Investigating the effect of Sulforaphane on Angiogenesis in Chick's Chorioallantoic membrane and its antioxidant activities

Shahin Shdiani[1], Javad Baharara[2], Alireza Iranbakhsh[3], Tayebeh Ramezani [4]

Background and Aim: Sulforaphane is a type of isothiocyanate with anticancer effects. In the present study, the effect of sulforaphane in angiogenesis in chicks' chorioallantoic membrane was investigated.

Materials and Methods: In this experimental study, a total of 56 fertilized eggs were divided into 7 groups of eight with three replications: control, control-Experimental and five treatment groups treated with sulforaphane (50,100,200,400 and 800µg/ml, respectively). On the 2nd day of incubation, a window opened on every egg. On the 8th day, treatment was done.On the 12th day, all CAMs were examined and photographed and the number and length of the vessels around the sponges, weight, and length (CR) of chick embryo were determined. Besides, every vessel hemoglobin content was measured using Drabkyn, s test. The antioxidant effect of sulforaphane was assessed by means of ABTS and DPPH assay. The obtained data were statistically analyzed using ANOVA and SPSS software (V: 16) at the significant level of 0.05.

Results: It was found that 50 µg/ml of sulforaphane did not have any significant effect on the angiogenic process, but 100, 200, 400 and 800 µg/ml of sulforaphane; i.e in a dose-dependent manner led to a decrease in number, length, and hemoglobin content of the blood vessels. Moreover, embryo weight and CR decreased compared with the control. The results from DPPH and ABTS assay showed that Sulforaphane, dose-dependently, inhibits the activity of free radicals.

Conclusion: Sulforaphane has anti-angiogenic and anti-oxidant properties, and it can be a suitable candidate for the treatment of diseases associated with angiogenesis.

Key Words: Angiogenesis, Chorioallantoic Membrane, Sulforaphane, Antioxidant Activities

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2017; 24(3): 179-189.

Received: October 2, 2016, Accepted: November 19, 2017

[1] *Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.*
[2] ***Corresponding Author;*** *Applied Biology Research Center for the Development of Animal, Department of Biology, Islamic Azad University of Mashhad, Mashhad, Iran. Email: baharara@yahoo.com Tel: 38437092 -051Fax: 38437092 -051*
[3] *Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research, Tehran, Iran.*
[4] *Khwarizmi's School of Biological Sciences, University of Tehran, Iran.*

مقاله اصیل پژوهشی

اثر سولفورافن بر رگ‌زایی در پرده کوریو الانتوئیک جوجه و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن

شهین شادیانی[۱]، جواد بهار آرا[۲]، علیرضا ایرانبخش[۳]، طیبه رمضانی[۴]

چکیده

زمینه و هدف: سولفورافن نوعی ایزوتیوسیانات با اثرات ضدّ سرطانی است. در این مطالعه، اثر سولفورافن بر رگ‌زایی در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بررسی شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، تخم‌مرغ نطفه‌دار به‌طور تصادفی در ۷ گروه هشت‌تایی شامل گروه‌های: شاهد، شاهد آزمایشگاهی و پنج گروه تیمار با دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ µg/ml سولفورافن در سه تکرار تقسیم شدند. در روز دوم انکوباسیون، پنجره ای روی تخم‌مرغ‌ها ایجاد و در روز هشتم تیمار انجام شد. روز دوازدهم، از تمام نمونه‌ها عکس تهیه شد و تعداد و طول انشعابات عروقی روی پرده کوریوآلانتوئیک و نیز در جنین‌ها، وزن و طول سری-دمی محتوی هموگلوبین عروق، با آزمون درابکین اندازه‌گیری شد. اثرات آنتی‌اکسیدان سولفورافن با آزمون DPPH و ABTS بررسی شد. نتایج با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵، تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان داد، در غلظت ۵۰µg/ml سولفورافن، اثرات معنی‌داری بر روند رگ‌زایی مشاهده نشد؛ در حالی که در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ µg/ml از سولفورافن به‌صورت وابسته به دوز منجر به مهار تعداد، طول و محتوی هموگلوبین عروق خونی و کاهش وزن جنین‌ها و طول سری–دمی در مقایسه با گروه کنترل گردید. نتایج حاصل از آزمون‌های آنتی‌اکسیدان DPPH و ABTS نشان داد که این ماده به‌صورت وابسته به دوز منجر به مهار رادیکال‌های آزاد می گردد.

نتیجه‌گیری: سولفورافن دارای خواص ضدّ رگ‌زایی و آنتی‌اکسیدانی است و می‌تواند کاندیدای مناسب برای درمان بیماری‌های مرتبط با رگ‌زایی باشد.

واژه‌های کلیدی: رگ‌زایی، پرده کوریوآلانتوئیک، سولفورافن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۶؛ ۲۴(۳): ۱۷۹-۱۸۹.

دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۱۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸//۲۸

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، مشهد، ایران.

[۲] **نویسنده مسؤول؛** مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری و گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.

آدرس: مشهد- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد- مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری و گروه زیست شناسی

تلفن: ۳۸۴۳۷۰۹۲ -۰۵۱ نمابر: ۳۸۴۳۷۰۹۲ -۰۵۱ پست الکترونیکی:baharara@yahoo.com

[۳] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، تهران، ایران.

[۴] دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران، تهران، ایران.

مقدمه

رگ‌زایی[1]، از مهمترین وقایع زیستی است که با تولید رگ‌های جدید از عروق پیشین در بسیاری از مراحل رشد و نمو جنینی رخ می‌دهد (۱). این فرآیند، نقش مهمی در وقایع فیزیولوژیک مانند: رشد و نمو، ترمیم زخم و تولیدمثل و همچنین در وقایع پاتولوژیک از قبیل: رشد و متاستاز تومور و انواعی از بیماری‌های مزمن دارد (۲).

اولین‌بار Folkman در سال ۱۹۷۱ نشان داد که رشد بافت سرطانی، به رگ‌زایی بستگی دارد. وی همچنین پیشنهاد کرد که مهار رگ‌زایی می‌تواند یک روش درمانی برای سرطان باشد (۳). به‌طورکلی فرآیند رگ‌زایی تحت تأثیر عوامل مختلف است و دربرگیرنده یک سری رخدادهای سلولی از قبیل: مهاجرت، تکثیر و تمایز سلول‌های اندوتلیال و در نهایت تشکیل عروق، بلوغ و بازسازی نهایی آنها می‌باشد. این فرآیند، وابسته به تعادل دقیق بین فاکتورهای تحریک‌کننده و مهارکننده طبیعی درون بدن است. در صورتی که این تعادل از حالت طبیعی خارج شود، شرایط برای بروز بیماری‌هایی مانند: رگ‌زایی قرنیه، اندومتریوز، چاقی، آترواسکلروز، پسوریازیس و رشد و متاستاز تومورها فراهم می‌گردد؛ بنابراین مهار دارویی رگ‌زایی می‌تواند در درمان برخی بیماری‌ها و سرطان‌ها مؤثّر باشد (۴). بدین منظور در سال‌های اخیر، مهار رگ‌زایی به‌عنوان ایده‌ای نوین در کنترل و درمان انواعی از اختلالات وابسته به رگ‌زایی به‌ویژه رشد و متاستاز تومور مطرح شده است (۵).

سولفورافن (SFN)، نوعی ایزوتیوسانات با نام علمی (methyl sulfinyl) [1-Isothiocyanate-(4R)-butane:CH3S(O)(CH2)4-N=C=S] است که به‌دلیل اثرات بازدارنده آن بر رشد تومور در محیط درون‌تنی و برون‌تنی که وابسته به تأثیر مستقیم بر سلول‌های سرطانی می‌باشد، مورد استفاده قرار گرفته است (۶، ۷). از مهمترین خواص درمانی و کلینیکی سولفورافن می‌توان به القای آپوپتوز، خواص ضدّ باکتریایی، ضد ّهیستون داستیلاز، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدّ متاستازی و غیره اشاره نمود (۸).

تولید رادیکال‌های آزاد، مسئله‌ای طبیعی است و در طی عمل تنفس به‌وجود می‌آید. اگر به‌طور ناگهانی تعداد زیادی رادیکال آزاد در بدن تولید شود، باعث تخریب عمل سلول یا حتی مرگ و ایجاد ناهنجاری‌هایی مانند: پیری زودرس، سرطان و تصلّب شرائین می‌شود (۹). اثر زیان‌بخش رادیکال‌های آزاد را می‌توان توسط آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش داد.

امروزه استفاده از عصاره‌های گیاهی یا متابولیت‌های ثانویه استخراج‌شده از گیاهان به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌ها در صنایع پزشکی، دارویی و صنایع غذایی کاربرد وسیعی پیدا نموده است (۱۰). از سوی دیگر مطالعه رگ‌زایی به‌عنوان ایده‌ای نوین در کنترل و درمان انواعی از اختلالات وابسته به رگ‌زایی به‌ویژه رشد و متاستاز تومور مطرح شده است. تاکنون اثر سولفورافن بر رگ‌زایی در مدل (CAM) بررسی نگردیده است. در این مطالعه، اثر احتمالی زیستی این مادّه در مدل پرده کوریوآلانتوئیک جوجه و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن ارزیابی شد.

روش تحقیق

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌شناسی تکوینی جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شد. از تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار نژاد Ross به‌عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده شد. نمونه‌های مورد مطالعه از شرکت مرغداران طوس مشهد تهیه گردید. سولفورافن (با وزن مولکولی g/mol ۱۷۷/۲۹ و فرمول شیمیایی C6H11NOS2) در این مطالعه تجربی از شرکت سیگما خریداری گردید. در مطالعات آزمایشگاهی، تعداد ۱۶۸ تخم‌مرغ نطفه‌دار نژاد راس در سه تکرار تهیه شد و در هر تکرار، در ۷گروه ۸تایی به‌صورت تصادفی توزیع شدند.

[1] *Angiogenesis*

هر تکرار شامل:

۱) گروه شاهد که در شرایط طبیعی نگهداری گردید؛

۲) گروه شاهد آزمایشگاهی که با محلول حاوی ۱۰۰میکرولیتر حلال دایمتیل‌سولفوکساید (DMSO) و ۹۰۰میکرولیتر فسفات‌بافرسالین (PBS) تیمار گردید؛

۳) گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ که با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول سولفورافن تیمار گردیدند (۱۹،۲۰،۲۱).

آزمون پرده کوریوآلانتوئیک:

تخم‌مرغ‌ها با الکل ۷۰درصد ضدّ عفونی شد و در دستگاه جوجه‌کشی با دمای تقریبی ۳۸درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵درصد (شرکت درنا سیستم پارس، ایران)، قرار گرفت. در روز دوم انکوباسیون، در شرایط کاملاً استریل ایجادشده توسط هود لامینار (Telstar AV-100- Spain)، ابتدا قسمتی از پوسته تخم‌مرغ‌ها برداشته شد و پنجره‌ای در یک طرف آن ایجاد گردید. پنجره با لامل و پارافین (پارافین پاتولوژیکی فارا–ایران) پوشانده شد و به‌طور مجدد داخل انکوباتور قرار گرفت. از آنجا که پرده کوریوآلانتوییک از روز پنجم انکوباسیون شروع به تشکیل می‌نماید و در روز هشتم بیش از نیمی از وسعت درون تخم‌مرغ را اشغال می‌کند و همچنین در این روز قلب به‌طور کامل تشکیل و جدایی خون سیاهرگی و سرخرگی اتفاق می‌افتد، بنابراین بررسی شبکه عروقی در روز هشتم انکوباسیون انجام گرفت. از این رو در روز هشتم انکوباسیون، در شرایط استریل پنجره‌ها برداشته شد و روی پرده کوریوآلانتوئیک اسفنج ژلاتینی (به ابعاد ۴×۴×۱میلیمتر) که شامل آلبومین سفیده تخم‌مرغ و محلول آگار در DMSO به نسبت مساوی بود، قرار گرفت.

در نمونه‌های تیمار با سولفورافن، به‌ترتیب ۱۰میکرولیتر از غلظت‌های مدّ نظر، به محل اسفنج تزریق شد؛ در نمونه شاهد آزمایشگاهی، به محل اسفنج ۱۰ میکرولیتر از محلول DMSO+PBS تزریق گردید و نمونه شاهد بدون تزریق و در شرایط طبیعی تا روز دوازدهم در انکوباسیون نگهداری شد.

پنجره‌ها، با لامل و پارافین پوشانده (۱۱) و به‌طور مجدد به انکوباتور برگردانده شد. در روز دوازدهم در تمام نمونه‌ها، از محدوده اسفنج ژلاتینی، تصاویری از عروق خونی سطح پرده کوریوآلانتوئیک به‌کمک فتواسترئومیکروسکوپ تحقیقاتی (Ziess- Germany) عکس تهیه گردید؛ سپس با نرم‌افزار Image J تعداد انشعابات، شمارش شد و نیز طول عروق خونی تعیین گردید. همچنین طول سری – دمی جنین‌ها با کولیس و وزن آنها با ترازوی دیجیتال، اندازه‌گیری شد (۱۱).

اندازه‌گیری هموگلوبین خون:

برای سنجش غلظت هموگلوبین، از معرّف درابکین استفاده شد. بدین‌منظور در ابتدا پرده کوریوآلانتوئیک جوجه به همراه رگ‌های خونی با دقّت جدا شد؛ سپس کیسه زرده و پرده کوریوآلانتوئیک به‌مدّت ۱۰دقیقه کاملاً هموژنایز شد. در مرحله بعد، ۲۴میکرولیتر از محلول رویی حاصل به میکروتیوب حاوی ۳میلی‌لیتر معرّف درابکین اضافه گردید. در ادامه به‌مدّت ۱۰دقیقه با سرعت ۵۰۰۰دور در دقیقه سانتریفوژ انجام شد؛ سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول شفاف رویی به پلیت ۹۶تایی منتقل و بلافاصله جذب نوری آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۶ نانومتر قرائت شد و برای محاسبه محتوی هموگلوبین (مطابق دستور عمل همراه کیت)، جذب به‌دست‌آمده در عدد ثابت ۳۶/۸ ضرب گردید. غلظت هموگلوبین به‌عنوان معیاری برای سنجش تراکم عروق استفاده گردید. با مقایسه غلظت هموگلوبین در گروه‌های مختلف می‌توان به تجزیه و تحلیل میزان رگ‌زایی به شیوه‌ای متفاوت پرداخت (۱۱).

آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی:

۱-اندازه‌گیری میزان خواص آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH[1]

استفاده از رادیکال DPPH برای بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی و به‌طور کلی

[1] *2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl*

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، به یکی از پرکاربردترین روش‌های سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی تبدیل شده است. علت این امر، سادگی و حساسیّت بالای این روش است. این رادیکال، بالاترین میزان جذب خود را در طول موج ۵۱۷–۵۱۵ نانومتر نشان می‌دهد. رادیکال DPPH در اثر جذب هیدروژن از یک آنتی‌اکسیدان به DPPH پایدار (غیر رادیکالی) تبدیل می‌شود که در اثر این تبدیل، رنگ آن به مرور از بنفش تیره به زرد روشن تبدیل می‌شود و در نتیجه میزان جذب در طول موج ۵۱۷–۵۱۵ نانومتر کاهش می‌یابد (۱۲).

برای سنجش میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی، مقدار ۵۰–۳۵۰ میکرولیتر از نمونه موردنظر به ۳۰میکرولیتر متانول مطلق اضافه گردید؛ سپس ۱۰میکرولیتر محلول ۰/۰۰۴ درصدی DPPH در متانول، به آن اضافه و بعد از ۳۰دقیقه جذب آنها با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت شد. در نهایت میزان فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال با استفاده از فرمول زیر و در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی بوتیل‌هیدروکسی (BHA[1]) تعیین شد (۱۲):

$$\%\ RSA=[1-((Ac-As)/Ac)\times 100]$$

در این رابطه، A_S میزان جذب نمونه، Ac میزان جذب شاهد و RSA فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد است.

۲- اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون ABTS[2]:

در این مطالعه، برای تهیه رادیکال پایدار ABTS، ابتدا محلول ۷مولار ABTS تهیه شد؛ سپس این محلول توسط پرسولفات‌پتاسیم، اکسید گردید و محلول به‌دست آمده به‌مدت ۱۶–۱۲ ساعت در تاریکی قرار گرفت. بعد از گذشت این زمان، محلول رادیکال کاتیون به‌دست آمده به‌وسیله اتانول خالص، ۵۰بار رقیق و سپس از آن استفاده گردید. به این ترتیب که در هر یک از لوله‌های آزمایش آماده‌شده، ۱۰ میکرولیتر از این محلول ریخته شد؛ آنگاه ۱۰۰میکرولیتر از نمونه آنتی‌اکسیدان به آنها اضافه گردید و بعد از گذشت ۱۵دقیقه، جذب آنها در طول موج ۷۳۴نانومتر خوانده شد. همچنین به یکی از لوله‌های آزمایش، به‌جای نمونه، اتانول اضافه شد (به‌عنوان کنترل) و جذب آن در لحظه اول و نیز بعد از گذشت ۱۵دقیقه خوانده شد. سپس درصد بازدارندگی نمونه موردنظر، از طریق فرمول زیر محاسبه و در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی بوتیل‌هیدروکسی (BHA) گزارش شد (۱۳):

$$I=[1-(Ab(15)-As(15))/Ab(15)]\times 100\%$$

در این رابطه، Ab(15) میزان جذب شاهد بعد از ۱۵دقیقه، As(15) میزان جذب نمونه بعد از ۱۵دقیقه و I٪ درصد بازدارندگی است.

آنالیزهای آماری:

داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۶) و با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA، t-test و آزمون تعقیبی Dunnett در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل گردید. نمودارها نیز توسط نرم‌افزار Excel رسم شد.

یافته‌ها

عروق خونی گسترش‌یافته بر سطح پرده کوریوآلانتوئیک، در روز دوازدهم انکوباسیون مشاهده شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی طبق جدول یک، در نمونه‌های شاهد با میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در گروه شاهد آزمایشگاهی، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری نشان نداد. میانگین طول انشعابات عروق در گروه‌های تجربی بجز گروه تجربی یک (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (P=۰/۸۵) نسبت به شاهد، کاهش معنی‌داری نشان داد. میانگین تعداد عروق در گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (P=۰/۰۰۰۱) و نشان داد که با افزایش غلظت، تعداد عروق کاهش می‌یابد. با توجه به ستون اندازه اثر، مشخص می‌شود که اندازه اثر با غلظت رابطه مستقیم دارد؛ یعنی افزایش غلظت باعث افزایش اندازه اثر در طول و تعداد انشعابات می‌شود.

[1] *Butyl-4*-Hydroxyanisole
[2] *Biochemistry, 2,2'-Azino-Bis*

مقایسه میانگین طول سری- نشیمنگاهی جنین‌های ۱۲روزه در گروه‌های شاهد آزمایشگاهی و تجربی با غلظت ۵۰ (p=۰/۴) میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد، کاهش معنی‌داری را نشان نداد؛ اما در سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری مشاهده شد. مقایسه میانگین وزن جنین‌ها در گروه شاهد با شاهد آزمایشگاهی، اختلاف معنی‌داری نشان نداد. میانگین وزن جنین‌ها در گروه‌های تجربی بجز گروه یک (P=۰/۸) نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (جدول ۲) (شکل ۱) و نشان داد که با افزایش غلظت، وزن جوجه کاهش یابد.

نتایج حاصل از سنجش میانگین طول انشعابات و تعداد عروق نشان داد که میانگین طول انشعابات و تعداد عروق در نمونه شاهد با نمونه شاهد آزمایشگاهی اختلاف معنی‌داری نداشت؛ بنابراین گروه‌های تجربی با گروه شاهد آزمایشگاهی مقایسه شدند.

در مقایسه میانگین طول انشعابات و تعداد عروق در گروه های تجربی نسبت به گروه شاهد آزمایشگاهی در جدول یک، ملاحظه می‌شود که میانگین طول انشعابات و تعداد عروق گروه‌های تجربی نسبت به شاهد آزمایشگاهی کاهش یافت. مقادیر احتمال حاصل از آزمون t-test نشان داد، اختلاف معنی‌داری در مقایسه میانگین طول انشعابات و تعداد عروق تک تک گروه‌های تجربی با شاهد ازمایشگاهی وجود داشت. اندازه اثر نیز با افزایش غلظت افزایش یافت؛ یعنی تغییر غلظت در گروه‌های تجربی بر تغییر طول انشعابات و تعداد عروق تأثیر داشت. همه گروه‌های تجربی در طیف اندازه اثر بالا قرار گرفتند. چون اندازه اثر تحت تأثیر اندازه نمونه نمی‌باشد، بنابراین از اهمیت بالایی برخوردار است (جدول۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین طول و تعداد انشعابات عروقی در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌های تجربی	میانگین طول انشعابات عروق بر میلی‌متر (Mean±SD)	سطح معنی‌داری آزمون t-test	اندازه اثر مجذوراتا	میانگین تعدادعروق (Mean±SD)	سطح معنی‌داری آزمون t-test	اندازه اثر مجذوراتا
شاهد	۳۴/۱۵±۰/۵۲	–	–	۱۳/۹۵±۰/۷۲	–	–
شاهد آزمایشگاهی	۳۵/۰۷±۰/۵۱	۰/۷۶	–	۱۴/۸±۰/۸۴	۰/۱۲	–
تجربی۱ (۵۰µg/ml)	۳۳/۸۹±۰/۵۲	۰/۰۰۷	۰/۶۱۵	۱۰/۷±۰/۸۴	۰/۰۰۰۱	۰/۸۸۲
تجربی۲ (۱۰۰µg/ml)	۳۱/۳۶±۰/۸۷	۰/۰۰۰۱	۰/۸۹۳	۹/۹۵±۰/۳۷	۰/۰۰۰۱	۰/۹۴۶
تجربی۳(۲۰۰µg/ml)	۲۹/۳۶±۰/۵۲	۰/۰۰۰۱	۰/۹۷۴	۸/۵±۰/۶۱	۰/۰۰۰۱	۰/۹۵۸
تجربی ۴ (۴۰۰µg/ml)	۲۶/۴۶±۰/۹۹	۰/۰۰۰۱	۰/۹۷۴	۶/۸±۰/۲۷	۰/۰۰۰۱	۰/۹۸۱
تجربی ۵ (۸۰۰µg/ml)	۲۳/۵۴±۰/۹۶	۰/۰۰۰۱	۰/۹۸۶	۵/۵±۰/۶۱	۰/۰۰۰۱	۰/۹۸۱

جدول ۲- مقایسه میانگین وزن و طول سری- نشیمنگاهی جنین‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌های تجربی	میانگین طول سری – دمی جنین‌ها بر حسب سانتی‌متر (Mean±SD)	p-value	اندازه اثر مجذوراتا	وزن جوجه بر حسب گرم (Mean±SD)	p-value	اندازه اثر مجذوراتا
شاهد	۳/۸۴±۰/۱۱	–	–	۳/۲۲±۰/۲۱	–	–
شاهد آزمایشگاهی	۳/۹۲±۰/۰۸	۰/۲۴۲	–	۳/۳۲±۰/۳۴	۰/۵۷۹	–
تجربی ۱ (۵۰µg/ml)	۳/۷۴±۰/۲۲	۰/۱۴۵	–	۲/۷۹±۰/۰۸	۰/۰۲۲	۰/۵۹۶
تجربی ۲ (۱۰۰µg/ml)	۳/۶۴±۰/۱۵	۰/۰۰۷	۰/۶۲	۲/۵۱±۰/۰۵	۰/۰۰۶	۰/۷۷۶
تجربی ۳ (۲۰۰µg/ml)	۳/۴۶±۰/۲۳	۰/۰۰۳	۰/۶۹	۲/۳۹±۰/۰۳	۰/۰۰۳	۰/۸۲۳
تجربی ۴ (۴۰۰µg/ml)	۳/۱۶±۰/۴۴	۰/۰۰۵	۰/۶۴۳	۲/۳±۰/۰۶	۰/۰۰۲	۰/۸۴۴
تجربی ۵ (۸۰۰µg/ml)	۲/۸۲±۰/۴۹	۰/۰۰۱	۰/۷۶	۲/۱۹±۰/۰۵	۰/۰۰۲	۰/۸۷۱

نتایج حاصل از سنجش میانگین طول سری–دمی و وزن جوجه نشان داد که میانگین طول سری–دمی و وزن جوجه در نمونه شاهد با نمونه شاهد آزمایشگاهی اختلاف معنی‌داری نداشت؛ بنابراین گروه‌های تجربی با گروه شاهد آزمایشگاهی مقایسه شدند. در مقایسه میانگین طول سری–دمی و وزن جوجه در گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد آزمایشگاهی در جدول ۲، ملاحظه می‌شود که میانگین طول سری–دمی و وزن جوجه گروه‌های تجربی نسبت به شاهد آزمایشگاهی کاهش یافته است. مقادیر احتمال حاصل از آزمون t-test نشان داد که اختلاف معنی‌داری در مقایسه میانگین وزن جوجه تک تک گروه‌های تجربی با گروه شاهد آزمایشگاهی وجود داشت. در مقایسه میانگین طول سری–دمی گروه‌های تجربی با گروه شاهد آزمایشگاهی، گروه تجربی یک اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد آزمایشگاهی نداشت، ولی میانگین طول سری–دمی سایر گروه‌ها با گروه شاهد آزمایشگاهی تفاوت معنی‌داری داشت. اندازه اثر نیز با افزایش غلظت افزایش یافت؛ یعنی تغییر غلظت در گروه‌های تجربی بر تغییر طول سری–دمی و وزن جوجه تأثیر داشته است. همه گروه‌های تجربی در طیف اندازه اثر بالا قرار گرفتند (جدول ۲). نتایج حاصل از سنجش غلظت هموگلوبین نشان داد که میانگین غلظت هموگلوبین در نمونه شاهد با نمونه شاهد آزمایشگاهی اختلاف معنی‌داری نداشت؛ بنابراین گروه‌های تجربی با گروه شاهد آزمایشگاهی مقایسه شدند.

در مقایسه میانگین غلظت هموگلوبین در گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد آزمایشگاهی در جدول ۳ ملاحظه می‌شود که میانگین غلظت هموگلوبین گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد آزمایشگاهی کاهش یافت. مقادیر احتمال حاصل از آزمون t-test نشان داد، اختلاف معنی‌داری در مقایسه میانگین غلظت هموگلوبین تک تک گروه‌های تجربی با گروه شاهد ازمایشگاهی وجود داشت. اندازه اثر نیز با افزایش غلظت افزایش یافت؛ یعنی تغییر غلظت در گروه‌های تجربی بر تغییر غلظت هموگولوبین تأثیر داشت و همه گروه‌های تجربی در طیف اندازه اثر بالا قرار گرفتند (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین غلظت هموگلوبین عروق خونی در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌های تجربی	میانگین غلظت هموگلوبین بر حسب میکروگرم/ میلی‌لیتر (Mean±SD)	سطح معنی‌داری	اندازه اثر مجذور اتا
شاهد	۴/۵۵±۰/۳۹	–	–
شاهد آزمایشگاهی	۴/۶۱±۰/۴۱	۰/۸۰۸	–
گروه تجربی ۱ (۵۰µg/ml)	۳/۹۸±۰/۰۹	۰/۰۲۴	۰/۵۸۶
گروه تجربی۲ (۱۰۰µg/ml)	۳/۵۲±۰/۰۳	۰/۰۰۴	۰/۸۱۷
گروه تجربی ۳ (۲۰۰µg/ml)	۳/۴۴±۰/۰۹	۰/۰۰۲	۰/۸۳۱
گروه تجربی۴(۴۰۰µg/ml)	۳/۱۸±۰/۱۷	۰/۰۰۱	۰/۸۶۸
گروه تجربی۵(۸۰۰µg/ml)	۲/۶۹±۰/۰۸	۰/۰۰۰۱	۰/۹۳

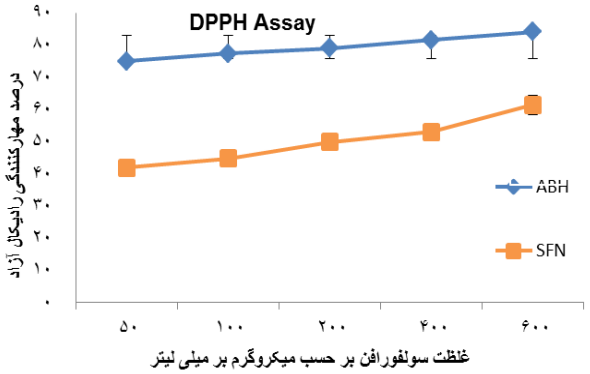


شکل ۱- مقایسه طول سری – نشیمنگاهی جنین‌ها در گروه‌های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵

روش‌های تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی:

سنجش قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH

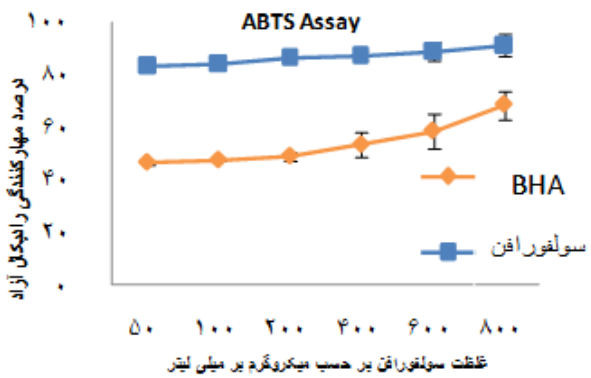
در این مطالعه مشخص شد که فعالیت به دام‌اندازی رادیکال آزاد در تمامی غلظت‌های سولفورافن، با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد. غلظتی که موجب مهار ۵۰درصدی تولید رادیکال‌های آزاد گردید، حدود ۳۰۰µg/ml برای تست DPPH بود (نمودار ۱).



نمودار ۱- رابطه میان فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH سولفورافن در مقایسه با با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA. با افزایش غلظت میزان حذف رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد (Mean±SD).

آزمون رادیکال کاتیون ABTS

نتایج نشان داد که مهار رادیکال ABTS در تمامی غلظت‌های سولفورافن، با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد. غلظتی که موجب مهار ۵۰درصدی تولید رادیکال‌های آزاد گردید، ۴۰۰µg/ml برای تست ABTS بود (نمودار ۲).



نمودار ۲- مقایسه فعالیت آنتی‌رادیکالی سولفورافن با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA با روش ABTS. با افزایش غلظت سولفورافن در گروه‌های تجربی، مهار رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد (Mean±SD).

بحث

هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضدّ رگ‌زایی ماده مؤثّره سولفورافن با استفاده از مدل پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه و نیز بررسی اثرات آنتی‌اکسدانی آن با استفاده از آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی بود.

آنژیوژنز در پدیده‌های پاتولوژیک نظیر رشد و متاستاز تومورهای سرطانی، نقش مهمی ایفا می‌کند؛ بنابراین کنترل رگ‌زایی تومور، یکی از راه‌های درمانی امیدوارکننده در بحث سرطان‌شناسی می‌باشد. در استراتژی‌های درمان سرطان با روش‌های شیمیایی، مقاومت اکتسابی تومور به داروها، مشکلات عمده‌ای را به‌وجود می‌آورد؛ اما در مهار سرطان به‌وسیله مهار رگ‌زایی، مقاومت سلولی مشاهده نمی‌شود؛ زیرا در این حالت سلول‌های مورد نظر یعنی سلول‌های اندوتلیال، طبیعی هستند و از نظر ژنتیکی پایدار می‌باشند (۱۴).

مدل‌های مختلفی برای مطالعه رگ‌زایی وجود دارد. محققان برای مطالعه آنژیوژنز اقدام به طراحی مدل‌های درون‌تنی و برون‌تنی کرده‌اند و از آنها در زمینه‌های تحقیقاتی مختلف از جمله شناسایی فاکتورهای مهارکننده و القاکننده آنژیوژنز برای کاربردهای درمانی بهره برده‌اند (۵). در میان مدل‌های مختلف، مدل پرده کوریوآلانتوئیک (CAM) برای مطالعه آنژیوژنز، از پر استفاده‌ترین مدل‌های درون‌تنی محسوب می‌شود. سادگی و سرعت سنجش‌های مختلف که به کمک جنین جوجه صورت می‌گیرد، انگیزه استفاده از این مدل را در پژوهش‌های فارماکولوژی و پزشکی تقویت می‌کند. علاوه بر این وجود ملاحظات اخلاقی در این مدل در مقایسه با دیگر مدل‌های درون‌تنی و با توجه به تجهیزات ساده مورد استفاده در آن، از امکان تکرارپذیری بالا برخوردار بوده و نتایج قابل اطمینانی را برای محقق فراهم می‌کند (۱۵).

محققین معتقدند که عوامل تغذیه‌ای، گیاهان و ترکیبات مؤثّر آنها ممکن است شیمی‌درمانی را تحت تأثیر قرار داده و

بنابراین در درمان سرطان کمک‌کننده باشند. گیاهان خانواده *Brassica* مشتمل بر جنس‌های متفاوتی از کلم (سبز، قرمز)، گل‌کلم، کلم بروکلی و کلم‌پیچ می‌باشند. این گیاهان خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدّ سرطانی دارند (۱۶). مطالعات نشان داده‌اند که ترکیبات جداشده از خانواده کلم از طریق مکانیسم‌های مختلف می‌توانند در درمان سرطان نقش داشته باشند. ایزوتیوسیانات موجود در این خانواده از طریق مهار هیستون د-استیلاز ترانسفرازها و -DNA متیل‌ترانسفرازها در سلول‌های سرطانی کشت داده شده، اثرات ضدّ سرطانی را اعمال می‌کند (۱۷). همچنین گلوکوزینولات‌های موجود در این خانواده و محصولات ناشی از هیدرولیز آنها شامل ایندول و مشتقات ایزوتیوسیانات‌ها، به‌عنوان ترکیبات ضدّ سرطانی مورد توجه بوده و اثر چندین ترکیب سرطان‌زا را کاهش می‌دهند (۱۸).

Asakage و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که سولفورافن، موجب مهار تکثیر و القای آپوپتوز در سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ نافی انسان (HUVEC) می‌شود. نتایج تحقیقات گروه نشان داد که سولفورافن یک مادّه ضدّ رگ‌زایی امیدوارکننده است که موجب مهار تکثیر سلول اندوتلیال از طریق ایجاد آپوپتوز و نیز بازداری تشکیل شبکه مویرگی می‌شود (۶).

Jackson و همکاران در سال ۲۰۰۶ به مطالعه و بررسی تأثیر سولفورافن بر مهار رگ‌زایی و اختلال در پیشرفت تقسیم اندوتلیال، پلیمریزاسیون میکروتوبول و توقف چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی پستان و کولون پرداختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که سولفورافن می‌تواند منجر به مهار تکثیر و مهار مهاجرت در سلول‌های اندوتلیال مشتق از آئورت گردد؛ همچنین این مادّه می‌تواند موجب مهار بیان فاکتور رشد اندوتلیال در این سلول‌ها گردد. در نتیجه این تحقیق نشان داد که سولفورافن می‌تواند به‌عنوان عامل شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار گیرد (۷).

Bertl و همکاران در سال ۲۰۰۶ مهار عملکرد سلول‌های اندوتلیال و رگ‌زایی را به‌عنوان مکانیسم جدید پیشگیری شیمیایی به‌واسطه سولفورافن، مورد بررسی قرار دادند. آنها نشان دادند که سولفورافن، در تمام مراحل موردنیاز و اساسی تشکیل عروق جدید، از سیگنال‌دهی پیش از رگ‌زایی و استحکام غشای پایه تا تکثیر، مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و تشکیل لوله، مداخله می‌کند (۱۹).

Davis و همکاران در سال ۲۰۰۹ مکانیسم مولکولی اثرات ضدّ رگ‌زایی سولفورافن را بررسی نمودند. آنها گزارش نمودند، سولفورافن رگ‌زایی را از طریق تنظیم بیان ژن FOXO در سلول‌های اندوتلیال بند ناف مهار می‌کند (۲۰). نتایج مطالعات بیان‌شده، با یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر همسو بود.

در سال ۲۰۰۸ Yao و همکاران در مطالعه‌ای، اثرات سولفورافن بر بیان فاکتور القای هیپوکسی (HIF-1α) در سلول‌های سرطانی پروستات در انسان بررسی نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که این ماده قادر به مهار HIF-1α می‌باشد. آنها گزارش نمودند که مهار بیان HIF-1α منجر به کاهش بیان VEGF می‌گردد و سولفورافن از این طریق، اثرات ضدّ رگ‌زایی خود را اعمال می‌کند (۲۱).

در سال ۲۰۱۰ Nishikawa و همکاران اثرات ضدّ رگ‌زایی سولفورافن بر القای آپوپتوز در سلول‌های اندوتلیال عروقی بند ناف (HUVEC) و سلول‌های اندوتلیال عروقی تومور (ECs) را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این گروه نشان داد که این ماده سبب مهار رگ‌زایی در سلول‌های سرطانی روده بزرگ از طریق القای آپوپتوز می‌شود (۲۲). همچنین نتایج بررسی‌های آنتی‌اکسیدانی در این تحقیق نشان داد که سولفورافن باعث مهار تولید رادیکال‌های آزاد به‌صورت وابسته به غلظت می‌شود.

Fernandes و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای که روی سلول‌های میوبلاست H9c2 قلبی رت انجام دادند، نشان دادند که ایزوتیوسیانات سولفورافن طبیعی، قادر به تحریک دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی و القای فاز ۲ غیر آنزیمی و محافظت از سلول‌های قلبی، از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و کاهش سیگنالینگ آپوپتوز است. علاوه بر این

سولفورافن باعث افزایش بیان پروتئین PGC-1A (یک عامل رونویسی درگیر در متابولیسم انرژی و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی) می‌شود (۲۳). در مطالعه حاضر نتایج بررسی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی سولفورافن نیز هم‌راستا با یافته‌های مطالعات بیان‌شده بود.

نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد، میانگین تعداد و طول انشعابات عروق بجز طول انشعابات گروه یک در گروه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار داشت. میانگین طول سری – دمی بجز گروه ۱ و وزن جنین‌های ۱۲ روزه بجز گروه ۱ نیز در گروه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد. همچنین با انجام تست درابکین و تعیین غلظت هموگلوبین خون نیز مشخص شد که غلظت هموگلوبین با رگ‌زایی نسبت مستقیم دارد و با نتایج حاصل از تحقیق Manikandan و همکاران هم راستا بود (۲۴).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که سولفورافن دارای اثر مهاری بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه است و تشکیل رگ‌های خونی را به‌طور موضعی در محل تیمار کاهش می‌دهد؛ همچنین باعث کاهش اندازه طول سری–دمی و وزن در جنین جوجه می‌شود. از طرفی بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که این ماده به‌صورت وابسته به دوز منجر به مهار رادیکال‌های آزاد می‌گردد؛ بنابراین این ماده گیاهی می‌تواند به‌عنوان کاندید مناسب در مطالعات سرطان‌شناسی و سایر بیماری‌های وابسته به رگ‌زایی در نظر گرفته شود. بدیهی است مطالعات تجربی و آزمایشگاهی بیشتر در این زمینه، کاملاً ضروری است.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با کد IR/IAUM/1394/265/19 در کمیته اخلاق به ثبت رسید و با حمایت مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شد. بدین‌وسیله از تمامی عزیزانی که در این پژوهش ما را همراهی نمودند، سپاس‌گزاری می‌گردد.

منابع:

1- Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8(6): 464-78.

2- Krämer I, Lipp HP. Bevacizumab, a humanized antiangiogenic monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. J Clin Pharm Ther. 2007; 32(1): 1-14.

3- Folkman J. Proceedings: Tumor Angiogenesis Factor. Cancer Res. 1974; 34(8): 2109-13.

4- Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. News Physiol Sci. 2003; 18: 65–70.

5- Mostafaie A, Mohammadi-Motlagh HR, Mansouri K. Angiogenesis and the Models to Study Angiogenesis. Yakhteh. 2010; 11(4): 374-81.

6- Asakage M, Tsuno NH, Kitayama J, Tsuchiya T, Yoneyama S, Yamada J, et al Sulforaphane induces inhibition of human umbilical vein endothelial cells proliferation by apoptosis. Angiogenesis. 2006; 9(2): 83-91.

7- Jackson SJ, Singletary KW, Venema RC. Sulforaphane suppresses angiogenesis and disrupts endothelial mitotic progression and microtubule polymerization. Vascul Pharmacol. 2006; 46(2): 77-84.

8- Mohammadi M, Riahi-Madvar A, Pourseyedic S, Aminizadeh M. The study of ZnP2+P and CuP2+P effects on myrosinase activity and sulforaphane production in Lepidium draba. Journal of agricultural biotechnology. 2016; 8(1): 81-94. [Persian]

9- Tepea B, Sokmenb M, Akpulata HA, Sokmena A. Screening of the antioxidant potentials of six Salvia species from Turkey. Food Chem. 2006; 95(2): 200-4.

10- Shahsavari N, Barzegar M, Sahari MA, Naghdibadi H. Antioxidant activity and chemical characterization of essential oil of Buniumpersicum. Plant Foods Hum Nutr. 2008; 63(4): 183-8. [Persian]

11- Baharara J, Namvar F, Mousavi M, Ramezani T, Mohamad R. Anti-angiogenesis effect of biogenic silver nanoparticles synthesized using saliva officinalis on chick chorioalantoic membrane (CAM). Molecules. 2014; 19(9): 13498-508.

12- Ayoughi F, Barzegar M, Sahari MA, Naghdi Badi H. Antioxidant effect of dill (Anethum graveolens Boiss.) oil in crude soybean oil and comparison with chemical antioxidants. J Med Plants. 2009; 30: 71-83. [Persian]

13- Miliauskas G, Venskutonis PR, van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem. 2004; 85(2): 231-7.

14- Veeravagu A, Hsu AR, Cai W, Hou LC, Tse VC, Chen X. 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.

15- Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the invivo evaluation of drug delivery systems. Adv Drug Deliv Rev. 2007; 59(11): 1162-76.

16- Sak K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. Chemother Res Pract. 2012; 2012: 282570.

17- Jacob J, Mahal HS, Mukherjee T, Kapoor S. Free radical reactions with the extract of brassica family. Food Chem. 2011; 129(3): 1132-8.

18- Wagner AE, Terschluesen AM, Rimbach G. Health promoting effects of Brassica-derived phytochemicals: from chemopreventive and anti- inflammatory activities to epigenetic regulation. Oxid Med Cell Longev. 2013; 2013: 964539.

19- Bertl E, Bartsch H, Gerhäuser C. Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention. Mol Cancer Ther. 2006; 5(3): 575-85.

20- Davis R, Singh KP, Kurzrock R, Shankar S. Sulforaphane inhibits angiogenesis through activation of FOXO transcription factors. Oncol Rep. 2009; 22(6): 1473-8.

21- Yao H, Wang H, Zhang Z, Jiang BH, Luo J, Shi X. Sulforaphane inhibited expression of hypoxia-inducible factor-1a in human tongue squamous cancer cells and prostate cancer cells. Int J Cancer. 2008; 123(6): 1255-61.

22- Nishikawa T, Tsuno NH, Okaji Y, Sunami E, Shuno Y, Sasaki K, et al. The inhibition of autophagy potentiates anti-angiogenic effects of sulforaphane by inducing apoptosis. Angiogenesis. 2010; 13(3): 227-38.

23- Fernandes RO, Bonetto JH, Baregzay B, de Castro AL, Puukila S, Forsyth H, et al. Modulation of apoptosis by sulforaphane is associated with PGC- 1a stimulation and decreased oxidative stress in cardiac myoblasts. Mol Cell Biochem. 2015; 401(1-2): 61-70.

24- Manikandan P, Murugan RS, Priyadarsivi RV, Vinothini G, Nagini S. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. Life Sci. 2010; 86(25-26): 936-41.