

## بررسی اثرات توأم عصاره تام الکی پوسته کیتون *lamyi* خلیج فارس و بافت سلول زدایی شده مغز رت بر آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه

جواد بهار آرا<sup>۱</sup>، تکتتم جوان جعفری بجنوردی<sup>۲</sup>، ناصر مهدوی شهری<sup>۳</sup>، سعیده ظفربالانژاد<sup>۴</sup>

۱- دانشیار، دکتری تخصصی زیست شناسی تکوین جانوری، گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران. [baharara@yahoo.com](mailto:baharara@yahoo.com)

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.

۳- استاد، دکتری تخصصی هیستولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۴- مربی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۵

### چکیده

زمینه و هدف: کیتون ها به دلیل وجود کیتین و کیتوسان در پوسته آن ها از لحاظ پزشکی از اهمیت خاصی برخوردارند. به دلیل اهمیت آنژیوژنز و از آن جایی که فرآیند پیچیده ای شامل برهم کنش فاکتورهای محلول سلول و اجزاء ماتریکس خارج سلولی می باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات توأم عصاره الکی پوسته کیتون و بافت سلول زدایی شده مغز رت بر آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه است.

روش کار: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، بافت مغز رت سلول زدایی شد. ۵۰ عدد تخم مرغ نطفه دار به طور تصادفی در ۵ گروه مساوی شاهد (بدون تیمار)، شاهد آزمایشگاهی ۱ (تیمار با DMSO)، شاهد آزمایشگاهی ۲ (تیمار با مغز سلول زدایی شده)، تجربی ۱ (تیمار با عصاره) و تجربی ۲ (تیمار توأم عصاره و بافت سلول زدایی شده مغز) توزیع شدند. در روز دوازدهم انکوباسیون از تمام نمونه ها عکس برداری و تعداد و طول انشعابات عروقی در محل تیمار روی پرده کوریوآلانتوئیک به کمک نرم افزار Image J بررسی و به کمک نرم افزار SPSS و آزمون آماری ANOVA و Tukey در سطح ( $p < 0.05$ ) تحلیل گردید.

یافته ها: در مقایسه میانگین تعداد ( $10/34 \pm 1/85$ ) و طول ( $13/12 \pm 2/04$  mm) عروق خونی در گروه شاهد و تعداد ( $6/06 \pm 1/36$ ) و طول ( $9/76 \pm 1/21$  mm) انشعابات عروقی در گروه تجربی ۱، کاهش معنی دار مشاهده شد ( $p < 0.001$ ). هم چنین میانگین تعداد ( $1/04 \pm 8/75$ ) و طول ( $11/43 \pm 1/42$  mm) عروق خونی در گروه تجربی ۲ با تعداد و طول عروق خونی در گروه شاهد کاهش معنی دار نشان داد ( $p < 0.05$ ).

نتیجه گیری: کاربرد توأم عصاره پوسته کیتون خلیج فارس و بافت سلول زدایی شده مغز رت باعث کاهش آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک می شود.

واژه های کلیدی: آنژیوژنز، کیتون، پرده کوریوآلانتوئیک، مغز، سلول زدایی.

### مقدمه

فاکتورهای تعدیل کننده ی متنوعی کنترل می شود (۲۶). از بین رفتن تعادل بین فاکتورهای پروآنژیوژنیک و آنتی آنژیوژنیک، به طور مداوم منجر به ایجاد شرایط پاتولوژیک و ایجاد بیماری های زیادی از جمله تومور، آرتريت روماتوئید، پسونیازیس، دژنره شدن عضله و افزایش رتینوپاتی می شود (۲۷). در سال های اخیر مهار رگرایی به عنوان ایده ای نوین در کنترل و درمان انواعی از اختلالات وابسته به رگرایی به ویژه رشد و متاستاز

آنژیوژنز فرآیندی لازم در عملکرد طبیعی بدن است و در صورتی که تعادل بین عوامل القاء کننده و مهارکننده آنژیوژنز از بین برود شرایط برای بروز برخی بیماری ها به وجود می آید؛ در این فرآیند، ۱۰ مرحله متوالی در نظر گرفته می شود که یک یا چند مرحله از آن می تواند هدف عوامل محرک و یا بازدارنده آنژیوژنز باشد (۱۰). هم چنین این فرآیند به فعل و انفعالات وسیع بین سلول ها و مولکول های مختلفی وابسته است و توسط پپتیدها و

برهمکنش‌های ماتریکس خارج سلولی، تنظیم شده است (۲۸). به خاطر اهمیت آنژیوژنز در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی، بسیاری از محققین آنژیوژنز را در انواعی از مدل‌های آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار داده اند؛ برای انجام این گونه مطالعات، پرده‌ی کوریوآلانتوئیک جوجه (CAM) به عنوان یک محیط مناسب درون تنی در بررسی آنژیوژنز مطلوب می‌باشد و واجد مزایای متعددی از جمله سهولت در انجام کار، ساده بودن تجهیزات مورد نیاز برای بررسی دقیق، کم بودن ملاحظات اخلاق زیستی در مقایسه با سایر مدل‌های *in vivo* و نیز تکرار پذیری بالا می‌باشد (۱۹). مطالعات مختلف نشان داده که ترکیبات طبیعی بدون این که سمیت قابل توجه و عوارض جدی بر بافت‌های طبیعی داشته باشند، به طور اختصاصی با تشکیل عروق جدید در تومورها مقابله می‌نمایند؛ بنابراین، مصرف رژیم غذایی غنی از ترکیبات طبیعی می‌تواند از گسترش و پیشرفت بیماری‌های مزمن مثل تومورهای بدخیم که گسترش و پیشرفت آن‌ها با رگزایی ارتباط دارد، جلوگیری کند (۲۰). کیتون‌ها گروهی قدیمی و متنوع از نرم تنان هستند که بیش از ۹۴۰ گونه ی زنده و در حدود ۴۳۰ نمونه ی فسیل آن‌ها در سراسر جهان شناسایی شده است و نمونه‌های فسیلی آن‌ها قدمتی نزدیک به نیم میلیارد سال دارند (۲۹،۳۲). به دلیل وجود ترکیبات کیتین و کیتوسان در پوسته پلی پلاکوفورا و دارا بودن ترکیبات شیمیایی بسیار در بدنه و پوسته آن‌ها، کیتون‌ها می‌توانند حائز اهمیت باشند (۲۳). هدف از اجرای این پروژه بررسی اثرات کاربرد توأم عصاره پوسته کیتون و بافت سلول زدایی شده مغزرت بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک بود.

### مواد و روش‌ها

این پژوهش در مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در سال ۹۲ به صورت تجربی

تومور مطرح شده است (۱۵). این ایده که فرآیند آنژیوژنز می‌تواند هدفی برای درمان باشد، پس از مشخص شدن این که گسترش تومور توپر (solid tumor) نیازمند ایجاد رگ‌های جدید است مطرح گردید (۲۵). شواهد نشان دهنده ارتباط میان آنژیوژنز و متاستاز در انواع مختلف سرطان از جمله سرطان‌های پستان، ریه، معده، تخمدان و ملانوما می‌باشد (۸). علاوه بر این، مطالعات اخیر به اثبات رسانده اند که بیماری‌هایی از قبیل لوسمی و لنفوما هم وابسته به آنژیوژنز هستند؛ در واقع افزایش بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی VEGF (Vascular endothelial growth factor) و فاکتور رشد فیبروبلاستی FGF (Fibroblast growth factor) در لوسمی حاد میلوئیدی، لوسمی لنفوئیدی حاد و لنفوما مشاهده شده است و به همین دلیل، آنژیوژنز می‌تواند یک هدف درمانی برای تومورهای خونی نیز باشد (۱۵). داربست‌های بیولوژیکی تشکیل شده از ماتریکس خارج سلولی دارای ترکیبات پیچیده با تنوعی از پروتئین‌های عملکردی و ساختاری مختلف است که کاملاً منطبق با فرآیندهای سلولی لازم برای فعالیت‌های طبیعی بافت یا ارگان می‌باشد (۴). هر بافتی هم از مواد سلولی و هم از ماتریکس خارج سلولی (ECM) با درجه فشردگی مشخصی تشکیل شده است بنابر این اجزای ECM باید در طی فرآیند سلول زدایی به اندازه کافی از هم باز شده تا همه سلول‌ها و محتویات آن‌ها بتوانند از درون ECM خارج شوند (۶). ECM مغز شامل مقادیر کمی پروتئین‌های فیبری مانند فیبرونکتین، ویترونکتین و کلاژن و یا پروتئین‌های غشای پایه مثل لامینین است؛ اما دارای مقادیر زیادی از گلیکوز آمینو گلیکان (GAGs) و پروتئوگلیکان‌ها می‌باشد (۱۴). در طی رگزایی، رشد سلول‌های اندوتلیال، مهاجرت و تشکیل لوله، توسط فاکتورهای پروآنژیوژنیک، آنتی آنژیوژنیک، پروتئازهای کاهنده‌ی ماتریکس و

مقطر استریل شستشو شدند تا اثر الکل ۷۵٪ از بین برود. در پایان نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در محلول فسفات بافر سالین (PBS) استریل و ۲۰۰ میکرولیتر آنتی بیوتیک پنی سیلین استرپتومایسین (GIBCO, USA) قرار گرفتند (۲۴). در این مرحله داربست تهیه شده آماده برای قرار دادن بر روی پرده کوریوآلاتوئیک می باشد. به منظور بررسی سلول زدایی بافت مغز از رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین استفاده شد. برای انجام آزمایشات *in vivo* از تخم مرغ های نطفه دار نژاد Ross به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده گردید. ۵۰ عدد تخم مرغ نطفه دار از شرکت مرغداران طوس مشهد خریداری و درون دستگاه جوجه کشی با دمای ۳۸ درجه سانتی-گراد و رطوبت ۶۳-۶۵٪ قرار گرفتند و در روز دوم انکوباسیون در شرایط استریل و زیر هود لامینار (Telestar, Spain) به کمک پنس استریل، در سمت پهن تخم مرغ سوراخی کوچک ایجاد و متعاقب آن پنجره ای در یک سمت آن ایجاد و محل آن به وسیله لامل و پارافین استریل پوشانده و تخم مرغ ها به دستگاه جوجه کشی برگردانده شدند. تخم مرغ ها در ۵ گروه مساوی و به طور تصادفی تقسیم شدند: گروه شاهد، تخم مرغ های این گروه در روز نخست در دستگاه جوجه کشی قرار داده شد و پس از ۴۸ ساعت از انکوباسیون نسبت به ایجاد پنجره اقدام شد و تا روز دوازدهم در همین وضعیت و بدون تیمار انکوبه شدند. گروه شاهد آزمایشگاهی ۱ که در روز نخست در دستگاه جوجه کشی قرار داده شدند و پس از ۴۸ ساعت از انکوباسیون، نسبت به ایجاد پنجره اقدام شد و در روز هشتم به یک اسفنج ژلاتینی که شامل آلبومین سفیده تخم مرغ و محلول آگار در نرمال سالین به نسبت مساوی به همراه ۲۰۰ میکرولیتر پنی سیلین استرپتومایسین (GIBCO, USA)، که به صورت تازه در شرایط استریل تهیه شده بود و در ابعاد ۴×۴×۱ میلی متر، محلول DMSO اضافه گردید

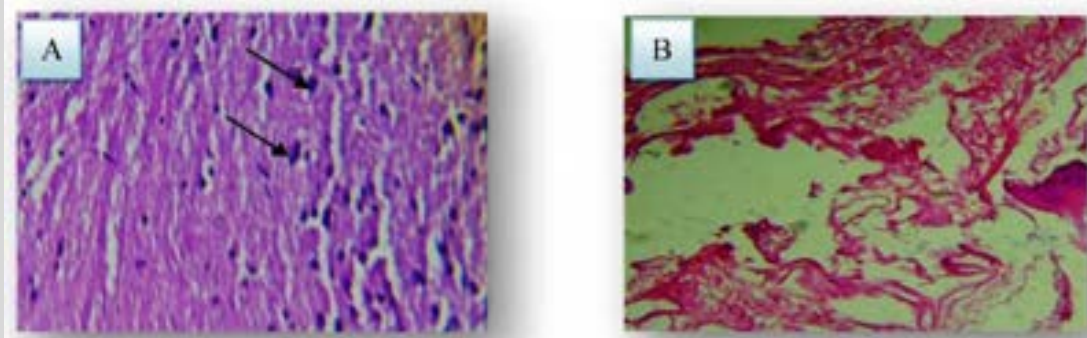
آزمایشگاهی انجام گردید. کیتون ها از سواحل خلیج فارس جمع آوری و شناسایی گونه شدند، عصاره گیری از پوسته کیتون به روش غوطه وری ۱۰ درصد جرمی - حجمی با استفاده از حلال متانول ۹۶ درصد انجام شد؛ در این تحقیق برای سلول زدایی بافت مغز رت از سه روش فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی استفاده شد. روش های معمول برای سلول زدایی از بافت ها شامل ترکیبی از تیمارهای فیزیکی و شیمیایی می باشند؛ اساساً بهترین روش سلول زدایی روشی است که در آن به هم ریختگی ماتریکس بافت به حداقل رسیده و از طرفی ویژگی های مکانیکی و بیولوژیکی بافت حفظ گردند؛ قوی ترین روش های سلول زدایی شامل ترکیبی از روش های فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی می باشد (۶).  
**روش فیزیکی:** ابتدا مغز رت را خارج و پس از جدا نمودن مخچه و شستشو آن، مراحل سلول زدایی انجام گردید. در ابتدا از روش فیزیکی برای سلول زدایی استفاده و نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت درون فریزر و دمای ۴- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۲۲)، در طی این مدت هر ۶ ساعت یک بار نمونه ها از فریزر خارج و با آب مقطر شستشو داده شدند، سپس به مدت ۱ ساعت نمونه ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند.  
**روش شیمیایی:** مرحله دوم سلول زدایی به صورت شیمیایی انجام شد (۵). نمونه ها به محلول SDS ۰/۵٪ (Merck, Germany) به مدت ۱۰ ساعت منتقل و با دور کم (۱۰۰ دور در دقیقه) شیکر شدند.  
**روش آنزیمی:** برای تکمیل سلول زدایی از روش آنزیمی نیز استفاده شد و نمونه ها در محلول آنزیمی (Thermo (1mlMgCL<sub>2</sub>, 1mlEDTA, Dnase 11000U Scientific) به مدت ۱۰ ساعت قرار داده شد. پس از آن در ۳ مرحله در اتانول ۷۵٪ که به عنوان حلال SDS (Sodium Dodesyl Sulphat) محسوب می شود قرار گرفتند و در پایان هر مرحله نمونه ها توسط آب

میکروگرم در میلی لیتر پوسته کیتون بر روی آن تزریق شد. روز دوازدهم انکوباسیون برای عکس برداری انتخاب گردید (۳) و در تمام نمونه های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تیمار، از محدوده محل قرارگیری اسفنج ژلاتینی و بافت مغز سلول زدایی شده به کمک فوتو استرنو میکروسکوپ تحقیقاتی (Ziess, Germany) عکس برداری شد (شکل ۲). متغیرهای مورد بررسی عبارت بودند از تعداد و طول انشعابات عروقی که در سطح مقطع یکسان ۴ مربع در ۴ طرف اسفنج ژلاتینی برای تمام نمونه ها با استفاده از نرم افزار imageJ اندازه گیری شد. داده ها با استفاده از آزمون آماری ANOVA و تست تعقیبی Tukey در سطح معنی دار ( $p < 0.05$ ) تجزیه و تحلیل شدند.

### نتایج

از رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین (H&E) جهت تأیید عدم وجود سلول ها در نمونه های سلول زدایی شده در مقایسه با بافت مغز رت قبل از سلول زدایی به صورت طبیعی استفاده شد. مطالعه با این رنگ آمیزی نشان داد که نمونه تجربی که توسط روش های فیزیکی، شیمیایی و آنژیومی به صورت ترکیبی سلول زدایی شده، نسبت به نمونه شاهد کاملاً فاقد سلول شده است (شکل ۱).

(حلال مورد استفاده برای حل نمودن پوسته کیتون) که طی آن بررسی عدم اثر تداخلی حلال بر روند رگزایی تحت تیمار با محلول پوسته کیتون انجام شد. گروه شاهد آزمایشگاهی ۲ که در روز هشتم برشی از بافت مغز رت که طی مراحل سلول زدایی و استریل شده، تحت شرایط استریل و زیر هود لامینار بر روی پرده کوریوآلانتوئیک قرار داده شد. در گروه تجربی ۱ تخم مرغ ها در روز ۸ انکوباسیون پس از گذاشتن اسفنج ژلاتینی به ابعاد ۴×۴ میلی متر بر روی پرده کوریوآلانتوئیک، میزان ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر (با توجه به این که نمی توان حجم بیشتر از ۱۰ میکرولیتر از عصاره به جنین جوجه تزریق نمود) از عصاره که در DMSO حل شده و قبلاً از فیلتر ۰/۴۵ عبور داده شده تزریق شد و سپس مجدداً توسط لامل و پارافین استریل مسدود و تخم مرغ ها به دستگاه برگردانده شدند. گروه تجربی ۲: نمونه ها تحت تیمار توأم عصاره پوسته کیتون و بافت سلول زدایی شده مغز رت قرار گرفتند به این صورت که در روز هشت انکوباسیون به جای قرار دادن اسفنج ژلاتینی برشی به اندازه ۱ میلی متر مکعب از بافت سلول زدایی شده مغز رت بر روی پرده کوریوآلانتوئیک قرار داده شد و سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از عصاره ۱۰



شکل ۱- نمایشی از سلول زدایی بافت مغز رت با رنگ آمیزی هماتوکسیلین- اتوزین

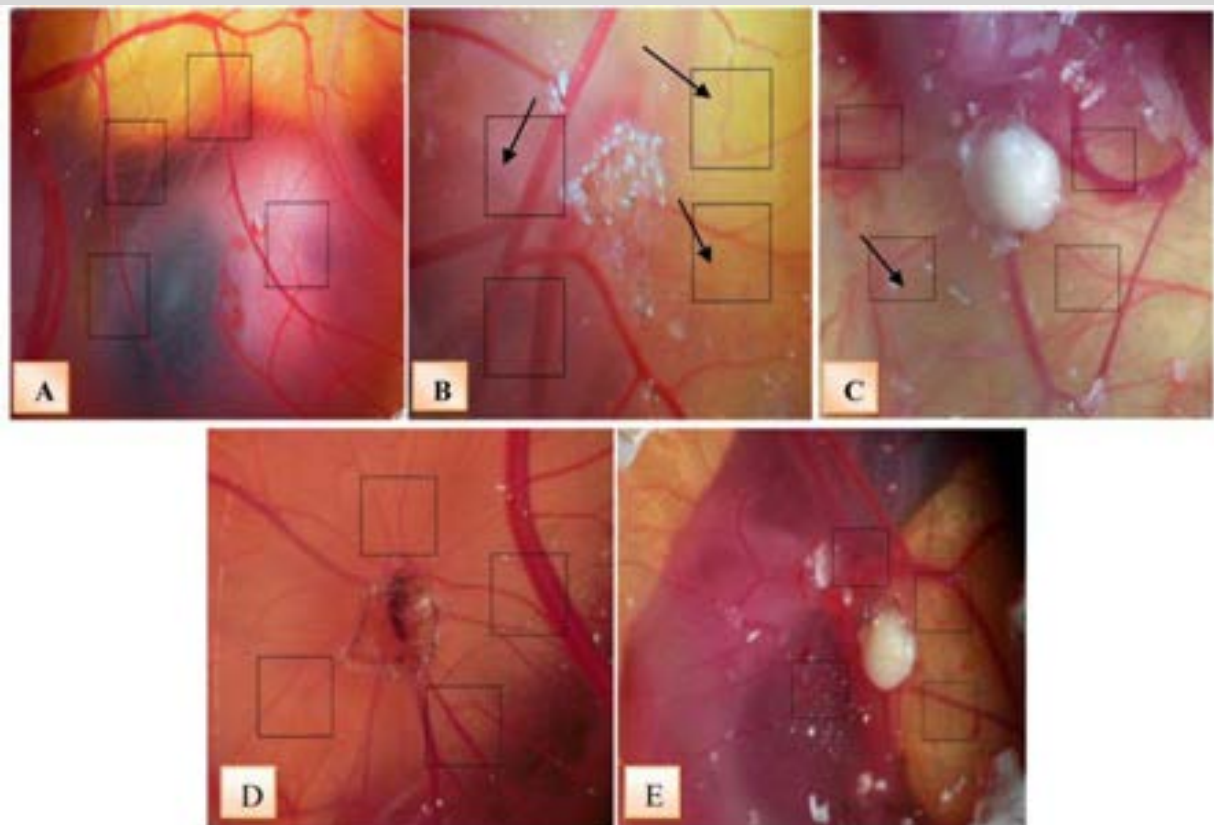
(A) برش بافت مغز قبل از سلول زدایی (بزرگنمایی ۱۰۰x): فلش ها نشان دهنده هسته های موجود در بافت، (B) برش بافتی بعد از سلول زدایی (بزرگنمایی ۴۰۰x)

خونی در گروه شاهد آزمایشگاهی ۱ اختلاف معنی دار نشان نداد ( $p < 0.05$ ). بنابراین در بررسی های بعدی تمام گروه ها با گروه شاهد مقایسه شدند. مقایسه میانگین

مقایسه میانگین تعداد ( $10/34 \pm 1/85$ ) و طول ( $13/12 \pm 2/04$  mm) عروق خونی در گروه شاهد با تعداد ( $9/97 \pm 1/38$ ) و طول ( $13/42 \pm 1/08$  mm) عروق

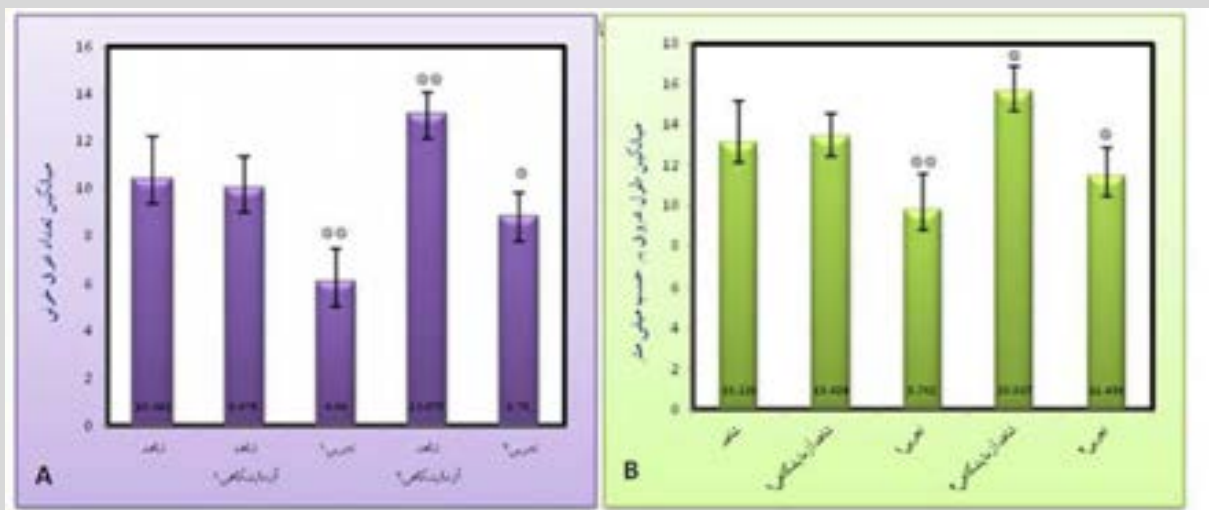
عروق خونی در گروه شاهد کاهش معنی دار نشان داد ( $p < 0/05$ ). در مقایسه میانگین تعداد عروق خونی در گروه تجربی ۱ ( $1/36 \pm 6/06$ ) و گروه تجربی ۲ ( $1/04 \pm 8/75$ ) اختلاف معنی دار به شکل کاهش تعداد در گروه تجربی ۱ نسبت به ۲ مشاهده شد ( $p < 0/001$ ). همچنین در مقایسه میانگین طول عروق خونی در گروه تجربی ۱ ( $1/82 \text{mm} \pm 9/76$ ) و گروه تجربی ۲ ( $1/42 \text{mm} \pm 11/43$ ) اختلاف معنی دار به شکل کاهش طول در گروه تجربی ۱ نسبت به ۲ مشاهده شد ( $p < 0/05$ ) (شکل ۲).

تعداد ( $1/36 \pm 6/06$ ) و طول ( $1/21 \text{mm} \pm 9/76$ ) عروق خونی در گروه تجربی ۱ با تعداد و طول عروق خونی در گروه شاهد کاهش معنی دار نشان داد ( $p < 0/001$ ). در مقایسه میانگین تعداد عروق خونی در گروه شاهد و شاهد آزمایشگاهی ۲ با عدد میانگین ( $13/07 \pm 0/97$ )، افزایش معنی دار مشاهده شد ( $p < 0/001$ ). همچنین در مقایسه میانگین طول عروق خونی در گروه شاهد و شاهد آزمایشگاهی ۲ با عدد میانگین ( $15/62 \pm 1/21 \text{mm}$ )، افزایش معنی دار مشاهده شد ( $p < 0/05$ )، (نمودار ۱). مقایسه میانگین تعداد ( $1/04 \pm 8/75$ ) و طول ( $1/42 \text{mm} \pm 11/43$ ) عروق خونی در گروه تجربی ۲ با تعداد و طول



شکل ۲- تصویر فتواسترئومیکروسکوپ تحقیقاتی از گروه‌های مختلف آزمون

A: نمونه شاهد، B: نمونه گروه تجربی ۱، C: نمونه گروه تجربی ۲، D: نمونه شاهد آزمایشگاهی ۱، E: نمونه شاهد آزمایشگاهی ۲.



نمودار ۱- اثر تیمار های مختلف عصاره الکی پوسته کیتون و بافت سلول زدایی شده مغز رت بر میانگین تعداد عروق خونی (A) و میانگین طول عروق خونی (B)

\* اختلاف معنی داری در سطح (p < 0.05)، \*\* اختلاف معنی داری در سطح (p < 0.01)

نوعی جلبک قهوه ای را در مدل CAM بررسی کردند و نتایج نشان داد که این پلی ساکارید در یک رفتار وابسته به دوز باعث کاهش آنژیوژنز می شود (Ganesan, ۲۱). و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که ترکیب siphonaxanthin که از جلبک سبز مشتق می شود می تواند باعث مهار آنژیوژنز در *in vivo* و *in vitro* شود (Lee, ۱۱). و همکارانش در ۲۰۰۳ اثرات ضد آنژیوژنیک گلیکوز آمینو گلیکان *acharan sulfate* را که از گونه ای نرم تن (*Achatina fulica* (حلزون) استخراج شده بود، بر روی پرده کوریوآلانتوئیک بررسی کردند و نشان دادند که این ترکیب طی یک رفتار وابسته به دوز باعث کاهش آنژیوژنز می شود (۱۶). رگزایی غیرطبیعی نقش مهمی در اختلالات ایمنی، التهابات، عفونت ها، ایسکمی و رشد تومور دارد؛ مدل CAM برای بررسی آنژیوژنز در انواع داربست های بیولوژیک استفاده شده، از جمله استفاده از پلی لاکتیک اسید که به عنوان داربست زیستی بر روی پرده کوریوآلانتوئیک قرار داده شده و نفوذ عروق در داربست بعد از ۴ روز از قرار دادن آن مشاهده شد (۳۰). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که ماتریکس سلول زدایی شده بافت مغز رت

## بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده توأم عصاره الکی پوسته کیتون و بافت سلول زدایی شده مغز رت باعث کاهش آنژیوژنز نسبت به گروه شاهد می شود که این اثر نسبت به اثر کاهشی حاصل از عصاره پوسته کیتون به تنهایی بر تعداد و طول عروق کمتر می باشد. همچنین استفاده از بافت سلول زدایی شده مغز رت به تنهایی در پرده کوریوآلانتوئیک باعث افزایش میانگین تعداد و طول عروق خونی نسبت به گروه شاهد می شود. که این اثرات نشان دهنده نوعی برهم کنش میان ترکیبات موجود در عصاره و ماتریکس بافت مغز می باشد. به طور کلی آنژیوژنز نقش مؤثری در فرآیندهایی مانند تمایز جنینی، پاتولوژی و فیزیولوژی طبیعی دارد. Namvar و همکارانش در سال ۲۰۱۳ از مدل پرده کوریوآلانتوئیک برای بررسی اثر عصاره ی متانولی جلبک *Sargassum* بر آنژیوژنز استفاده کردند؛ نتایج تحقیق آن ها نشان داد که عصاره جلبک سارگاسوم می تواند باعث کاهش طول و تعداد عروق خونی در مدل CAM شود (۲۱). هم چنین آن ها در سال ۲۰۱۱ اثرات آنژیوژنیک نوعی پلی ساکارید مشتق شده از عصاره

باعث ایجاد اثر مخالف بر فعالیت آنژیوژنیک بافت سلول زدایی شده مغز رت در پرده کوریوآلانتوئیک شد که نشان دهنده اثر ضد آنژیوژنیک این عصاره می باشد. آنژیوژنز به شدت توسط وقایع بین سلول های اندوتلیال عروقی و پروتئین های موجود در ماتریکس خارج سلولی تنظیم می شود؛ فیبرین و کلاژن نوع ۱ دو ترکیب اصلی ECM می باشند که نشان داده شده باعث افزایش آنژیوژنز در ترمیم و رشد تومور می شوند (۹). اثرات آنژیوژنیک بافت سلول زدایی شده مغز رت قبلاً توسط Ribatti به اثبات رسیده است؛ نتایج بررسی Ribatti و همکارانش در سال ۲۰۰۳، برای اولین بار نشان داد که داربست سلول زدایی شده مغز رت زمانی که بر روی پرده کوریو آلانتوئیک قرار داده شود، دارای قابلیت القاء پاسخ آنژیوژنیک است که قابل مقایسه با فاکتور آنژیوژنیک FGF2 می باشد، هم چنین آن ها بیان داشتند که این اثر احتمالاً به دلیل القاء آزادسازی فاکتورهای رشد آندوژن FGF2 و VEGF از ماتریکس خارج سلولی باشد یا این اثر به دلیل وجود TGFβ-1 در ماتریکس سلول زدایی شده باشد (۲۴). نتایج تحقیق Ribatti کاملاً همسو و منطبق با پژوهش حاضر می باشد. Mammoto و همکارانش در سال ۲۰۱۳ اثرات ساختارهای کلاژنی ماتریکس خارج سلولی را بر آنژیوژنز تومور مغزی نشان دادند (۱۸). در پژوهشی دیگر Haag و همکارانش در سال ۲۰۱۲ سلول زدایی بافت نای (trachea) رت را با روش های آنزیمی انجام دادند و با قرار دادن بافت سلول زدایی شده بر روی پرده کوریو آلانتوئیک افزایش رگزایی حاصل از ماتریکس را در این مدل به اثبات رساندند (۱۲). نتایج سلول زدایی بافت CNS خوک (شامل بافت مغز، عصب بینایی و طناب نخاعی) که توسط Crapo و همکارانش در ۲۰۱۲ انجام شد وجود فاکتورهای VEGF، bFGF و پروتئین لامینین را در ماتریکس بدون سلول نشان داد و بیان داشتند که

نیز به عنوان داربست بیولوژیک می تواند باعث افزایش طول و تعداد عروق در پرده کوریوآلانتوئیک شود. نتایج تحقیق Wu و همکارانش در سال ۲۰۱۲ اثرات غلظت های مختلف کیتو اولیگو ساکارید (که از هیدرولیز کیتوسان به دست می آید) را بر آنژیوژنز پرده ی کوریوآلانتوئیک نشان داد که بر اساس آن کیتو اولیگو ساکاریدها باعث کاهش تشکیل و رشد عروق در مدل CAM می شوند (۳۳). Zhang و همکارانش برای اولین بار اثرات کیتو اولیگو ساکارید دریایی را بر فعال سازی و بیان ماتریکس متالو پروتئیناز ۲ در فیروبلست های پوستی انسان بررسی کردند و نشان دادند که کیتو اولیگو ساکاریدهای دریایی باعث مهار بیان این پروتئین و فعالیت ماتریکس متالو پروتئیناز می شوند (۳۴). به دلیل وجود کیتین و کیتوسان در نرم تنان (۱، ۲) و اثرات ضد آنژیوژنیک کیتو اولیگو ساکاریدها (۳۳)، احتمالاً یکی از دلایل اثر کاهشی عصاره پوسته کیتون بر آنژیوژنز به دلیل وجود کیتین و کیتوسان در پوسته آن ها است که کیتو اولیگو ساکاریدهای موجود در پوسته کیتون می توانند باعث مهار فعالیت ماتریکس متالو پروتئیناز موجود در ماتریکس بافت مغز شده و کاهش آنژیوژنز را منجر شوند. کیتین و کیتوسان دارای خواص ضد میکروبی هستند؛ هم چنین در برخی کاربردهای پزشکی اثرات ضد توموری آن ها نشان داده شده، فعالیت ضد توموری کیتین و کیتوسان از طریق تحریک سیستم ایمنی (تولید اینترلوکین ۱، ۲، NK و غیره) صورت می گیرد (۳۱). برپایه اثرات مهاری آنژیوژنز و القاء آپوپتوز فعالیت ضد توموری وضد آنژیوژنزی کیتو اولیگو ساکاریدها در *in vivo* و *in vitro* به اثبات رسیده است (۱۳، ۳۱). برخی مطالعات نشان داده اند که این ترکیبات باعث کاهش روند پیشرفت بیماری های مزمن می شوند و در مطالعات دیگری فعالیت ضد سرطانی و ضد التهابی آن ها بیان شده است (۱۷). در تحقیق حاضر نیز عصاره پوسته کیتون

داربست بیولوژیکی برای اهداف مهندسی بافت و ترمیم بافت های آسیب دیده خصوصاً بافت عصبی و رشد و گسترش رگزایی پیشنهاد نمود. هم‌چنین اثر آنژیوژنیک ماتریکس مغز با استفاده‌ی هم‌زمان با عصاره پوسته کیتون کاهش می‌یابد.

### تشکر و قدردانی

از کلیه پژوهشگران مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین دانشگاه آزاد اسلامی مشهد که در انجام این پروژه همکاری و مساعدت نمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

ماتریکس بدون سلول مشتق از بافت عصبی بیشتر از ماتریکس بافت های غیر عصبی قابلیت بازسازی و ترمیم بافت عصبی را دارد (۷). در پژوهش حاضر نیز مشاهده گردید که بافت سلول زدایی شده مغز رت می‌تواند باعث افزایش معنی دار طول ( $p < 0/05$ ) و تعداد ( $p < 0/001$ ) عروق خونی در پرده کوریو آلتوتوئیک شود. این اثر می‌تواند در اثر تحریک فاکتورهای آنژیوژنیک موجود در پرده کوریو آلتوتوئیک و یا القاء افزایش بیان پروتئین های پرو آنژیوژنیک باشد. نتایج این پژوهش بیان گر آن است که ماتریکس سلول زدایی شده ی بافت مغز رت، باعث افزایش آنژیوژنز در شرایط درون تنی می‌شود و می‌توان آن را به عنوان یک

### منابع

1. Abdou, E.S., Nagy, KH., Elsabee, MZ. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99(5);1359–1367.
2. Al Sagheer, FA., Al-Sughayer, MA., Muslim, S., Elsabee, MZ. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, 77(1); 410–419.
3. Baharara, J., Ashraf, A., Balanejad, S., Samareh-Mosavi, S. (2010). The inhibitory effect of low frequency electromagnetic field (50Hz) on angiogenesis in chorioalantoic membrane of chick. *Zahedan J Res Med Sci*, 12(2); 12-18.
4. Baigueraa, S., Gaudio, CD., Lucatelli, E., Kuevdac, E. (2014). Electrospun gelatin scaffolds incorporating rat decellularized brain extracellular matrix for neural tissue engineering. *Biomaterials*, 35(4);1205-1214.
5. Barnes, CA., Brison, J., Michel, R., Brown, BN. (2011). The surface molecular functionality of decellularized extracellular matrices. *J Biomaterials*, 32(1); 137-143.
6. Crapo, PM., Gilbert, TW., Badylak, SF. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *J Biomaterials*, 32(12); 3233-3243.
7. Crapo, PM., Medberry, CJ., Reing, JE., Tottey, S. (2012). Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials*, 33(13); 3539–3547.
8. Esfandiary Yeganeh, N., Galustanian, N., Nasirzadeh Goljahi, A., Ghodrati, M. (2013). Effects of angiotensin II on expression of  $\alpha3$ ,  $\alpha v$  and 3 integrin proteins in B16-F10 melanoma cells. *Koomesh*, 14 (4);396-403.
9. Feng, X., Tonnesen, MG., Mousa, SA., Clark, R. (2013). Fibrin and collagen differentially but synergistically regulate sprout angiogenesis of human dermal microvascular endothelial cells in 3-dimensional matrix. *International Journal of Cell Biology*, 2013; 1-12.
10. Folkman, J. (2003). Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*, 3(7); 643–51.
11. Ganesan, P., Matsubara, K., Ohkubo, T. (2010). Anti-angiogenic effect of siphonaxanthin from green alga, *Codium fragile*. *Phytomedicine*, 17(14); 1140–1144.
12. Haag, J., Baiguera, S., Jungebluth, PH., Barale, D. (2012). Biomechanical and angiogenic properties of tissue-engineered rat trachea using genipin cross-linked decellularized tissue. *Biomaterials*, 33(3); 780-789.
13. Haige, W., Ziang, Y., Xuefang, B., Yuguang, D. (2010). Chito oligo saccharides inhibit nitric oxide mediated migration of endothelial cell in vitro and tumor angiogenesis in vivo. *Carbohydrate Polymers*, 82(3); 927–932.
14. Jessica, A., DeQuach, M.S., Shauna, H., Yuan, M.D. (2011). Decellularized porcine brain matrix for cell culture and tissue



- engineering scaffolds. *Tissue Engineering*, 17(21); 2583 – 2592.
15. Kruger, EA., Duray, PH., Price, DK., Pluda, JM., Figg, WD. (2001). Approaches to preclinical screening of antiangiogenic agents. *Semin Oncol*, 28(6); 570–6.
16. Lee, Y.S., Yang, H., Shin, K.H., Choi, H.S. (2003). Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achatina fulica*. *European Journal of Pharmacology*, 465(1-2); 191–198.
17. Lordan, S., Ross, R., Stanton, C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine Drugs*, 9 (6); 1056-1100.
18. Mammoto, T., Jiang, A., Jiang, E., Panigrahy, D., Kieran, M., Mammoto, A. (2013). Role of collagen matrix in tumor angiogenesis and glioblastoma multiforme progression. *American Journal of Pathology*, 183(4); 1293-1305.
19. Mansouri, K., Mostafaie, A., Mohammadi Motlagh, H.R. (2011). Angiogenesis and tumor. *Behbood Journal*, 14(4); 305-315.
20. Mohammadi-Motlagh, HR., Mansouri, K., Mostafaie, A. (2010). Plants as useful agents for angiogenesis and tumor growth prevention. *Physiology and Pharmacology*, 14(3); 297-312.
21. Namvar, F., Mohamad, R., Baharara, J., Zafar-Balanejad, S. (2013). Antioxidant, antiproliferative, and antiangiogenesis effects of polyphenol-rich seaweed (*Sargassum muticum*). *BioMed Research International*, 1-9.
22. Omae, H., Zhao, C., Sun, YL., An, KN. (2009). Multilayer tendon slices seeded with bone marrow stromal cells: a novel composite for tendon engineering. *J Orthop Res*, 27(7); 937-942.
23. Peters, W. (1972). Occurrence of chitin in Mollusca; *Comp. Biochem. Physiol*, 41(3); 541-550.
24. Ribatti, D., Conconi, MT., Nico, R., Baiguera, S. (2003). Angiogenic response induced by acellular brain scaffolds grafted onto the chick embryo chorioallantoic membrane. *Brain Res*, 989(1); 9-15.
25. Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E., Roccaro, A.M., Vacca, A. (2007). The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia*. 21(1); 44-52.
26. Salehi, E., Amjadi, F., Khazaei, M. (2011). Angiogenesis in health and disease: role of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Journal of Isfahan Medical School*, 29(132); 312-326. Review.
27. Saranadasa, M., Wang, E S. (2011). Vascular endothelial growth factor inhibition: Conflicting roles in tumor growth. *Cytokine*, 53; 115- 129.
28. Sottile, J. (2004). Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1654(1); 13– 22.
29. Timothy, D. Stebbins Douglas, J. (2009). Eernisse. Chitons (Mollusca: Polyplacophora) known from benthic monitoring programs in the southern California bight. *The Festivus*, XLI(6); 53-100.
30. Vargas, A., Zeisser-Labouèbe, M., Lange, N., Gurny, R., Delie, F. (2007). The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(11); 1162 – 1176.
31. Wang, S-L., Lin, T-Y., Yen, Y-H., Liao, H-F., Chen, Y-J. (2006). Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydr. Res*, 6(341); 2507–2515.
32. Weaver, JC., Wang, Q., Miserez, A., Tantuccio, A. (2010). Analysis of an ultra hard magnetic biomineral in Chiton radular teeth. *Materials Today*, 13(1-2); 42-52.
33. Wu, H., Aam, B., Wang, W., Norberg, AL. (2012). Inhibition of angiogenesis by chito oligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization. *Carbohydrate Polymers*, 89(2); 511– 518.
34. Zhang, Ch., Kim, Sk. (2009). Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPi) from marine natural products: the current situation and future prospects. *Mar. Drugs*, 7(2); 71-84.