵$).

لازم به ذکر است که در مطالعه Ikeda اثرات دفروکسامین در شرایط in vivoو بر روی رت و به صورت تزریق روزانه دارو و در شرایطin vitroبر رویسلول‌های آندوتلیال آئورت انسان مورد بررسی قرار گرفته است. نتیجه به‌دست آمده از پژوهش حاضر در زمینه اثرات دفروکسامین بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه (در شرایط in vivo و تزریق در روز هشتم انکوباسیون) با نتیجه Ikeda مغایرت دارد(۸). در پژوهشی دیگر گزارش شده است که دفروکسامین آپوپتوز را توسط مکانیسم ناپایدار کردن غشای میتوکندری و آزاد کردن سیتوکروم c و فعال کردن کاسپازها، القائ می‌کند. هم‌چنین بیان کردند که مسیر P38 MAPk فعال شده توسط دفروکسامین، در مرگ سلولی سلول‌های تومور HL60 دخالت داشته است (۱۲). به نظر می‌رسد توقف مرحله G1/S، بعد از شلاته شدن آهن توسط دفروکسامین، به دلیل توانایی دفروکسامین در مهار ریبونوکلئوردوکتاز می‌باشد که از تولید دزوکسی ریبونوکلئوتیدها برای سنتز DNA جلوگیری می‌کند (۶). مطالعات دیگری نیز بیان‌گر آن است که دفروکسامین در سلول‌های توموری با کاهش آهن باعث توقف مرحله G1/S و آپوپتوز می‌شود، به این دلیل که سلول‌های توموری نسبت به سلول‌های نرمال، بیشتر به کمبود آهن حساس هستند، به‌علاوه سطح بالاتری از ریبونوکلئوردوکتاز (RR) را برای سنتز DNA بیان می‌کنند(۱۳). چندین بررسی بالینی دیگر نیز فعالیت ضدتوموری دفروکسامین را در سلول‌های متعددی از جمله نوروبلاستوما، لوسمی، سرطان مثانه و هپاتوکارسینوما و سرطان سینه نشان داده است(۵). محققین پیشنهاد کردند که دفروکسامین، رشد سلول‌های سرطانی تخمدان را توسط مهار کردن تکثیر و القا آپوپتوز مهار می‌کند(۳). پژوهش‌گر دیگری در یک بررسی نشان داد که دفروکسامین در بیماری فیبروز کبدی، سبب کاهش بیان ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP) و سبب القائ آپوپتوز با کاهش بیان Bcl2 و آزادسازی سیتوکروم c از میتوکندری به سیتوسل شده و فعالیت کاسپازها را افزایش می‌دهد (۹). از آن‌جا که در پژوهش حاضر، محلول دفروکسامین منجربه کاهش رگ‌زایی شده است به نظر می‌رسد نتایج پژوهش ما، هم راستا با نتایج تحقیقات متعدد دانشمندان در خصوص اثرات ضد تکثیری دفروکسامین بوده و تیمار بر پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه احتمالاً از طریق مهار سنتز DNA در سلول‌های آندوتلیال عروق، از تکثیر سلولی و رگ‌زایی ممانعت کرده است. بر اساس این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که دفروکسامین بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه، اثر مهاری دارد. به طوری‌که این تأثیر به صورت کاهش معنی‌دار در میانگین تعداد و طول عروق خونی نمونه هایی که تحت تیمار با دفروکسامین قرار گرفته اند، در مقایسه با نمونه های شاهد، مشاهده شده است.

تشکر و قدردانی

با تشکر از مدیر گروه محترم زیست شناسی و معاونت اداره دارو و غذا دانشکده علوم پزشکی و همکاران محترم آزمایشگاه تحقیقات تکوین جانوری که در انجام این پروژه همکاری نمودند.

منابع

۱–خدام، رامین.(۱۳۸۶). داروهای ژنریک ایران، ویرایش پنجم، تهران، انتشارات دیباج،۲۷۶

2.Asikainen, TM., Ahmad, A., Schneider, BK. (2005). Stimulation of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and VEGF by prolyl 4-hydroxylase inhibition in human lung endothelial and epithelial cells. Free Radic Biol Med, 38; 1002–1013.

3.Brard, L., Granai, C. O., Swamy, N. (2006). Iron chelators deferoxamine and diethylenetriamine pentaacetic acid induce apoptosis in ovarian carcinoma. Gynecologic Oncology, 100; 116–127.

desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311. Clinical Cancer Research, 9; 402– 414.

5.Dayani, P. N., Maria, C. B., Keith, B., Paul, M. Z. (2004). Desferoxamine mediated iron chelation: rationale for a novel approach to therapy for brain cancer. Journal of Neuro-Oncology, 67; 367–377.

6.Effie, N.T., Fu, D., Phang, J.M., Richardson, D.R. (2007). Iron chelation regulates cyclin D1expressionvia the proteasome: a link to irondeficiency–mediated growthsuppression . Blood.J, 109(9); 4045-4054.

7.Folkman, J. (2003). Fundamental concepts of the angiogenic process. Curr Mol Med, 3(7); 643–651.

8.Ikeda, Y., Tajima, S., Yoshida, S. (2011). Deferoxamine promotes angiogenesis via theactivation of vascularendothelial cell function. Atherosclerosis, 215; 339 –347.

9.Jin, H., Terai1, S., Sakaida, I. (2007). The iron chelator deferoxamine causesactivatedhepatic stellate cells to become quiescent and to undergo apoptosis. J Gastroenter,42; 475–484.

10. Karamysheva, A. F. (2008). Mechanisms of angiogenesis. Biochemistry, 73; 751-762.

11. Khazaei, M., Amgadei, F., Salehei, E. (2011). Angiogenesis in health and disease :role of vascular endothelial growth factor (VEGF). J Isfahan Med Sch, 132 (29); 1-14.[Persian].

12. Kim, B.S., Yoon, K.H., Oh, H.M., Choi, E.Y. (2002). Involvement of p38 MAP kinase during iron chelator-mediated apoptotic cell death. Cellular Immunology J, 220; 96–106.

4.Chaston, T. B., Lovejoy, D. B., Watts, R. N., Richardson, D. R. (2003). Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: multiple cellular targets and the different mechanism of action of triapine compared with

13. Le, N. T., Richardson, D. R. (2004). Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation. Blood J, 104(9); 2967-2975.

14. Makrilia, N., Lappa, T., Xyla, V., Nikolaidis, I. (2009). The role of angiogenesis in solid tumours: An overview. European Journal of Internal Medicine, 20; 663 –671.

15. Mansouri, K., Mostafaie, A., Mohammadi Motlagh, H. (2010). Angiogenesis and tumor biology. Journal" improve", Kermanshah University of Medical Sciences, 14(4); 315-305.

16. Martinez, A. (2006). A new family of angiogenic factors. Cancer Lett, 236; 157-163.

17. Otrock, Z., Makarem, J. A., Shamseddine, A. I. (2007a). Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. Blood Cells, Molecules and Diseases, 38; 258 – 268.

18. Otrock, Z.K., Mahfouz, R. A., Makarem, J. A., Shamseddin, A. I. (2007b). Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. Blood cells, Molecules, and diseases, 39; 212-220.

19. Otrock, Z. K., Hatoum, H. A., Awada, A. H., Ishak, R. S., Shamseddine, AI. (2009). Hypoxia-inducible factor in cancer angiogenesis: Structure, regulation and clinical perspectives. Critical Reviews inOncology/Hematology,70; 93–102.