مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ٦، شماره ٢، تابستان ١٣٩٤، ٢١٢-٢٠٥

اثر کاربرد توام عصاره الکلی پای *Chiton lamyi* و بافت سلول زدایی شده مغز موش صحرایی بر رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین مرغ خانگی

جواد بهارآرا Ph.D.[1*]، ناصر مهدوی شهری Ph.D.[2]، فریده نامور Ph.D.[3]، سعیده طالبی M.Sc.[4]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، مشهد، ایران
۲- دانشگاه فردوسی مشهد، گروه زیست شناسی، مشهد، ایران
۳- مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی (تکوین جانوری)، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، مشهد، ایران
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی سلولی تکوینی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، مشهد، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: baharara@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۴

چکیده

هدف: در این مطالعه اثر کاربرد توام عصاره پای کیتون *Chiton lamyi* و بافت سلول زدایی شده مغز موش صحرایی بر رگ‌زایی در پرده کوریوالانتوئیک جنین مرغ بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۷۰ عدد تخم مرغ نطفه دار نژاد راس در هفت گروه در ده تکرار شامل: ۱. کنترل، ۲. تیمار DMSO، ۳. تیمار با بافت مغز سلول زدایی شده، ۴. تیمار با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی پای کیتون، ۵. ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی پای کیتون، ۶. تیمار توام با بافت سلول زدایی شده مغز و غلظت۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره، و ۷. تیمار توام با بافت سلول زدایی شده مغز و غلظت۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره تقسیم شدند. همه تخم مرغ‌ها به‌مدت هشت روز در دستگاه جوجه‌کشی قرار داده شدند و در روز هشتم تیمار انجام شد. سپس در روز دوازدهم با فتواستریو میکروسکوپ عکس‌برداری شدند. تعداد و طول انشعابات عروقی در محل تیمار روی پرده کوریوآلانتوئیک با نرم افزار Image J بررسی شد. داده‌ها توسط نرم افزار SPSS با آزمون ANOVA صورت گرفت ($P<۰/۰۵$).

نتایج: نتایج نشان داد که تیمار با عصاره پای کیتون و همچنین تیمارهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره پای کیتون و بافت سلول زدایی شده مغز رت موجب کاهش معنی‌دار تعداد و طول انشعابات عروقی در مقایسه با گروه‌های کنترل و تیمار DMSO گردیدند ($P<۰/۰۵$).

نتیجه گیری: استفاده توام بافت سلول زدایی شده مغز رت و عصاره پای کیتون دارای اثر مهاری بر رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه می‌باشد.

واژگان کلیدی: رگ‌زایی، پرده کوریوآلانتوئیک، کیتون

مقدمه

سرطان بعد از بیماری‌های قلبی عروقی دومین عامل شایع مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و سومین عامل مرگ در کشورهای کمتر توسعه یافته است (۱). سرطان وابسته به فرآیند رگ‌زایی است، این مفهوم باعث شده است که کنترل رگ‌زایی تومور یکی از راه‌های درمانی امیدوار کننده در بحث سرطان شناسی باشد (۲). برای چندین دهه است که رگ‌زایی به‌عنوان یک رویداد مهم در رشد و متاستاز تومور در نظر گرفته می شود، در واقع مفهوم تغییر رگ زایی (Angiogenic Switch)، که به موجب آن تومور توانایی رشد و انتشار فراتر از محل اولیه خود را به‌دست می آورد، یکی از اجزای اصلی در درک ما از سرطان است (۳) .

رگ‌زایی روند تشکیل مویرگ‌های جدید از عروق پیشین است که نقش مهمی در وقایع فیزیولوژیک و پاتولوژیک و همچنین انواعی از بیمارهای مزمن دارد (۴). در پدیده رگ‌زایی مراحل متعددی وجود دارد و عوامل خارجی متعدد اثرات متفاوتی را در هر کدام از این مراحل می‌توانند اعمال کنند. برای مثال رگ‌زایی می‌تواند توسط هیپوکسی آغاز شود (۵). یک عامل محرک مهم رگ‌زایی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی است، همچنین فاکتور رشد اندوتلیال عروقی سلول‌ها را برای تولید متالوپروتئینازهای ماتریکس که غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی اطراف آن را تخریب می‌کنند، تحریک می‌کند (۶) . مهار رگ‌زایی نه تنها در مورد سرطان‌ها بلکه در بسیاری از بیماری‌ها از جمله آرتریت روماتوئید، رتینوپاتی دیابتی و حتی در مواردی از چاقی نیز موثر می‌باشد (۷). نخستین شواهد آنژیوژنز ناشی از تومور در شرایط درون تنی با استفاده از مدل پرده کوریوالانتوئیک مورد بررسی قرار گرفت (۸). با این‌حال، استفاده از آن برای بررسی مواد آنژیوژنیک و آنتی آنژیوژنیک در طی سه دهه اخیر محبوب بوده است (۹).

پرده کوریو آلانتوئیک جنین جوجه یک لایه خارج جنینی است و به‌عنوان یک سطح تبادل گاز و عمل‌کرد آن که توسط یک شبکه مویرگی پشتیبانی می‌شود، عمل می‌کند. از آنجا که عروق گسترده و دسترسی آسان است برای مطالعه جنبه‌های مورفولوژیک و عمل‌کردی فرآیند رگ‌زایی در شرایط درون تنی و برای مطالعه اثر و مکانیسم عمل مولکول‌های پرو و آنتی آنژیوژنیک مورد استفاده قرار گرفته است (۱۰). در درمان سرطان با روش شیمیایی نکته قابل توجه، مقاومت اکتسابی تومور به اینگونه داروهاست و این مسئله مشکلات عمده‌ای را در درمان سرطان به‌وجود آورده است، در صورتی‌که مهار رگ‌زایی توسط مواد طبیعی باعث ایجاد مقاومت دارویی نمی‌شود و یا مقاومت کمتری ایجاد می‌کند (۱۱). در چند سال اخیر ماتریکس سلول زدایی شده با موفقیت برای جایگزینی و ترمیم پوست (۱۲)، مثانه (۱۳)، مجرای پیشاب، روده کوچک (۱۴) و نقص‌های ماهیچه‌های اسکلتی (۱۵) مورد استفاده قرار گرفته است.

با وجود سرعت یافتن کشف دارو های ضد سرطان از منابع دریایی، ما شاهد یک شکاف عظیم میان اکتشاف و به‌کارگیری این ترکیبات در مراحل گوناگون کار آزمایی‌های بالینی هستیم (۱۶). خلیج فارس و دریای عمان یکی از منابع بسیار غنی از جانوران دریایی است و یکی از این منابع مهم، کیتون‌ها هستند که پوسته و محتوی بدن آن‌ها حاوی ترکیبات موثر در فرآیندهای زیستی است و حتی بومیان آفریقایی پای کیتون را به‌صورت خوراکی مصرف می‌کنند، لذا در پژوهش حاضر برای اولین بار اثر کاربرد عصاره الکلی بافت پای کیتون Lamyi chiton و بافت سلول زدایی شده مغز موش صحرایی بر رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه بررسی شده است.

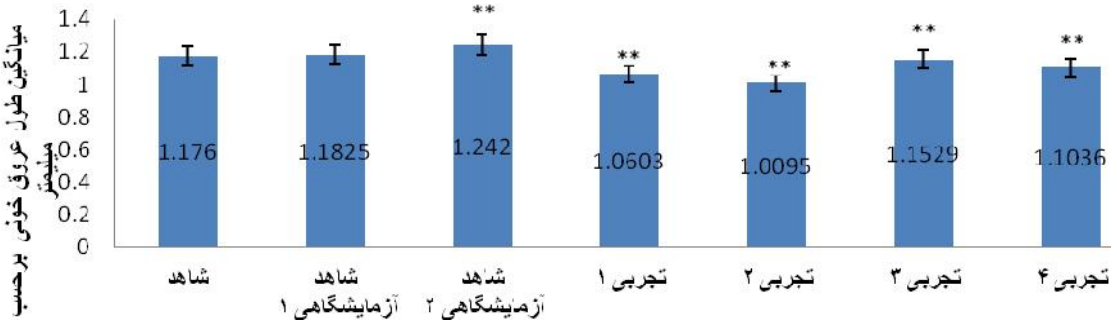
مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شد. تعداد ۷۰ عدد تخم مرغ نطفه دار نژاد Ross، که از شرکت مرغداران طوس خریداری شده بود، در ۷ گروه مساوی به‌صورت تصادفی به‌شرح ذیل توزیع شدند. این گروه‌ها شامل: شاهد (نگه‌داری در شرایط طبیعی) و شاهد آزمایشگاهی ۱ (تیمار با DMSO)، شاهد آزمایشگاهی ۲ (تیمار با بافت مغز سلول زدایی شده رت) و گروه‌های تجربی ۱ و ۲ (تیمار با غلظت‌های به‌ترتیب ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره پای کیتون) و گروه‌های تجربی ۳ و ۴ (تیمار توام بافت سلول زدایی شده مغز و عصاره پای کیتون با غلظت‌های به‌ترتیب ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به‌صورت تصادفی توزیع شدند. نمونه‌ها در روز نخست در دستگاه جوجه‌کشی (Digital Egg Incubator , korea) با دمای ۳۷ تا ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰ تا ۶۵ درصد قرار گرفتند. در روز دوم انکوباسیون، در شرایط کاملا

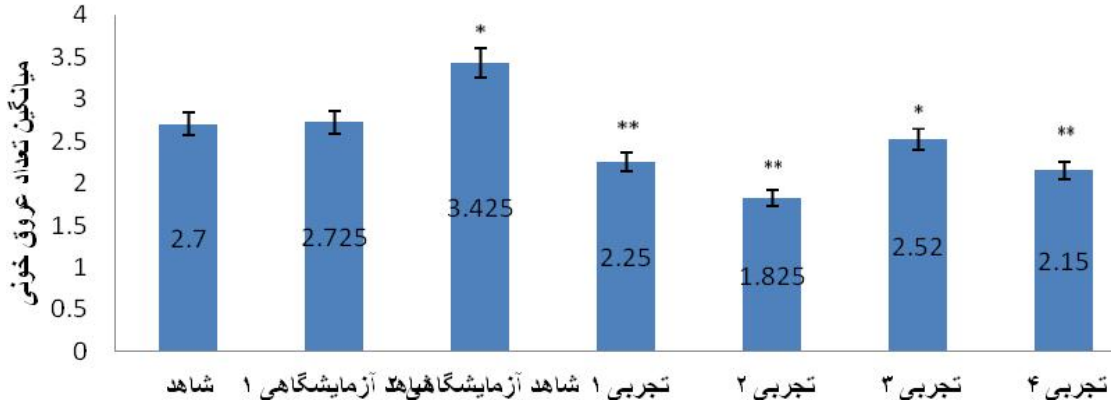
استریل ایجاد شده توسط هود لامینار (Shimi Pajouh , Iran) بخشی از پوسته تخم مرغ‌ها برداشته شده و توسط لامل و پارافین استریل) (Merck , Germany) پنجره ای روی یک طرف تخم مرغ‌ها ایجاد گردید. سپس تخم مرغ‌ها به انکوباتور (Memmert , Germany) برگردانده شدند و در روز هشتم انکوباسیون پنجره‌ها در شرایط استریل برداشته شده و روی پرده کوریوآلانتوییک جوجه‌ها برای گروه تجربی ۱ و ۲ یک اسفنج ژلاتینی (مرکب از آلبومین سفیده تخم مرغ و پنی‌سیلین استرپتومایسین و محلول آگار در نرمال سالین که به‌صورت تازه در شرایط استریل تهیه می‌شد) به ابعاد ۱×۴×۴ میلی‌متر قرار داده شد و برای گروه تجربی ۳ و ۴ بافت سلول زدایی شده مغز رت (با قرار گرفتن مغز رت در فریزر ۴- سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت و فریزر ۲۰- سانتی‌گراد به‌مدت ۱ ساعت و با استفاده از SDS (0.5%) و 1 unit Dnase ۱۰۰۰ هر کدام به‌مدت ۱۰ ساعت) قرار داده شد. سپس با غلظت‌های مورد نظر عصاره (عصاره گیری از بافت پای کیتون به‌روش غوطه وری ۱۰ درصد جرمی – حجمی با استفاده از حلال متانول انجام شد) و رعایت شرایط استریل تیمار شدند و محل پنجره مجددا پوشانیده و تخم مرغ‌ها به انکوباتور برگردانده شدند. در روز دوازدهم انکوباسیون از تمام نمونه‌ها به‌کمک فتومیکروسکوپ تحقیقاتی (Ziess , Germany) عکس تهیه و تعداد و طول انشعابات عروقی در محل تیمار روی پرده کوریوآلانتوئیک به‌کمک نرم افزار Image J بررسی و توسط نرم افزار SPSS و آزمون ANOVA نتایج در سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ تحلیل شد .

نتایج

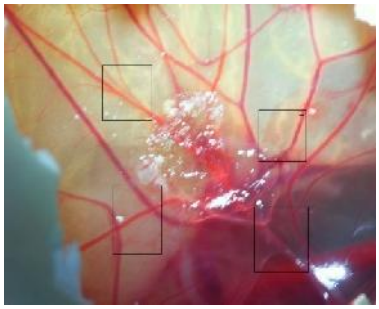
نتایج حاصل از اندازه گیری میانگین تعداد در گروه شاهد (۲/۷۰±۰/۳۴)، شاهد آزمایشگاهی۱ (۲/۷۲±۰/۹۴) و طول انشعابات عروقی در گروه شاهد (۶/۰۴ ±۱/۱۷ میلی‌متر) با شاهد آزمایشگاهی۱ (۱/۱۸±۲/۵۱ میلی‌متر) تفاوت معنی‌دار نشان نداد ($p<۰/۰۵$). میانگین تعداد در گروه شاهد (۲/۷۰±۰/۳۴)، شاهد آزمایشگاهی ۲ (۳/۴۲±۰/۱۳) و طول انشعابات عروقی در گروه شاهد (۶/۰۴ ±۱/۱۷ میلی‌متر) با شاهد آزمایشگاهی ۲ (۱/۲۴±۰/۹۱ میلی‌متر) تفاوت معنی‌دار نشان داد ($p<۰/۰۵$). تیمار با عصاره الکلی بافت پای کیتون موجب کاهش معنی‌دار تعداد عروق برای غلظت ۱۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر (۲/۲۵±۰/۰۶)، غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر (۱/۸۲±۰/۰۶) و طول عروق برای غلظت ۱۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر (۱/۰۶±۲/۳۹ میلی‌متر)، غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱/۰۰±۲/۴۴ میلی‌متر) در مقایسه با شاهد و شاهد آزمایشگاهی ۱ دیده شد ($p<۰/۰۵$). تیمار توام نمونه‌ها با بافت سلول زدایی شده مغز رت نیز موجب کاهش معنی‌دار در تعداد عروق برای غلظت ۱۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر (۲/۵۲±۰/۰۷)، غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۲/۱۵±۰/۰۷) و طول عروق برای غلظت ۱۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر (۱/۱۶ ± ۱/۱۵ میلی‌متر)، غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱/۷۱ ± ۱/۱۰ میلی‌متر) در مقایسه با شاهد و شاهد آزمایشگاهی ۲ دیده شد ($p<۰/۰۵$). (نمودار ۱ و ۲) و شکل ۱.



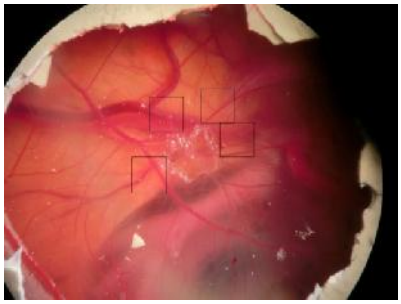
نمودار ۱: میانگین طول عروق خونی برحسب میلی‌متر در گروه‌های شاهد و شاهد آزمایشگاهی ۱ (تیمار با DMSO) ، شاهد آزمایشگاهی ۲ (استفاده از بافت سلول زدایی شده مغز رت) و گروه‌های تجربی ۱ و ۲ (تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره پای کیتون) و گروه‌های تجربی ۳ و ۴ (تیمار توام بافت سلول زدایی شده مغز رت و غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره پای کیتون). GGاختلاف معنی‌دار گروه‌ها در مقایسه با گروه شاهد در سطح $p<۰/۰۰۱$.



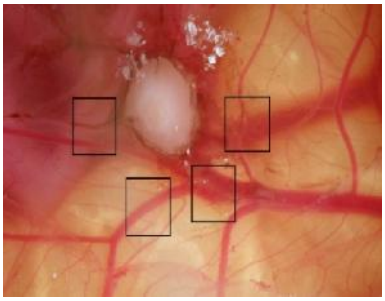
نمودار ۲: میانگین تعداد عروق خونی در گروه‌های شاهد و شاهد آزمایشگاهی ۱ (تیمار با DMSO) ، شاهد آزمایشگاهی ۲ (استفاده از بافت سلول‌زدایی شده مغز رت) و گروه‌های تجربی ۱ و ۲ (تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ مایکروگرم در میلی‌لیتر عصاره پای کیتون) و گروه‌های تجربی ۳ و ۴ (تیمار توام بافت سلول زدایی شده مغز رت و غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره پای کیتون). G اختلاف معنی‌دار گروه‌ها در مقایسه با گروه شاهد در سطح ۰/۰۵ >pGG اختلاف معنی‌دار گروه‌ها در مقایسه با گروه شاهد در سطح ۰/۰۰۱ > p .



شاهد

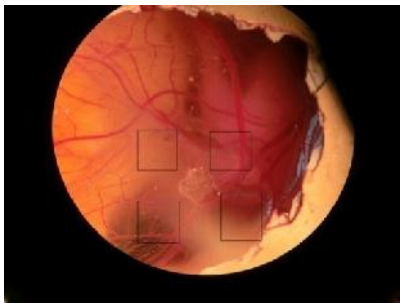


شاهد آزمایشگاهی ۱

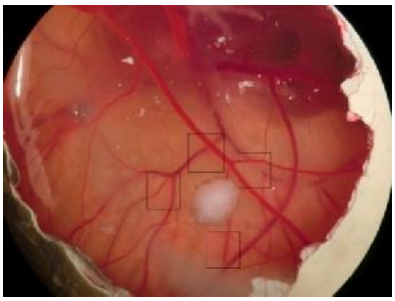


شاهدآزمایشگاهی ۲

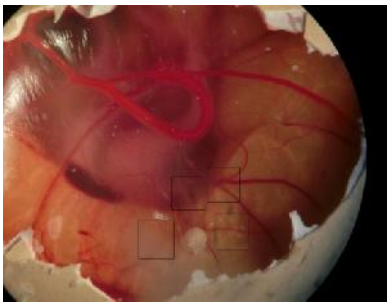
تجربی ۱



تجربی ۲



تجربی ۳



تجربی ۴

شکل۱: گروه‌های شاهد و شاهد آزمایشگاهی ۱ (تیمار با DMSO)، شاهد آزمایشگاهی ۲ (استفاده از بافت سلول زدایی شده مغز رت) و گروه‌های تجربی ۱ و ۲ (تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ مایکروگرم در میلی‌لیتر عصاره پای کیتون) و گروه‌های تجربی ۳ و ۴ (تیمار توام بافت سلول زدایی شده مغز رت و غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ مایکروگرم در میلی‌لیتر عصاره پای کیتون)

بحث

بسیاری از فرآورده‌های طبیعی حاصل از دریا و مشتقات آن‌ها با فعالیت‌های ضد رگ‌زایی، به‌واسطه مکانیسم‌های مولکولی مختلف گزارش شده اند که در مقایسه با داروهای مصرفی ویژگی‌های قابل توجهی از جمله منابع متنوع، ساختار شیمیایی منحصر به‌فرد، فعالیت مشخص و پروفایل‌های سمی را نشان می‌دهند (۱۷). از طرفی به‌عنوان یک مشخصه از سرطان، رگ‌زایی به‌منظور یک هدف قدرتمند برای سرکوب رشد تومور و متاستاز در نظر گرفته می‌شود (۱۸). در پژوهش حاضر کیتون نرم تن دریایی سواحل دریای عمان، با هدف بررسی اثر عصاره آن همراه با بافت سلول زدایی شده مغز موش صحرایی بر روند آنژیوژنز مورد مطالعه قرار گرفته است.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در گروه شاهد با شاهد آزمایشگاهی۲ تفاوت معنی‌دار دارد همچنین تیمار با عصاره الکلی بافت پای کیتون در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر موجب کاهش رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه می‌شود. تیمار توام نمونه‌ها با ماتریکس سلول زدایی شده مغز رت و عصاره نیز موجب کاهش معنی‌دار رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه می‌شود که به‌صورت کاهش در تعداد و طول انشعابات عروقی در مقایسه با شاهد و شاهد آزمایشگاهی دیده می‌شود .

بررسی یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که عصاره الکلی بافت پای کیتون Lamyi در دوزهای یاد شده با مهار رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه موجب کاهش معنی‌دار در تعداد و طول عروق در نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه شاهد شده است. ضمن توجه به این موضوع که تاکنون روی این گونه از نرم‌تنان برای بررسی اثرات رگ‌زایی تحقیق چندانی صورت نگرفته است برخی تجربیات محدود گذشته می‌تواند مورد توجه قرار گیرد از جمله این که عصاره الکلی خون نرم‌تن خلیج فارس، گونه *Anadara rhombea*، دارای فعالیت سمی بر علیه گلبول‌های مهره داران گزارش شده است (۱۹) . همچنین گزارش شده است است که عصاره گونه *Anadara granosa*، بر علیه کشت سلول‌های سرطان سینه MCF-7 و HuH-6KK موثر است و بر علیه دودمان‌های سلولی توموری کلیه و ریه به‌عنوان یک عامل ضد تومورال عمل می‌کند (۲۰).

گونه *Meretrix lusoria*، با القای آپوپتوزیس از طریق تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS)، کاهش گلوتاتیون و فعال سازی کاسپاز در سلول‌های لوسمی انسان اثر خود را ایفا می‌کند (۲۱). همچنین مطالعات نشان داده است که عصاره گونه *Meretrix meretrix*، دارای توانایی منع رشد سلول‌های هپاتوما و القای توقف سیکل سلولی هپاتوما و القای توقف سیکل سلولی G1 در لاین‌های سلولی هپاتوما Hep G2 و Hep 3B می‌باشد همچنین یک پپتید ضد سرطانی از این نرم تن خالص‌سازی شده است که موجب منع تکثیر سلول‌های BGC – 823 کارسینوم غدد معده ای انسان می‌شود که این عمل را با تخریب ساختمان‌های اسکلتی سلول به انجام می‌رساند (۲۲).

تجربیات انجام شده روی پلی ساکارید استخراجی از نرم تن جنس هالیوتیس، گونه *Haliotis discushannai*، به‌نام آبالون، موجب ارتقای اثر منعی سیکلوفسفامید بر روی سلول‌های توموری S180 و HepA می‌شود و سرکوب مغز استخوان حاصل از این دارو را کاهش می‌دهد (۲۳). در مطالعه دیگری نشان داده شده است که پلی ساکارید آبالون بر روی فعالیت فاگوستیوزی ماکروفاژهای پریتونال و حساسیت تاخیری در موش‌های حامل S180 موثر است و از این طریق می‌تواند به‌عنوان منع کننده‌ی سلول‌های توموری مورد نظر قرار گیرد (۲۴).

همچنین مطالعه روی جنس لاملاریا، گونه *Lamellaria sp* نشان داده است که یک آلکالوئید تحت عنوان لاملارین D دارای اثرات سیتوتوکسیک بر علیه لاین‌های سلولی تومورال مقاوم چند دارویی است و به‌شدت بر علیه سلول‌های سرطانی پروستات موثر است و اثر آن احتمالا از طریق منع فعالیت توپوایزومراز I می‌باشد. از این‌رو به‌عنوان یک ترکیب ضد سرطان قابل بررسی است (۲۵).

در نرم تن جنس اسپیزولا، گونه *Spisula polynym*، ماده‌ی ضد سرطان اسپیسولوزین، خواص منع رشد سلول‌های تومور پروستات PC-3 و لاین LNCaP از طریق انباشت درون سلولی سرآمید و فعال سازی PKC-zeta را از خود نشان می‌دهد و اکنون وارد فاز کارآزمایی بالینی شده است (۲۶) و برای تزریق درون وریدی فرمول شده است (۲۷). ماده پلانوکسول در جنس پلاناکسیس، گونه *Planaxis sulcatus* ، یک سمبرانوئید سیتوتوکسیک حاصل از این گونه است (۲۸).

جنس توربو، گونه *Turbo stenogyrus*، چهار سربروزید جدید تحت عنوان توربواستاتین ۱تا ۴، از این نرم تن جدا شده اند که

نشان داده شده است به روی سلول‌های لوسمی لنفوسیتیک P388 موش و لاین سلول‌های سرطانی انسانی موثر می‌باشند (۲۹). این چند جنس، گونه از نرم تنان خلیج فارس که ذکر شد دارای خواص ضد توکسیک و ضد سرطانی می‌باشند و عصاره این نرم تنان یا مواد استخراجی و تخلیص شده آن‌ها بر علیه سلول‌های سرطانی انسانی و حیوانی مورد آزمایش قرار گرفته است. مواد استخراجی فعال زیستی ضد سرطانی این نرم تنان دارای ساختمان‌های گوناگونی هستند و از پپتیدها تا پلی ساکارید و گلیکو پروتئین، آلکالوئید، سمبرانوئید و سربروزید را شامل می‌شوند.

مکانیسم عمل آن‌ها نیز بسیار متنوع بوده و می‌توانند با القای آپوپتوزیس، تخریب ساختمان اسکلت سلولی، اثر برسیستم ایمنی تا منع فعالیت توپوایزومراز I اثرات ضد سرطانی و سیتوتوکسیک خود را نشان دهند (۳۰ و ۳۱). یک مطالعه صورت گرفته بر روی بافت پای کیتون مربوط به بررسی اسیدهای چرب در گونه *Lamyi chiton* منطقه بین جزر و مدی خلیج چابهار است که توسط نوشین سجادی و همکارانش (۳۲) صورت گرفته است و در این مقاله سیزده اسید چرب به‌روش کروماتوگرافی گازی با شناساگر اسپکتروسکوپی جرمی (GC/ MS) جداسازی و شناسایی شدند و از طرفی اثرات تغییر مقادیر پارامترهای محیطی منطقه نمونه برداری شامل دما و مواد مغذی بر مقدار تغییرات اسیدهای چرب توسط روش‌های آماری تحلیل شده است. نتایج این مطالعه بیانگر این است که محتوا و ترکیب اسید چرب موجود در بافت پای کیتون تابع عملکرد تنوع تغذیه آن‌ها است.

پاسخ رگ‌زایی ناشی از داربست مغز بدون سلول بر روی پرده کوریو آلانتوئیک جنین جوجه(CAM)، یک مدل مفید برای این چنین تحقیقات، مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج مطالعات قبلی و این تجربه نشان می‌دهد که داربست بدون سلول مغزی قادر به القای پاسخ قوی رگ‌زایی در مقایسه با فاکتوررشد فیبروبلاست۲ (FGF-2)، یک سایتوکین رگ‌زایی است. این پاسخ ممکن است در اثر رگ‌زایی مستقیم اعمال شده توسط داربست در نظر گرفته شود زیرا هیچ ارتشاح التهابی در مزانشیم CAM زیر کاشت قابل تشخیص نبود (۳۳). داربست بدون سلول مغزی ممکن است ترشح فاکتورهای آنژیوژنیک درونی، مانند FGF-2 و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) منتشر شده از ماتریکس خارج سلولی از CAM در حال توسعه را القا کند و علاوه بر این، پاسخ رگ‌زایی همچنین ممکن است به حضور فاکتور رشد تغییر شکل یافته بتا ۱ (TGFB1) در ماتریس بدون سلول بستگی داشته باشد (۳۴).

در تحقیق حاضر زمانی‌که بافت سلول زدایی شده مغز موش صحرایی نژاد ویستار همراه با عصاره استفاده شد مقداری از اثر مهاری دوزهای ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره الکلی پای کیتون Lamyi بر رگ‌زایی را در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه کاهش یافت که این نتایج پیشنهاد می‌کند که احتمالا عمل‌کرد عصاره الکلی پای کیتون به‌صورت کاهش رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج بیان‌گر آن است که بافت مغز سلول زدایی شده القا کننده قوی رگ‌زایی است و کاربرد توام آن با عصاره پای کیتون باعث کاهش اثرات مهاری آن بر رگ‌زایی می‌شود. لذا به‌نظر می‌رسد که کاربرد توام این دو ترکیب با هم می‌تواند در مهندسی بافت و مطالعات سرطان‌شناسی مورد توجه قرار گیرد .

تشکر و قدردانی

از کارشناسان محترم مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری که در اجرای این طرح همکاری داشتند صمیمانه سپاس‌گزاری می‌نمائیم .

منابع

1. Smith RA, Brooks D, Cokkinides V, Saslow D, et al. Cancer screening in the United States : a review of current American Cancer Society guidelines, current issues in cancer screening, and new guidance on cervical cancer screening and lung cancerscreening. CA Cancer J Clin. 2013; 63(2): 88-105.

2. Veeravagu A, Hsu AR, Cai W, Hou LC, et al. Vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy. Recent Pat Anticancer Drug Discov. 2007; 2(1):59-71.

3. Hoff PM, Machado KK. Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. Cancer Treat Rev. 2012; 38(7): 825-33.

4. Udan RS, Culver JC, Dickinson ME. Understanding vascular development. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2013; 2(3): 327-46.

5. Ahmed Z, Bicknell R. Angiogenic signalling pathways. Methods Mol Biol. 2009; 467: 3-24.

6. Yoo SY, Kwon SM. Angiogenesis and its therapeutic opportunities. Mediators Inflamm. 2013; 2013: 127170.

7. Ribatti D. Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. Leuk Res .2009; 33(5): 638-44.

8. Auerbach R, Lewis R, Shinners B, Kubai L, et al . Angiogenesis assays: a critical overview. Clin Chem .2003; 49(1): 32-40.

9. Staton CA, Reed MW, Brown NJ. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays.Int J Exp Pathol. 2009 ; 90(3): 195-221.

10. Ribatti D. Chicken chorioallantoic membrane angiogenesis model. Methods Mol Biol .2012; 843: 47-57.

11. Ochiai T, Shimeno H, Mishima K, Iwasaki K, et al. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. Biochim Biophys Acta .2007; 1770(4): 578-84.

12. Takami Y, Matsuda T, Yoshitake M, Hanumadass M, et al . Dispase/ detergent treatment dermal matrix as a dermal substitute Burns .1996; 22: 182–190.

13. Sutherland RS, Baskin LS, Hayward SW, Cunha GR. Regenera tion of bladder urothelium, smooth muscle, blood vessels and nerves into an acellular tissue matrix . J Urol .1996; 156: 571–577.

14. Parnigotto PP, Gamba PG, Conconi MT, Midrio P. Experimental defect in rabbit urethra repaired with acellular aortic matrix . Urol Res. 2000; 28(1): 46–51.

15. Marzaro M, Conconi MT, Perin L, Giuliani S, et al. Autologous satellite cell seeding improves in vivo biocompatibility of homologous muscle acellular matrix implants. Int J Mol Med. 2002; 10(2): 177-82.

16. Jimeno J, Aracil M, Tercero JC. Adding pharmacogenomics to the development of new marine-derived anticancer agents. J Transl Med. 2006; 4:3.

17. Wang YQ, Miao ZH. Marine-derived angiogenesis inhibitors for cancer therapy. Mar Drugs. 2013 Mar 15; 11(3): 903-33.

18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation.Cell. 2011; 144(5): 646-74.

19. Rajaganapathi J, Rajagopal K, Edward JK. Antifungal and cytotoxic effects of methanol extracts of three marine molluscs. Indian J Exp Biol. 2001; 39(1): 85-6.

20. Yao R, Han Z, Wang M, et al. Extract from Arca granosa L.inhibits proliferation of human tumour cell lines with kidney and lung origin. J Int Med Res. 2006; 34: 355-61.

21. Pan MH, Huang YT, Ho CT, et al. Induction of apoptosis by Meretrix lusoria through reactive oxygen species production, glutathione depletion, and caspase activation in human leukemia cells. Life Sci .2006; 79(12): 1140-52.

22. Leng B, Liu XD, Chen QX. Inhibitory effects of anticancer peptide from Mercenaria on the BGC-823 cells and several enzymes. FEBS Lett. 2005; 579(5): 1187-90.

23. Wang B, Xu D, Xu S, et al. Synergy and attenuation of cyclophosphamidum (CTX) activities by abalone polysaccharide. Zhong Yao Cai .1999; 22(4): 198-200.

24. Xu D, Wang B, Xu S, et al. Effects of abalong polysaccharide on the activity of the peritoneal macrophages and delayed-type hypersensitivity in mice bearing S180. Zhong Yao Cai. 1999; 22(2): 88-9.

25. Vanhuyse M, Kluza J, Tardy C, et al. Lamellarin D: a novel pro-apoptotic agent from marine origin insensitive to Pglycoprotein Pglycoprotein- mediated drug efflux. Cancer Lett. 2005; 221(2): 165-75.

26. Sanchez AM, Malagarie-Cazenave s, Olea N, et al. Spisulosine (ES-285) induces prostate tumor PC-3 and LNCaP cell death by de novo synthesis of ceramide and PKCzeta activation. Eur J Pharmacol. 2008; 584: 237- 45.

27. Den Brok MW, Nuijen B, García JL, et al. Compatibility and stability of the novel anticancer agent ES-285 x HCl formulated with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in infusion devices. Pharmazie. 2006; 61(1): 21-4 .

28. Sanduja R, Sanduja SK, Weinheimer AJ, et al. Isolation of the cembranolide diterpenes dihydrosinularin and 11-epi-sinulariolide from the marine mollusk Planaxis sulcatus. J Nat Prod. 1986; 49(4): 718-9 .

29. Pettit GR, Tang Y, Knight JC. Antineoplastic agents. 545. Isolation and structure of turbostatins 1-4 from the Asian marine mollusk Turbo stenogyrus. J Nat Prod. 2005; 68(7): 974-8.

30. Mayer AM, Gustafson KR. Marine pharmacology in 2005-2006: antitumour and

cytotoxic compounds. Eur J Cancer. 2008; 44(16): 2357-87.

31. Nabipour I, Najafi A, Bolkheir A. [Anticancer and cytotoxic compounds from seashells of the Persian Gulf] . ISMJ .2009; 12(3): 231-237. Persian.

32. Sajjadi N, Eghtesadi-Araghi P, Jamili SH, Hashtroodi M, et al . Seasonal Variations of n-6: n-3 Ratios and Fatty Acid Compositions in Foot and Tissue of Chiton lamyi in a High Primary Productivity Area. American Journal of Environmental Sciences 5. 2009; (3): 278-284.

33. Ribatti D, Conconi MT, Nico B, Baiguera S, et al. Angiogenic response induced by acellular brain scaffolds grafted onto the chick embryo chorioallantoic membrane. Brain Res. 2003; 989(1): 9-15.

34. Nillesen ST, Geutjes PJ, Wismans Schalkwijk J, et al. Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagenheparin scaffolds con tainingboth FGF2 and VEGF. Biomaterials. 2007; 28(6): 1123-31.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Summer 2015; 6(2): 205-212

The Synergic Effect of *Chiton lamyi* Foot Alcoholic Extract and Acellular Rat Brain's Tissue on Angiogenesis in Chick Embryo Chorioalantoic Membrane

Baharara J , Ph.D.[1]*, Mahdavi Shahri N, Ph.D.[2], Namvar F, Ph.D.[3] , Saeedeh Talebi S, M.Sc.[4]

1. Department of Biology & Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad ,Iran
2. Department of Biology, Ferdowsi University, Mashhad, Iran
3. Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad ,Iran
4. MSc. Student in Developmental Cell Biology, Faculty of Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

* Email corresponding author: baharara@yahoo.com

Received: 7 Jan. 2014 Accepted: 25 Nov. 2014

Abstract

Aim: In this study the synergic effect of *Chiton lamyi* foot alcoholic extract and decellulation rat brain's tissue on angiogenesis in hen (chick???) chorioalantoic membrane (CAM) was investigated.

Material and Methods: In this study, 70 fertilized eggs of Ross strain were divided into 7 treatments groups in ten repetitions: 1. control, 2. DMSO, 3. decellulation rat brain's tissue, 4. 10mgμl^{-1} *Chiton lamyi* foot alcoholic extract, 5. 20mgμl^{-1} *Chiton lamyi* foot alcoholic extract, 6. decellulation rat brain's tissue & 10mgμl^{-1} *Chiton lamyi* foot alcoholic extract and 7. decellulation rat brain's tissue & 20mgμl^{-1} *Chiton lamyi* foot alcoholic extract. All of eggs were placed in the incubator for eight days and treatments induction was done in 8th day. Then they photographed using photo steriomicroscope in 12th day. Blood vessels branches length and number were evaluated by Image J software in treatment sites on chorioalantoic membrane. Data were analyzed using ANOVA, SPSS Test (P<0.05).

Results: Results showed that *Chiton lamyi* foot alcoholic extract, 10 and 20mgμl^{-1} *Chiton lamyi* foot alcoholic extracts with decellulation rat brain's tissue treatments significantly decreased blood vessels branches length and number in comprising with control and DMSO treatments (P< 0.05).

Conclusion: The Synergic usage of *Chiton lamyi* foot alcoholic extract and decellulation (acellular) rat brain's tissue has dose inhibitory effect on hen chorioalantoic membrane (CAM) angiogenesis.

Keywords: Angiogenesis, Chick Chorioalantoic Membrane, Chiton