مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۶، شماره ۳/ مرداد و شهریور ۱۳۹۳/ ۸۸-۷۹

مقاله پژوهشی

اثر ضد رگ زایی عصاره آبی زعفران در مدل حلقه آئورت موش صحرایی نژاد ویستار

صفا مشتاق، دکتر جواد بهارآرا*، سعیده ظفر بالانژاد، طیبه رمضانی

مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری و گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۲۲

چکیده:

زمینه و هدف: **زعفران (*Crocus sativus* L.) اثرات فارماکولوژیک متعددی دارد. آنژیوژنز برای تکوین جنین و بسیاری از وقایع فیزیولوژیکی و پاتولوژیک نظیر رشد تومور، ضروری است. در مطالعه حاضر اثرات آنتی‌آنژیوژنیک عصاره آبی زعفران در حلقه آئورت موش صحرایی نژاد ویستار بررسی شده است.**

روش بررسی: **در این مطالعه تجربی، آئورت موش صحرایی نژاد ویستار را به قطعات ۱ میلی متری برش و در ماتریکس کلاژن کشت داده شد. پس از مشاهده اولین جوانه های عروقی از حلقه آئورت در روز سوم نمونه ها به ۵ گروه شامل شاهد، شاهد آزمایشگاهی ۱ (تیمار با بافر فسفات) و گروه های تجربی ۲،۱ و ۳ (تیمار با عصاره های آبی زعفران در غلظت های ۱۵۰، ۲۰۰و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تقسیم شدند. ۲٤ ساعت پس از تیمار، رگ زایی با میکروسکوپ اینورت بررسی و عکس برداری شد. تعداد و طول انشعابات رگی توسط نرم افزار Image J تعیین گردید.**

یافته ها: **مقایسه میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در نمونه های شاهد با تعداد و طول انشعابات در نمونه شاهد آزمایشگاهی اختلاف معنی دار نشان نداد (P>۰/۰۵). میانگین طول و تعداد عروق خونی در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه شاهد تغییرات معنی دار نشان نداد (P>۰/۰۵)، اما در گروه های تجربی ۲ و ۳ کاهش معنی داری مشاهده شد (P<۰/۰۵).**

نتیجه گیری: **عصاره آبی زعفران دارای اثر مهاری وابسته به دوز رگ زایی است؛ لذا با توجه به اثرات جانبی داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی مانند زعفران با حداقل اثرات جانبی می تواند در مهار رگ زایی نقش موثری داشته باشد.**

واژه های کلیدی: **آنژیوژنز، زعفران، حلقه آئورت، سلول اندوتلیال، موش صحرایی.**

مقدمه:

رگ های جدید در بزرگ سالان از شبکه عروقی جنینی ایجاد می شود، آنژیوژنز فرآیند دینامیک تکثیر سلول های اندوتلیال است و تشکیل رگ های فعال مستلزم برهم کنش های هماهنگ بین سلول های اندوتلیال و ماتریکس خارج سلولی و سلول های احاطه کننده می باشد (۱).

آنتی آنژیوژنیک درمانی در تومور مهار تشکیل رگ های توموری جدید است که در نهایت رگ های تشکیل شده موجود هدف گیری می شوند، این روش درمانی منجر به طراحی و تکوین ترکیباتی شد که رشد تومور را به وسیله بلوکه کردن توانایی تشکیل رگ های تغذیه کننده و یا هدف گیری رگ های موجود مهار می کند (۲). اولین بار در Falkman 1971 گسترش تومور را وابسته به تشکیل عروق جدید دانست و این موضوع که مهار ایجاد رگ می تواند رشد تومور را متوقف کند را بیان کرد (۳).

با توجه به اثرات جانبی برخی از داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی با حداقل اثرات جانبی و تداخل دارویی مورد توجه بسیار قرار گرفته است (۴). از زمان باستان تاکنون گیاهان برای پیشگیری یا درمان بسیاری از بیماری ها مورد استفاده قرار می گرفته اند و دارای ترکیبات فعالی هستند که بر روی

***نویسنده مسئول:** مشهد- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد- گروه زیست شناسی- تلفن:۰۵۱۱۸٤۳۷۰۹۲، E-mail:baharara@yahoo.com*

رگ زایی موثرند (۶،۵). زعفران دارای جایگاه خاصی در الگوی تغذیه ای مردم است. زعفران به عنوان یک چاشنی و رنگ در غذاها و نیز در درمان طیف وسیعی از اختلالات همچون سرفه، نفخ شکم، اختلالات معده، بی خوابی، خونریزی مزمن رحم، اختلالات زنانگی، مخملک و حتی سرطان مورد استفاده قرار گرفته است (۷). زعفران با نام علمی *Crocus sativus L.* از تیره زنبق چند ساله و با گل های بنفش می باشد که دارای خامه بلند و کلاله سه بخشی به رنگ نارنجی و قرمز است و دارای ارزش تجاری می باشد (۸). نتایج بررسی های دانشمندان مشخص نموده است که ترکیبات اصلی زعفران شامل کروسین، کروستین، پیکروکروسین و سافرانال در جلوگیری از تحلیل نورون ها و تقویت حافظه موثرند، در کلاله های رنگی زعفران حدود ۱۵۰ ترکیب فعال و غیر فعال وجود دارد و مهمترین ترکیبات فعال بیولوژیکی آن کروسین، پیکروکروسین، کاروتنوئید و سافرانال و ویتامین ها می باشند (۹).

تحقیقات طب مدرن نشان داده است، عصاره تام و مواد تشکیل دهنده این گیاه به صورت خالص، خاصیت ضد توموری و ضد التهابی دارد (۱۰). همچنین اثرات ضد افسردگی عصاره آبی و اتانولی گلبرگ های گل زعفران در موش به اثبات رسیده است (۱۱). زعفران به عنوان محافظ، از آسیب رسیدن به کروموزوم ها جلوگیری کرده و همچنین تعدیل کننده پراکسیداسیون چربی ها است و یک منبع آنتی اکسیدان قوی و منبع سرشاری از ریبوفلاوین می باشد (۱۲).

اثر ضد سرطانی زعفران در مدل های سلولی مختلف، بر روی طیف وسیعی از تومورها از جمله لوکمیا، کارسینوم تخمدان و پستان، آدنوکارسینوم روده بزرگ و کارسینوم سلول سنگفرشی نشان داده است، همچنین به طور وابسته به دوز تشکیل کلونی سلول های توموری را مهار می نماید، ولی بر تکثیر و تمایز سلول های سالم اثر ندارد (۱۳).

مدل های سه بعدی کشت بافت (همچون مدل حلقه آئورت) نقش بسیار ارزشمندی در بیولوژی تومور دارند و دیدگاه های متفاوت در رشد تومور ایجاد کرده اند، آنژیوژنز را می توان با روش ex vivo و با استفاده از کشت قطعات حلقه های آئورت در ژل های بیولوژیک مورد مطالعه قرار داد، مدل ex vivo در مقایسه با روش in vivo (نظیر مدلCAM) به نحوی عمل می کند که اثرات آنژیوژنیک و آنتی آنژیوژنیک فاکتورهای محلول مختلف یا فاکتورهای ماتریکسی به آسانی با این روش مورد ارزیابی خواهد بود و بر محدودیت های موجود در روش in vivo غلبه می کند (۱۴).

از ماتریکس کلاژنی به عنوان یکی از انواع مدل های کشت استفاده فراوانی شده است، از جمله با استفاده از داربست کلاژنی به عنوان یک مدل مناسب برای کشت حلقه آئورت اثرات عصاره گیاه موسیر بر روند رگ زایی مطالعه شده است. کشت اکسپلانت های عروقی (روش مورد استفاده برای جداسازی سلول ها از یک قطعه بافت موجود زنده و کشت آن ها در شرایط کشت آزمایشگاهی) نظیر حلقه آئورت در ماتریکس ژله ای و سپس مشاهده سلول های آندوتلیال به عنوان یک مدل سه بعدی محسوب می شود، این مدل اولین بار توسط نیکوزیا ارائه گردید و هنوز به طور وسیعی مورد استفاده قرار می گیرد (۱۵).

آزمایش استاندارد ex vivo آئورت موش صحرایی شکاف بین مدل های in vivo و in vitro را پر می کند و مزایایی از هر دو سیستم را در بر می گیرد و اثرات رگ زایی و ضد رگ زایی فاکتورهای محلول مختلف و یا فاکتورهای ماتریکسی به آسانی و با استفاده از این مدل قابل ارزیابی و سنجش است. با توجه به مقالات متعددی که بر اثرات زعفران در فرآیندهای ضد سرطانی مانند مهار تشکیل تومورها، آثار ضد جهش زایی و مهار سنتز اسید نوکلئیک در تومورهای بدخیم انسانی تأکید دارد (۱۶) و نیز اهمیت فرآیند آنژیوژنز در پدیده های پاتولوژیک نظیر رشد و متاستاز تومورهای سرطانی که می تواند هدف درمان های ضد توموری قرار گیرد و همچنین با توجه به انتشار جغرافیایی این گیاه در ایران و استفاده از آن به عنوان یک چاشنی

غذایی پر مصرف، در تحقیق حاضر تأثیر گیاه دارویی زعفران بر فرآیند آنژیوژنز با استفاده از مدل آزمایشگاهی حلقه آئورت بر مهار رگ زایی، برای پیشبرد اهداف درمانی با رویکرد کاربرد مواد طبیعی، بررسی شده است.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی، برای تهیه عصاره، ۳ گرم زعفران تجاری ساییده شد، سپس به دستگاه سوکسله منتقل و عصاره گیری انجام گردید (۱۷). در مرحله بعد کلاژن با غلظت ۴ میلی گرم در میلی لیتر از دم موش صحرایی نژاد ویستار استخراج گردید (برای تعیین غلظت از روش بردفورد استفاده شد) و برای تهیه داربست از آن استفاده شد. در این روش ابتدا رشته های تاندونی دم تفکیک گردید، پس از جداسازی چربی های اضافه و ۳ بار شستشو با بافر فسفات (PBS) در الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. در مرحله آخر به مدت ۶۰ دقیقه با ۱۶۰۰۰ دور سانترفیوژ گردید و کلاژن مورد نیاز آماده شد (۱۸).

به منظور تهیه حلقه آئورت از موش های صحرایی نژاد ویستار که سن آن ها بین ۶ تا ۸ هفته با وزن حدود۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. برای انجام تجربیات ابتدا موش ها را با استفاده از کلروفرم بیهوش و و محل حفره شکمی توسط الکل ۷۰ درصد استریل گردید. حفره شکمی توسط وسایل جراحی باز و پس از پیدا کردن آئورت قطعه ای با طول مناسب جدا گردید و بلافاصله به بافر استریل که حاوی آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین بود منتقل گردید. در شرایط استریل و زیر هود کشت سلولی، بافت زائد چربی حذف گردید. سپس با استفاده از تیغ جراحی، آئورت به اندازه های ۱ تا ۲ میلی متری قطعه قطعه شد. قطعات آئورت به درون چاهک های پلیت ۲۴ خانه ای منتقل شد و بلافاصله روی قطعات کاشته شده را با لایه ای نازک از محلول کلاژن پوشاندیم. در این تحقیق از تعداد ۸ موش نژاد ویستار تعداد ۶۰ برش (طی سه مرتبه تکرار و هر مرتبه ۲۰ برش) حلقه های آئورت تهیه و در ۵ گروه به صورت تصادفی و مساوی تقسیم شد. ۵ گروه انتخاب شده شامل شاهد (نگهداری در شرایط طبیعی)، شاهد آزمایشگاهی ۱ (تیمار با PBS) و گروه های تجربی ۲،۱ و ۳ (تیمار با عصاره های آبی زعفران در غلظت های (۱۵۰،۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به صورت تصادفی و مساوی در چاهک های پلیت قرار داده شد (۱۹). پلیت حاوی نمونه ها به انکوباتور (با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد) منتقل شد و به این ترتیب محلول کلاژن به طور کامل به ژل تبدیل شد. پس از تشکیل ژل پایدار کلاژن، به آن محیط کشت Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)، (Sigma, France) حاوی ۲۰ درصد سرم گوساله (FCS= Fetal Calf Serum) (Gibco, USA) و آنتی بیوتیک پنی سیلین (Gibco, USA) و استرپتومایسین (Gibco, USA) اضافه شد. برای تهیه داربست، کلاژن استخراجی از دم موش صحرایی، بیکربنات سدیم و محیط کشت DMEM را به نسبت ۱،۸،۱ مخلوط کردیم، پس از تشکیل داربست حلقه های آئورت درون آن قرارداده شد و سپس در انکوباتور به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد و به این ترتیب محلول کلاژن به ژل تبدیل گردید. سپس پلیت را از انکوباتور خارج و زیر هود، به آن محیط کشت DMEM حاوی ۲۰ درصد سرم گوساله FBS و آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین اضافه گردید (۱۹). پس از ۳ روز از زمان کشت و پیدایش اولین جوانه های عروقی از حلقه آئورت، عصاره زعفران در غلظت های ۱۵۰ و ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اضافه گردید. سه چاهک هم به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. سپس پلیت به انکوباتور منتقل و ۲۴ ساعت بعد، از نتایج با استفاده از دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ نوری عکس برداری شد. کلیه تجربیات ۳ بار تکرار گردید. محققان این پروژه در کلیه مراحل متعهد به رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات بوده اند. داده های آماری حاصل در نرم افزار (Version ۱۶) SPSS و به کمک آزمون

آماری ANOVA و تست تعقیبی Tukey در سطح P<۰/۰۵ تحلیل شدند.

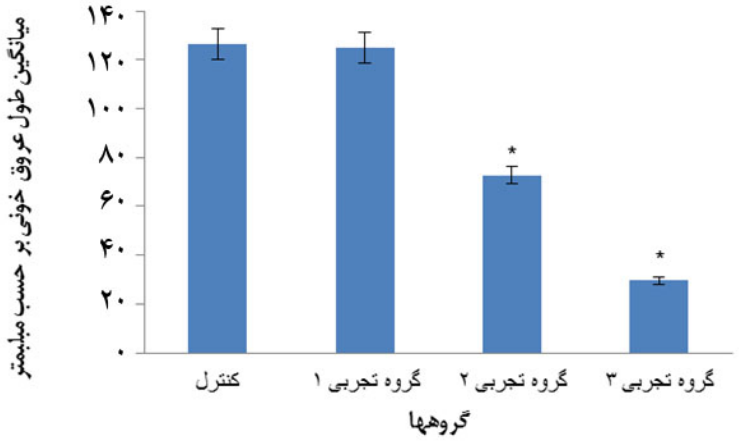
یافته ها:

مطالعه با میکروسکوپ معکوس نشان داد که در روز سوم انشعابات عروقی پدیدار شده اند، در روز پنجم جوانه های عروقی گسترش می یابند؛ همچنین در بررسی نمونه های تجربی در روز سوم مشخص گردید که افزودن عصاره آبی با غلظت ۱۵۰ میکروگرم روی رگ زایی اثر مهاری ندارد، لیکن غلظت های ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر باعث مهار رگ زایی شده بودند (تصویر شماره ۱).

پس از عکس برداری از نمونه ها ۲۴ ساعت پس از زمان تیمار شمارش تعداد انشعابات عروقی و اندازه گیری طول آن ها توسط نرم افزار Imag J انجام شد. نتایج نشان داد، میانگین تعداد انشعابات عروقی گروه شاهد (۱۹±۴/۵) و طول انشعابات عروقی آن (۱۲۶/۵±۲/۲mm) در مقایسه با تعداد انشعابات عروقی نمونه های شاهد آزمایشگاهی (۱۸±۲/۲) و طول انشعابات آن (۱۲۴±۳/۲mm) اختلاف معنی دار ندارد (P>۰/۰۵)؛ لذا در بررسی های بعدی نمونه های تجربی با نمونه های شاهد مقایسه شدند.

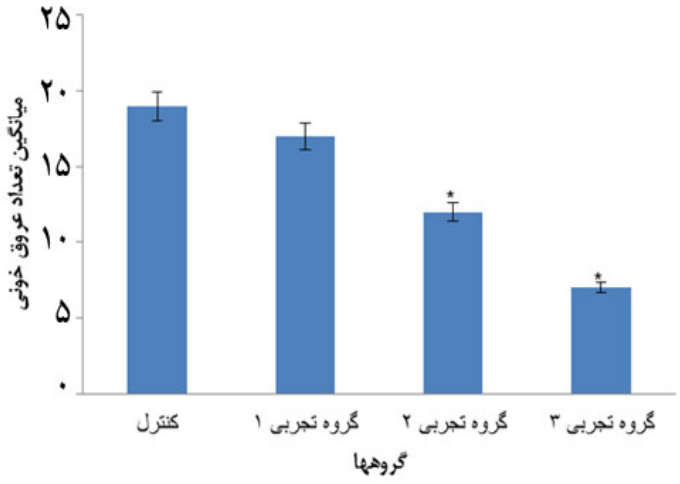
میانگین طول انشعابات عروقی در گروه تجربی ۱ (۱۲۴/۹۴±۲/۱mm) نسبت به گروه شاهد (۱۲۶/۵±۲/۲mm) تغییر معنی دار نشان نداد (P>۰/۰۵)؛ در حالی که طول انشعابات عروقی در گروه های تجربی ۲ (۷۲/۷۹±۱/۳۰mm) و گروه تجربی ۳ (۲۹/۵۹±۱/۰۱mm) نسبت به گروه شاهد (۱۲۶/۵±۲/۲mm) کاهش معنی دار نشان داد (P=۰/۰۴۱) (نمودار شماره ۱).

همچنین میانگین تعداد انشعابات عروقی در گروه تجربی ۱ (۱۷±۲) نسبت به گروه شاهد (۱۹±۴/۵) تغییرات معنی دار نشان نداد (P>۰/۰۵)؛ در حالی که طول انشعابات عروقی در گروه تجربی۲ (۱۲±۱/۴) و گروه تجربی ۳ (۷±۱/۱۵) نسبت به گروه شاهد (۱۹±۴/۵) کاهش معنی دار نشان داد (P=۰/۰۴۳) (نمودار شماره ۲).



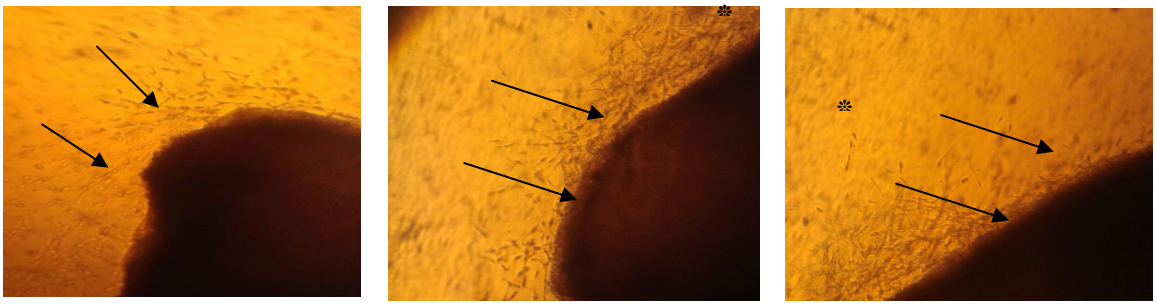
نمودار شماره ۱: میانگین طول انشعابات خونی در گروه های تحت تیمار با عصاره زعفران و شاهد

*گروه های تجربی ۱،۲ و ۳ به ترتیب با غلظت های ۲۰۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر عصاره زعفران تیمار شده اند؛ *P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل*

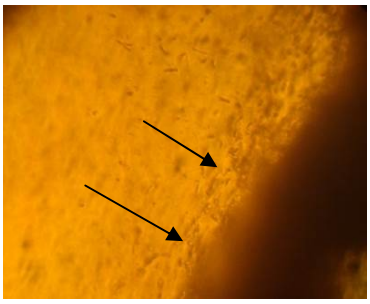


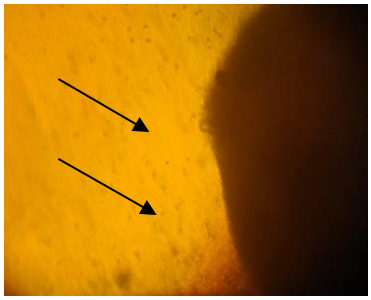
نمودار شماره ۲: میانگین تعداد انشعابات عروقی در گروه های تحت تیمار با عصاره زعفران و شاهد

*گروه های تجربی ۱،۲ و ۳ به ترتیب با غلظت های ۱۵۰،۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره زعفران تیمارشده اند؛ *P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل*



(الف) (ب) (ج)





(د) (م)

تصویر شماره ۱: اثر مهارکنندگی بر روی رگ زایی توسط عصاره آبی زعفران با استفاده از مدل حلقه آئورت

تصاویر با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس گرفته شده است (بزرگ نمایی 100X). از راست به چپ (الف) پدیدار شدن انشعابات عروقی از حلقه آئورت کشت شده در ماتریکس کلاژن در روز سوم. (ب) گسترش جوانه های عروقی در روز پنجم. (ج) افزودن عصاره آبی زعفران با غلظت ۱۵۰ میکروگرم که قادر به مهار رگزایی نبود. (د) افزودن عصاره آبی زعفران با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر (م) افزودن غلظت ۳۰۰ میکروگرم عصاره آبی زعفران اثر مهاری بر رگ زایی نشان داد.

بحث:

با توجه به اهمیت فرآیند رگ زایی در حالات متعدد فیزیولوژیک و پاتولوژیک، از جمله گسترش و پیشرفت بیماری های مزمن مثل تومورهای بدخیم و اهمیت استفاده ار غذاهای با منشاء گیاهی در مهار رگ زایی، همچنین تأثیر شناخته شده ای که گیاه زعفران به عنوان یک داروی اثربخش گیاهی دارد؛ لذا در این پژوهش تجربی گیاه دارویی زعفران که به طور معمول در درمان طیف وسیعی از بیماری ها، از افسردگی و تشنج تا بیماری های گوارشی و تنفسی مورد استفاده قرار می گیرد، با هدف تداخل در روند رگ زایی استفاده گردید.

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد نمونه های شاهد که در شرایط طبیعی نگهداری شدند در مقایسه با نمونه های شاهد آزمایشگاهی تیمار شده با بافر فسفات از نظر طول و تعداد انشعابات عروقی اختلاف معنی دارنشان نداند. همچنین افزودن غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره زعفران تفاوت معنی دار در مهار رشد طول و تعداد انشعابات عروقی در حلقه آئورت نداشت. غلظت های ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره آبی زعفران تأثیر ممانعت کنندگی معنی دار بر روی رگ زایی مدل حلقه آئورت نشان داد و رشد جوانه های عروقی پس از اندکی دچار توقف شدند که بیان گر شدت عمل زعفران در مهار رگ زایی در این غلظت ها بر روی مدل مورد مطالعه می باشد.

Das و همکارانش در سال ۲۰۰۴ مکانیسم های احتمالی متعددی برای اثرات ضد توموری زعفران و اجزای آن شامل اسید نوکلئیک، واکنش زنجیره ای آزاد، اثر کارتنوئیدها بر توپوایزومراز ۲ و القای مرگ برنامه ریزی شده سلول پیشنهاد کردند (۲۰). از سوی دیگر نتایج تحقیقات صورت گرفته بیانگر این نکته می باشند که تجویز خوراکی عصاره زعفران در حیوان آزمایشگاهی میزان پیدایش سرطان مصنوعی القا شده به وسیله عوامل موتاژن را کاهش داده و سرعت رشد تومورها را مهار نموده و عمر جانور را طولانی تر می کند (۲۱).

پژوهش های متعدد نشان داده اند که درمان سرطان با روش شیمی درمانی مقاومت اکتسابی سلول سرطانی به داروی شیمی درمانی مشکل عمده ای را در درمان سرطان به وجود آورده است و از آنجا که میزان جهش و ناپایداری ژنتیکی در سلول های تومور سرطانی بسیار بالاست و تغییرات به سرعت در آن ها انجام می گیرد، این دسته از سلول ها نسبت به داروهای شیمی درمانی مقاومت پیدا می کنند، در حالی که سلول های اندوتلیال سلول هایی طبیعی اند که از نظر ژنتیکی پایدار بوده و میزان جهش در آن ها پایین است، بنابراین مهار رگ زایی توسط مواد طبیعی مثل گیاهان دارویی از جمله زعفران که در پژوهش حاضر از آن استفاده شده است بر پایه سرکوب سلول های اندوتلیالی انجام می شود باعث ایجاد مقاومت دارویی نمی شود و یا مقاومت کمتری ایجاد می کند (۲۲).

مرور تجربیات قبلی نشان می دهد که عصاره تام زعفران دارای فعالیت آنتی توموری بر علیه سلول های HepG است و نیز فعالیت ضد سرطانی عصاره تام زعفران علیه سرطان های القا شده توسط مواد شیمیایی به صورتی است که سه فرآیند مهم متابولیکی یعنی ساخت DNA و RNA و پروتئین را در سلول های سرطان انسانی متوقف و مهار می کند. این یافته ها نشان می دهند که اثر بازدارندگی زعفران روی سنتز اسید نوکلئیک می تواند یک اساس بیوشیمیایی برای اثر بازدارندگی آن روی تکثیر داشته باشد (۲۳). از آنجا که در تحقیق حاضر عصاره آبی زعفران منجر به کاهش رگ زایی شده به نظر می رسد نتایج هم راستا با نتایج تحقیقات متعدد قبلی است و تیمار بر حلقه آئورت احتمالاً از طریق مهار سنتز RNA و DNA در سلول اندوتلیوم عروق از تکثیر سلولی و رگ زایی ممانعت کرده باشد.

تحقیقات مختلفی گزارش کرده اند که کاروتنوئیدهای طبیعی استحصال شده از زعفران همچون کروسین و کروستین اثرات مهاری بر رشد و القای تمایز سلول ها در لوسمی دارد، از جمله این اجزا در مهار رشد و القای تمایز سلولی در لوسمی پرومیلوستیک موثرند (۲۴)؛ لذا ممکن است ماده موثره کروسین در عصاره زعفران مورد استفاده در مطالعه حاضر باعث مهار رشد و تمایز سلول در مسیر آنژیوژنز شده باشد.

سافرانال که یکی از اجزای اصلی زعفران است دارای اثرات محافظتی بر روی پراکسیداسیون لیپیدها است و از آنجا که میزان رگ زایی با اکسیژن رسانی بافتی مرتبط است و هیپوکسی یکی از علل آغاز رگ زایی به شمار می رود، این محتمل است که ازدیاد اکسیژن رسانی حاصل از تیمار با زعفران و ماده موثره آن یعنی سافرانال کاهنده آنژیوژنز باشد (۲۵). برخی تحقیقات گزارش کرده اند که زعفران به طور بالقوه اثرات آنتی ژنوتوکسیک و پیشگیری از سرطان دارد و می توان از آن به همراه داروهای شیمی درمانی استفاده کرد ازجمله اثرات زعفران بر تغییرات پراکسیداسیون لیپید و وضعیت آنتی اکسیدانی با مصرف سیس پلاتین سیکلوفسفامید مایتومایسین و بررسی و مشخص شده است که تجویز زعفران پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش و همزمان سطح آنتی اکسیدان های آنزیمی همچون سوپراکسید دیسموتاز کاتالاز و نیز آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی همچون گلوتاتیون احیا شده کبدی را افزایش می دهد (۲۶).

همچنین با انجام برخی تجربیات مکانیسم عمل ترکیبات زعفران را در سطح سلولی و مولکولی بررسی و گزارش شده است که کارتنوئیدها و مونوترپن الدهیدها به عنوان مهمترین اجزای زعفران می باشند که با DNA میان کنش می دهند و اثرات این ترکیبات بر ساختار الیگونوکلئوتیدها متفاوت است که منجر به خواص متفاوت این ترکیبات می شود (۲۷).

بخشی از اثرات مهارکنندگی ناشی از فعل و انفعالات زنجیره رادیکال آزاد است و اثرات سایتوتوکسیتی عصاره زعفران به میان کنش کارتنوئیدها و توپوایزومراز ۲ مربوط می باشد. از طرف دیگر با توجه به اینکه زعفران دارای لکتین است و حداقل بخشی از خواص آنتی توموری آن می تواند وابسته به لکتین باشد. بنابراین یکی دیگر از پیشنهادات می تواند القای آپوپتوز باشد (۲۸).

اساس مدل های سه بعدی آنژیوژنز بر پایه سلول های آندوتلیال فعال شده در جهت تهاجم به محیط های سه بعدی (ماتریکس) بنا نهاده شده است، این ماتریکس ممکن است ژل کلاژن یا فیبرین، ماتریژل یا مخلوطی از این پروتئین ها به همراه فاکتورهای دیگر باشد، به طور کلی مدل های سه بعدی نسبت به دو بعدی دارای ویژگی ها و شرایط نزدیکتر به محیط درون بدن هستند و در حقیقت بسته به ترکیب محیط کشت (درصد سرم، اضافه کردن فاکتورهای رشد و سایتوکاین ها)، در این نوع مدل ها، سلول ها را می توان برای جوانه زدن یا ایجاد انشعاب، تکثیر و مهاجرت و یا تمایز سه بعدی تحریک کرد (۲۹).

نتیجه گیری:

نتایج مطالعه حاضر برای اولین بار نشان داد عصاره آبی گیاه زعفران به صورت وابسته به دوز دارای اثر مهاری قوی بر روی رگ زایی در مدل رگ زایی حلقه آئورت موش صحرایی است. بنابراین می تواند انتخاب مناسبی برای مطالعات بیشتر به عنوان یک داروی مورد استفاده در حالت پاتولوژیک وابسته به رگ زایی نظیر سرطان قرار گیرد.

تشکر و قدردانی:

از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد که در اجرای این طرح صمیمانه همکاری داشتند سپاسگزاری می شود.

منابع:

1. Kaefer CM, Milner JA. The role of herbs and spices in cancer prevention. J Nutr Biochem. 2008; 19(6): 347-61.
2. Hosseinpour S, Adibah F. Impact of saffron as an anti-cancer and anti-tumor herb. African J Pharmacy Pharmacol. 2010; 4(11): 834-840.
3. Abdullaev FI, Espinosa-Aguirre JJ. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. Cancer Detect Prev. 2004; 28(6): 426-32.
4. 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.
6. Hosseinpour Chermahini S, Abd FA, Roji M, Taghizadeh E. Salehnezhah S. Impact of saffron as an anti-cancer and anti-tumor herb. Afr J Pharm Pharmacol. 2010; 4(11): 834-40.
7. Fernandez J. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. Biochim Biophys Acta. 2007; 1770(4): 578-84.
8. Mocan E, Nacu V, Tagadiuc O. Aspects of Collagen Isolation Procedure. Clin Res Stud. 2011; 2(320): 3-5.
9. Abolhasani A, Bathaie SZ, Yavari I, Moosavimovahedi A, Ghaffari M. Separation and purification of some components of Iranian saffron. Asian J Chem. 2005; 17(2): 727-9.
10. SadeghNiya H, Mofidpoor H, Brooshki M. Sudy of lipidperoxidation of saffranal on rat ischemic reperfusion. Mashhad Med Univ J. 2008; 14(4): 111-121.
11. Mousavi M, Baharara J, Zafar-Balanezhad S, Shaheokh-Abadi Kh. The effect of saffron aqua extract on angiogenesis in chick chorioalantoic membrane. Zahedan J Res Med Sci. 2013; 15(1): 29-32.
12. Ochiai T, Shimeno H, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanaka H, et al. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. Biochim Biophys Acta. 2007; 1770(4): 578-84.
13. Abdullaev FI, Espinosa-Aguirre JJ. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. Cancer Detect Prev. 2004; 28(6): 426-32.
14. Mansouri K, Mostafaei A, Mirshahi M, Mohammadi Motlagh HR, Ali Maleki A, Keshavarz M. Human coagulated plasma as a natural and low cost matrix for in vitro angiogenesis. IB J. 2009; 13(3): 179-183.
15. Mohammadi Motlagh HR, Mansouri K, Shakiba Y, Keshevarz M, Khodarahmi R, Siami A, et al. Anti-angiogenic effect of aqueous extract of shallot (Allium ascalonicum) bulbs in rat aorta ring model. Yakhteh Med J. 2009; 11(2): 184-89.
16. Mousavi M, Baharara J, Zafar-Balannezjad S, Nejadshahrokh abadi KH. The synergic effects of Saffron aqua extract and low frequency electromagnetic field on angiogenesis in chick chorioalantoic membrane. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013; 15(1): 1-10.
17. 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): 3443-7.
18. Wu CC, Ding SJ, Wang YH, Tang MJ, Chang HC. Mechanical properties of collagen gels derived from rats of different ages. J Biomater Sci Polym Ed. 2005; 16(10): 1261-75.
19. Mohammadi Motlagh H, Mansouri K, Shakiba Y, Mostafaie A. Anti-Angiogenic Effect of Aqueous Extract of Shallot (*Allium ascalonicum*) Bulbs in Rat Aorta Ring Model. Yakhteh Med J. 2009; 11(2): 190-95.
20. Das I, Das S, Saha T. Saffron suppresses oxidative stress in DMBA-induced skin carcinoma: A histopathological study. Acta Histochem. 2010; 112(4): 317-27.
21. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (Crocus sativus L.). Exp Biol Med (Maywood). 2002; 227(1): 20-5.
22. Mousavi H, Tavakkol-Afshari J, Brook A. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. Food Chem Toxicol. 2008; 46(11): 3443–47.
23. Shahrokhabadi k, Tavakkol-Afshari J, Brook A. Study of cytotoxic effects of saffron in HepG-2 Cells. Azad Med Univ J. 2009; 19(3): 154-159.

24 Mousavi SH, Tavakkol-Afshari J, Brook A, Jafari-Anarkooli I. Role of caspases and Bax protein in saffron-induced apoptosis in MCF-7 cells. Food Chem Toxicol. 2009; 47(8): 1909-13.
25. Fadzilah A, Abd M, Roji M, et al. Impact of saffron as an anti-cancer and anti-tumor herb. Afr J Pharm Pharmacol. 2010; 4(11): 834-840.
26 Premkumar K, Abraham SK, Santhiya ST, Ramesh A. Protective effects of saffron (Crocus sativus Linn.) on genotoxins-induced oxidative stress in Swiss albino mice. Phytother Res. 2003; 17(6): 614-7.
27. Kaefer CM, Milner JA. The role of herbs and spices in cancer prevention. J Nutr Biochem. 2008; 19(6): 347-61.
28. Tavakkol-Afshari J, Brook A, Mousavi SH. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. Food chemic toxicol. 2008; 46(11): 3443-7.
29. Mostafaie A, Mohammadi-Motlagh HR, Mansouri K. Angiogenesis and the models to study. Cell J Yakhteh. 2010; 11(4): 374-81.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2014 Jul, Aug; 16(3):79 -88. **Original article**

Antiangiogenesis effect of saffron extract (*Crocus sativius* L.) on a Wistar rat aortic ring model

Moshtagh S, Baharara J*, Zafar-Balanejad S, Ramezani T
Research Center for Animal Development Applied Biology & Biology Dept., Mashhad Branch, Islamic Azad, University, Mashhad, I.R. Iran.
Received: 11/Aug/2013 Accepted: 12/Jan/2014

Background and aims: Saffron (*Crocus sativius* L.) has various pharmacological effects. Angiogenesis for embryogenesis and in many physiological and pathological events such as tumor growth is essential. The aim of the present study was to investigate the effect of aqueous extract of saffron in aortic rings of Wistar rats.
Methods: In this experimental study, aorta of Wistar rat cut into pieces 1 mm and were cultured in the collagen matrix extracted. After observation the first vascular sprouts from aortic rings on the third day, samples were divided into 5 groups: control, Laboratory control (treated with PBS), experimental group 1 (treatment with aqueous extract of saffron concentration 150 µg/ml), experimental group 2 (200µg/ml), and experimental group 3 (300 µg/ml). Angiogenesis was assessed with invert microscope 24 h after treatment and all cases were photographed. Numbers and the length of vessels were measured by Image J software.
Results: The average number and the length of vessels in control group compared with the laboratory control samples showed no significant difference ($P>0.05$). The average length and number of blood vessels in experimental group 1 compared with control group showed no significant changes ($P>0.05$), but in the experimental group 2 and 3 showed a significant decrease ($P<0.05$).
Conclusion: The aqueous extract of saffron has control effect in a dose dependent inhibition of angiogenesis. Therefore, regarding to the side effects of chemical drugs, the use of medicinal plants such as saffron with minimal effects can be effective in inhibiting angiogenesis.

Keywords: **Angiogenesis, Aortic ring, Endothelial cell, Saffron, Rat.**

Cite this article as: Moshtagh S, Baharara J, Zafar-Balanejad S, Ramezani T. Antiangiogenesis effect of saffron extract (*Crocus sativius* L.) on a Wistar rat aortic ring model. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(3): 79-88.

***Corresponding author:**
Biology Dept., Islamic Azad University, Mashhad Branch, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 05118437092, E-mail: baharara@yahoo.com