Journal of
Arak University of Medical Sciences

April & May 2021. Vol 24. Issue 1

Research Paper

Investigating the Anti-angiogenic Effects of Nanoemulsion Synthesized From Plant Anethum Graveolens L Essential Oil

Haleh Sadat Tavakkol Afshari[1], *Masoud Homayouni Tabrizi[1], Touran Ardalan[2]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
2. Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Tavakkol Afshari HS, Homayouni Tabrizi M, Ardalan T. [Investigation of Anti-angiogenic Effects of Nanoemulsion Synthesized From Plant Anethum Graveolens L Essential Oil (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2021; 24(1):62-73. https://doi.org/10.32598/JAMS.24.1.4042.8

https://doi.org/10.32598/JAMS.24.1.4042.8

CC BY NC

Article Info:
Received: 16 Feb 2020
Accepted: 24 Aug 2020
Available Online: 01 April 2021

Keywords:
Angiogenesis, Chorioallantoic membrane, Anethum graveolens L essential nanoemulsion

ABSTRACT

Background and Aim Angiogenesis is the process of forming new blood vessels from the old ones; it plays an important role in physiological conditions, such as growth, wound healing, and reproduction. This process also plays a vital role in pathological phenomena and the occurrence of various diseases, especially tumor growth and metastasis. The present study evaluated the anti-angiogenic effects of nanoemulsion synthesized from Anethum graveolens essential oil using the CAM method.

Methods & Materials To investigate the anti-angiogenic effects on the second day of incubation, a window was opened on the eggs. Subsequently, on the eighth day, a gelatin sponge with nanoemulsion with different doses (12.5, 25, and 50 µg/mL) was inserted on the chorioallantoic membrane. On the 12th day of incubation, a research stereomicroscope was used to evaluate the rate of angiogenesis and imaging of the treated area. Vascular factors were examined by Image J software.

Ethical Considerations This study was approved by the Research Ethics Committee of Mashhad Branch, Islamic Azad University (Code: IR.IAU.MSHD.REC.1398.027).

Results The obtained results concerning the effect of nanoemulsion on the rate of angiogenesis in the CAM test indicated a decrease in the length and number of vessels of the chorioallantoic membrane in the treated samples, compared to the controls. Moreover, there was a reduction in the height and weight of treated fetuses, compared to the untreated fetuses (P<0.05).

Conclusion The anti-angiogenic activity of nanoemulsion synthesized from Anethum graveolens essential oil indicated the possible use of this substance for diseases, like cancer, in which the formation of blood vessels is inhibited. Therefore, Anethum graveolens nanoemulsion can be suggested as an agent for further cancer studies.

Extended Abstract

1. Introduction

Angiogenesis is necessary for organogenesis, proliferation, and cell differentiation in the embryonic period; it can be divided into two categories of physiology and pathology [1]. Angiogenesis plays an important role in the metastasis of cancerous tumors; thus, it can be targeted by antitumor therapies [4]. Studies indicated that the encapsulation and emulsification of vegetable oils due to the anti-cancer effects of these compounds can lead to their widespread use in inhibiting cancer cells. Studies have been conducted on the use of vegetable oils, like dill (Anethum graveolens L) [12] in the treatment

* *Corresponding Author:*
Masoud Homayouni Tabrizi, PhD.
Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
Tel: +98 (513) 8435000
E-mail: mhomayouni6@gmail.com

of some cancers, including breast and liver types [11]. The present study examined the effects of different concentrations of dandelion essential oil nanoemulsion using the CAM method.

2. Materials and Methods

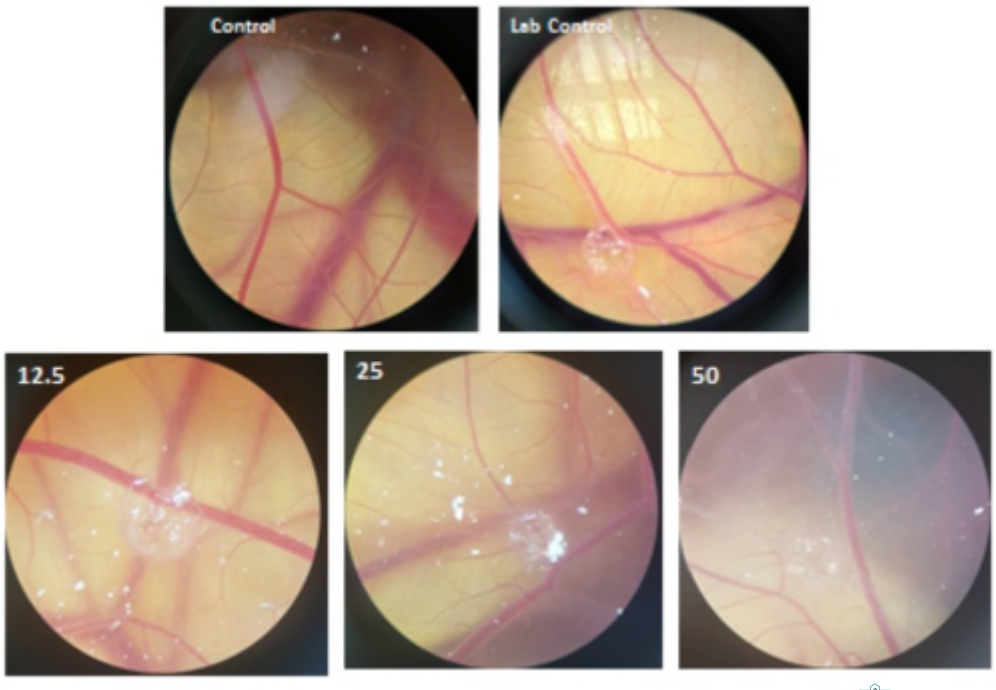
In preparing the nanoemulsion of the dill plant, Tween 20 and Tween 80, ethylene glycol, and distilled water were used. The nanoemulsion was prepared in the presence of ultrasonic waves or power of 200 watts for 60 minutes. In this study, 50 fertilized eggs of ROSS breed were divided into 5 groups, including control and laboratory control groups and 3 experimental groups; accordingly, they were placed in an incubator at 37°C and 65% humidity. On the second day of incubation, a window was made on the eggs. On day 8 of incubation, a gelatinous sponge (a combination of egg white albumin, isothermal agar solution, & antibiotics) was placed on the chorioallantoic membrane. In the control group, 10 µL of sterile distilled water was added to the gelatinous sponge on the chorioallantoic membrane; the laboratory control group was treated with 10 µL of normal saline, followed by 10 µL of different concentrations (12.5, 25, & 50 µg/mL) dill nanoemulsion, i.e., added to the sponge. On the 12th day, the study samples were collected by stereomicroscope. J Image software was used to evaluate the length and number of vessels. Fetal height and weight were measured using calipers and scales, respectively. The obtained data were analyzed in SPSS by one-way Analysis of Variance (ANOVA) and Least Significant Difference (LSD) test.

3. Results

The morphological images of the chorioallantoic membrane in the study samples treated with different concentrations of nanoemulsion (12.5, 25, & 50 µg/mL), compared to the control and laboratory samples presented a decrease in the number of blood vessels (Figure 1). Exploring the number of blood vessels revealed no significant difference between the control and laboratory controls; however, there was a significant difference between the research samples treated with different concentrations of nanoemulsion and the controls (*P<0.05 & ***P<0.001).

4. Discussion and Conclusion

Preventing the growth of cancer cells and inhibiting them can be performed by various strategies, such as inducing apoptosis or inhibiting angiogenesis. Thus, inhibiting the angiogenic process inhibits the growth and development of cancer cells. Recently, numerous anti-angiogenic drugs have been studied; however, most of them presented high toxicity and have developed drug resistance. Additionally, they failed to cross obstacles to achieve the desired goal [19]. Due to their small size, nanoemulsions can cross the



Journal of Arak University of Medical Sciences

Figure 1. Photostreomicroscopic image of the chorioallantoic membrane of chick embryos in nano-emulsion-treated samples and control (without any treatment) and laboratory control (normal saline treatment)

blood barrier and easily be present in tumor tissues; thus, they can exert their effects through the blood vessels surrounding the tumor. They can also be designed to encapsulate different drugs and select specific targets [20]. Dehelean et al. (2011) applied nanoemulsion with antiangiogenic properties for drug delivery. They investigated the antiangiogenic effect of nanoemulsion synthesized from flaxseed oil using the CAM method. The relevant results indicated that this combination of effects on vascular mesenchyme prevents angiogenesis [21]. Another study Dehelean et al. (2013) examined the effect of betulin nanoemulsion on angiogenesis in skin carcinoma cells in mice and chicken embryo chorion membranes. The related results also supported the anti-angiogenic effects of nanoemulsions [22]. Yousefian et al. (2020) explored the anti-angiogenic effect of nanoemulsion of lemon essential oil was using the CAM method; they concluded that this compound prevents angiogenesis [23]. In the present study, the anti-angiogenic effects of dill nanoemulsion were confirmed. This study, similar to the studies mentioned above, identified a significant reduction (***P<0.001) in the number and length of blood vessels in the chorioallantoic membrane of chickens.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All experiments of this research were carried out in compliance with ethical standards and according to the approval of the Research Ethics Committee of Mashhad Branch, Islamic Azad University (Code: IR.IAU.MSHD.REC.1398.027).

Funding

This research has not received any special funding from public, commercial or non-profit sector financing organizations.

Authors' contributions

Conceptualization: Masoud Homayouni Tabrizi Methodology: Masoud Homayouni Tabrizi, Turan Ardalan. Validation: Masoud Homayouni Tabrizi, Turan Ardalan. Analysis, Research: Haleh Sadat Tavakol Afshari. Draft: Haleh Sadat Tavakol Afshari. Edited and finalized by: Masoud Homayouni Tabrizi, Turan Ardalan. Visualization, Supervision, Project Management, Financing: Masoud Homayouni Tabrizi.

Conflicts of interest

The authors declared no conflicts of interest.

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات ضدرگ‌زایی نانوامولسیون سنتزشده از اسانس گیاه شوید

هاله سادات توکل افشاری[۱]، *مسعود همایونی تبریزی[۱]، توران اردلان[۲]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.
۲. گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۷ بهمن ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۳ شهریور ۱۳۹۹
تاریخ انتشار: ۱۲ فروردین ۱۴۰۰

چکیده

زمینه و هدف رگ‌زایی یا آنژیوژنز، به فرایند تشکیل عروق خونی جدید از عروق پیشین گفته می‌شود که نقش مهمی در شرایط فیزیولوژیک، ازجمله رشد و نمو، ترمیم زخم و تولید مثل بر عهده دارد. همچنین این فرایند در پدیده‌های پاتولوژیکی و بروز بیماری‌های مختلف، به‌خصوص رشد تومور و متاستاز نقش حیاتی دارد. در پژوهش حاضر، اثرات ضدرگ‌زایی نانوامولسیون سنتزشده از اسانس گیاه شوید با استفاده از روش CAM ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها به منظور بررسی اثرات ضدرگ‌زایی در روز دوم انکوباسیون، روی تخم‌مرغ‌ها پنجره باز شد و در روز هشتم یک اسفنج ژلاتینی به همراه نانوامولسیون شوید با دُزهای مختلف (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) روی پرده کوریوآلانتوئیک قرار داده شد. در روز دوازدهم انکوباسیون از استرئومیکروسکوپ تحقیقاتی به منظور ارزیابی میزان رگ‌زایی و تصویربرداری از ناحیه تیمار استفاده شد. فاکتورهای عروقی با نرم‌افزار Image J بررسی شد.

ملاحظات اخلاقی تمامی آزمایش‌های این تحقیق با رعایت موازین اخلاقی و طبق تأیید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام گرفت (کد:IR.IAU.MSHD.REC.1398.027).

یافته‌ها نتایج بررسی اثر نانوامولسیون بر میزان رگ‌زایی در تست CAM، نشانگر کاهش طول و تعداد رگ‌های پرده کوریوآلانتوئیک در نمونه‌های تیمارشده در مقایسه با تیمارنشده است. همچنین کاهش قد و وزن جنین‌های تیمارشده در مقایسه با تیمارنشده در این بررسی نشان داده شد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری فعالیت ضدرگ‌زایی نانوامولسیون شوید نشان‌دهنده کاربرد احتمالی این ماده برای بیماری‌هایی همچون سرطان است که مهار تشکیل رگ‌های خونی در آن‌ها مورد نظر است؛ بنابراین نانوامولسیون شوید می‌تواند به عنوان یک ماده برای مطالعات بیشتر در زمینه سرطان پیشنهاد شود.

کلیدواژه‌ها:
آنژیوژنز، پرده کوریوآلانتوئیک، نانوامولسیون اسانس شوید

مقدمه

آنژیوژنز به فرایند بیولوژیکی تشکیل رگ‌های جدید از رگ‌های موجود در بافت اطلاق می‌شود. اگر تعادل بین فاکتورهای القاکننده و مهارکننده رگ‌زایی دچار اختلال شود، زمینه برای بروز بیماری‌ها، ازجمله رشد و متاستاز سلول‌های سرطانی فراهم خواهد شد. امروزه بسیاری از دانشمندان از ترکیبات گیاهی به عنوان مهارکننده‌های آنژیوژنز به عنوان راهکار ضدتوموری استفاده می‌کنند. پدیده آنژیوژنز برای اندام‌زایی، تکثیر و تمایز سلولی در دوره جنینی لازم است که می‌توان آن را به دو دسته فیزیولوژی و پاتولوژی تقسیم‌بندی کرد.

آنژیوژنز فیزیولوژیک، فرایندی است به شدت تنظیم‌شده که در مواردی مانند ترمیم زخم، سیکل‌های قاعدگی، رشد جفت، لانه‌گزینی جنین و تخمک‌گذاری اتفاق می‌افتد، درحالی‌که آنژیوژنز پاتوفیزیولوژیک به تکثیر غیرقابل کنترل اندوتلیوم مویرگی اشاره دارد که ازجمله مثال‌های این گروه می‌توان آترواسکلروز، اندومتریوز و رتینوپاتی دیابتی را نام برد [۱].

ازویژگی‌های اصلی سلول‌های سرطانی می‌توان به مقاومت در برابر مرگ سلولی، عدم حساسیت به سیگنال‌های متوقف کننده رشد سلول و رگ‌زایی اشاره کرد [۲، ۳].

از آنجا که آنژیوژنز در متاستاز تومورهای سرطانی دارای نقش

* نویسنده مسئول:
دکتر مسعود همایونی تبریزی
نشانی: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۸۴۳۵۰۰۰ (۵۱۳) ۹۸+
پست الکترونیکی: mhomayouni6@gmail.com

مهمی است، می‌تواند هدف درمان‌های ضدتوموری قرار گیرد [۴]. در حالت سلامت آنژیوژنز به وسیله تعادل بین فاکتورهای آنژیوژنیک و آنتی‌آنژیوژنیک تنظیم می‌شود. زمانی که مقدار فاکتورهای رشد آنژیوژنیك بیشتر از مهارکننده‌های آنژیوژنز باشد، تعادل به سمت رشد رگ‌های جدید جابه‌جا می‌شود [۵].

پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه (CAM) یک پرده شفاف همراه با عروق خونی زیاد است که به واسطه ترکیب لایه‌های مزودرمی آلانتوئیس و کوریون تشکیل می‌شود [۶]. ترکیب ماتریکس خارج سلولی و درجه تمایز سلول‌های اندوتلیال و عروقی، ازجمله ویژگی‌های CAM هستند که باعث شده از آن به عنوان الگویی برای مطالعات آنژیوژنز استفاده کنند [۷].

نانوامولسیون شبیه به میکرو امولسیون است که قطر ذرات آن‌ها در مقیاس نانومتر بوده و به همین دلیل به آن نانوامولسیون می‌گویند [۸]. یک نانوامولسیون معمولی حاوی روغن، آب و امولسیفایر (سورفاکتانت) است [۹].

سنتز نانوامولسیون‌ها به روش‌های مختلف قابل انجام است که عموماً به دو دسته اصلی تقسیم می‌شوند که شامل امولسیون‌سازی با انرژی بالا و امولسیون‌سازی با انرژی پایین [۱۰] است.

مهم‌ترین ویژگی نانوامولسیون‌ها، اندازه کوچک آن‌ها است که سبب افزایش نفوذ یا جذب آن‌ها توسط سلول‌ها می‌شود. اخیراً استفاده از نانوامولسیون‌ها برای مصارف درمان و دارو مورد توجه قرار گرفته است.

بررسی‌ها نشان داده که کپسوله کردن و امولسیفیکاسیون روغن‌های گیاهی به دلیل اثرات ضدسرطان این ترکیبات می‌تواند سبب استفاده وسیع از آن‌ها در زمینه مهار سلول‌های سرطانی شود. تا کنون نیز مطالعاتی در زمینه استفاده از روغن‌های گیاهی در درمان برخی سرطان‌ها، ازجمله سرطان سینه و کبد انجام شده است [۱۱].

گیاه دارویی شوید یکی از بهترین گیاهان دارویی قابل تغذیه است که به عنوان یک داروی جانبی در جهان استفاده می‌شود. شوید با نام علمی (Anethum graveolens L) جزء خانواده جعفری یا چتریان، گیاهی یک‌ساله و دارای برگ‌های پر به رنگ سبز روشن شناخته می‌شود. جنس آن دارای سه گونه شناخته‌شده به نام‌های گراویولانس، کریزیوم و اینولوکراتوم است که مهم‌ترین گونه آن شوید معمولی یا همان گراویولانس است که عمدتاً در هندوستان کشت می‌شود.

آنتریوم گراویولانس (شوید) حاوی موادی همچون عصاره اسنشال، روغن چرب، رطوبت ۸/۳۹ درصد، پروتئین ۱۵/۶۸ درصد، کربوهیدرات ۳۶ درصد، فیبر ۱۴/۸ درصد، آش ۹/۸ درصد و فوران و کومارین، انواع پلی‌فنول و مواد معدنی همچون کلسیم، پتاسیم، منیزیم، فسفر، سدیم و ویتامین A است [۱۲].

در این بررسی از نانوامولسیون تهیه‌شده از اسانس گیاه شوید، به منظور دسترسی زیستی به اسانس شوید استفاده شد و اثرات این نانوامولسیون بر میزان رگ‌زایی با استفاده از روش CAM ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نانوامولسیون

در تهیه نانوامولسیون گیاه شوید، از توئین ۲۰ و توئین ۸۰ به عنوان امولسیون فایر، اتیلن گلیکول به عنوان حلال کمکی و آب مقطر استفاده شد. نانوامولسیون در حضور امواج ماوراء صوت با قدرت ۲۰۰ وات و به مدت ۶۰ دقیقه تهیه شد [۱۳]. این نانوامولسیون دارای اندازه ۳۱/۱ نانومتر است و مورفولوژی آن به شکل تقریباً کروی گزارش شده است.

بررسی رگ‌زایی

به منظور بررسی فعالیت آنژیوژنز از تست CAM استفاده شد. در این بررسی پنجاه عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار از نژاد ROSS از شرکت مرغداران توس مشهد، تهیه و پس از انجام ضدعفونی به ماشین جوجه‌کشی با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۵ درصد منتقل شدند. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در زیر هود لامینار، در سر پهن هر تخم‌مرغ پنجره و در انتهای هر نمونه کیسه هوایی به شکل یک نقطه ایجاد شد. در ادامه، این پنجره‌ها با استفاده از چسب زخم و پارافین استریل بسته شده و دوباره تخم‌مرغ‌ها به انکوباتور انتقال یافتند.

نمونه‌ها در پنج گروه ده‌تایی شامل دو گروه کنترل و کنترل آزمایشگاهی و سه گروه آزمایش شامل غلظت‌های مختلف نانوامولسیون (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم / میلی‌لیتر) تقسیم شدند. در روز هشتم انکوباسیون، اسفنج ژلاتینی به منظور فراهم کردن بستر تیمار نانوامولسیون ساخته و روی غشای کوریوآلانتوئیک قرار داده شد. برای تهیه این اسفنج آلبومین سفیده تخم‌مرغ و محلول آگار (تهیه‌شده با نرمال سالین) هم دما شده و سپس با هم ترکیب می شوند.

در ادامه به آن، آنتی‌بیوتیک اضافه می‌شود. سپس محلول حاصل به پتری‌دیش منتقل شده و به منظور ایجاد یک لایه ژلاتینی در یخچال نگهداری می شود. در زمان استفاده هر قطعه با ابعاد ۱×۴×۴ میلی‌متر روی پرده کوریوآلانتوئیک قرار می‌گیرد.

گروه آزمایش در شرایط طبیعی نگهداری و به اسفنج ژلاتینی روی پرده کوریوآلانتوئیک توسط میکروپیپت میزان ده میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد، گروه آزمایش آزمایشگاهی با ده میکرولیتر ترکیب نرمال سالین تیمار شد و در ادامه ده میکرولیتر از غلظت‌های مختلف (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نانوامولسیون شوید روی اسفنج اضافه

شد. پس از تیمار نمونه‌ها، پنجره تخم‌مرغ‌ها با استفاده از چسب و پارافین مجدداً بسته شد و نمونه‌ها به دستگاه جوجه‌کشی منتقل شدند. در روز دوازدهم، نمونه‌ها از ماشین جوجه‌کشی خارج و پنجره‌ها باز شدند. توسط استرئومیکروسکوپ از نمونه‌ها در محدوده اسفنج عکس‌برداری صورت گرفت.

تصاویر با استفاده از نرم‌افزار Image J برای ارزیابی طول و تعداد رگ‌ها ارزیابی شدند. قد و وزن جنین‌ها نیز به ترتیب به کمک کولیس (واحد آن میلی‌متر است) و ترازو (واحد آن گرم است) اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون LSD تحلیل شدند.

یافته‌ها

بررسی تغییرات مورفولوژیک آنژیوژنز

در این بررسی تعداد، طول رگ‌های خونی، قد و همچنین وزن جنین اندازه‌گیری شد. تصاویر مورفولوژی از پرده کوریوآلانتوئیک در نمونه‌های تیمارشده با غلظت‌های مختلف نانوامولسیون (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با نمونه‌های کنترل و کنترل آزمایشگاهی کاهش میزان رگ‌ها را نشان می‌دهد (تصویر شماره ۱).

ارزیابی قد و وزن جنین‌ها

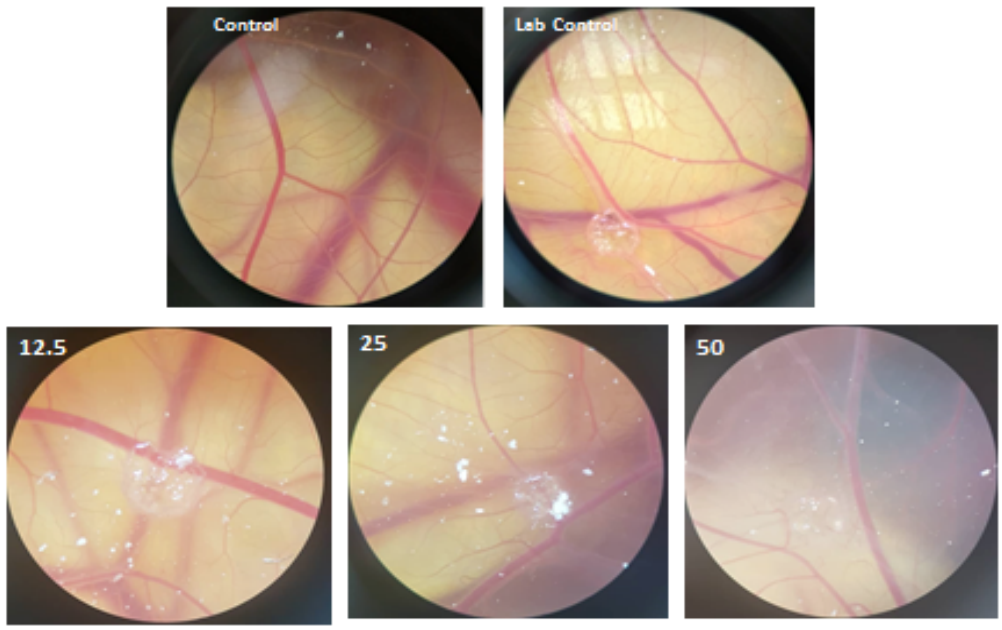
در این مطالعه، وزن و قد جنین‌ها با استفاده از ترازو و کولیس ارزیابی شد و سطح معناداری تغییرات نسبت به گروه کنترل با استفاده از نرم‌افزار آماری بررسی شد. بررسی قد در جنین‌های تیمارشده در مقایسه با کنترل (تصویر شماره ۲) نشان می‌دهد که اختلاف معناداری بین کنترل و کنترل آزمایشگاهی و همچنین بین گروه کنترل و نمونه تیمارشده با غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر وجود ندارد، اما با افزایش غلظت به ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سطح معناداری *P<۰/۰۵ و **P<۰/۰۱ وجود دارد.

در ارزیابی وزن جنین‌ها (تصویر شماره ۳) نیز هیچ تفاوت معناداری بین گروه‌های کنترل و کنترل آزمایشگاهی وجود ندارد. همچنین بین گروه کنترل و نمونه تیمارشده با غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز تفاوت معناداری وجود ندارد، اما با افزایش غلظت به ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تفاوت در سطح معناداری *P<۰/۰۵ مشاهده می‌شود.

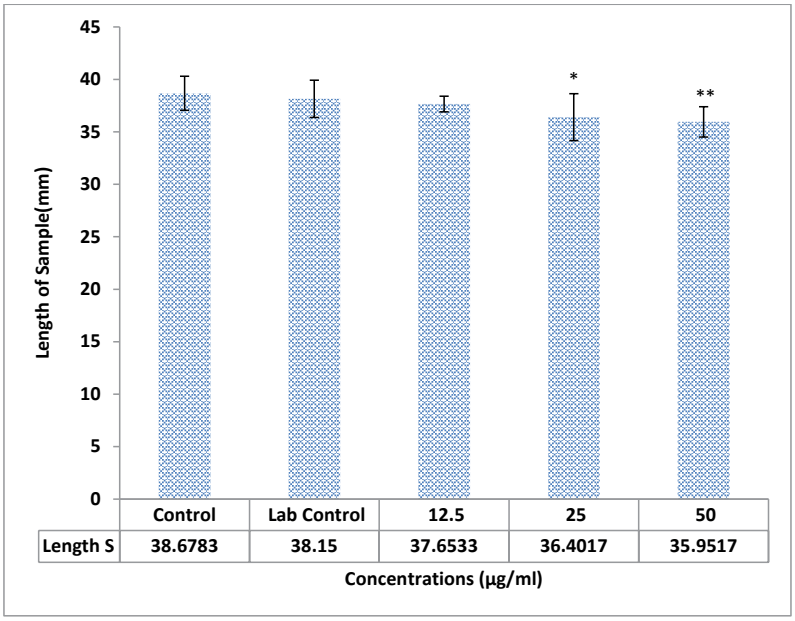
نتایج حاصل از ارزیابی میزان رگ‌زایی نشان می‌دهد که در هیچ یک از فاکتورها بین گروه‌های کنترل و کنترل آزمایشگاهی تفاوت معنادار نیست، ولی با تیمار نمونه‌ها با نانوامولسیون طول و تعداد رگ‌ها کاهش یافته و این کاهش میزان رگ‌زایی رشد جنین (وزن و قد) را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد.

بررسی طول رگ‌های خونی

ارزیابی طول عروق خونی در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد که طول عروق خونی در نمونه‌های شاهد نسبت به کنترل آزمایشگاهی اختلاف معناداری وجود ندارد، اما طول عروق خونی در نمونه‌های تیمارشده با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم



تصویر ۱. تصویر استریومیکروسکوپ از پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه در نمونه‌های تیمار با نانوامولسیون اسانس شوید در مقایسه با گروه‌های آزمایش و آزمایش آزمایشگاهی



تصویر ۲. مقایسه میانگین قد در نمونه‌های تیمارشده با غلظت‌های مختلف نانوامولسیون (۱۲.۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)

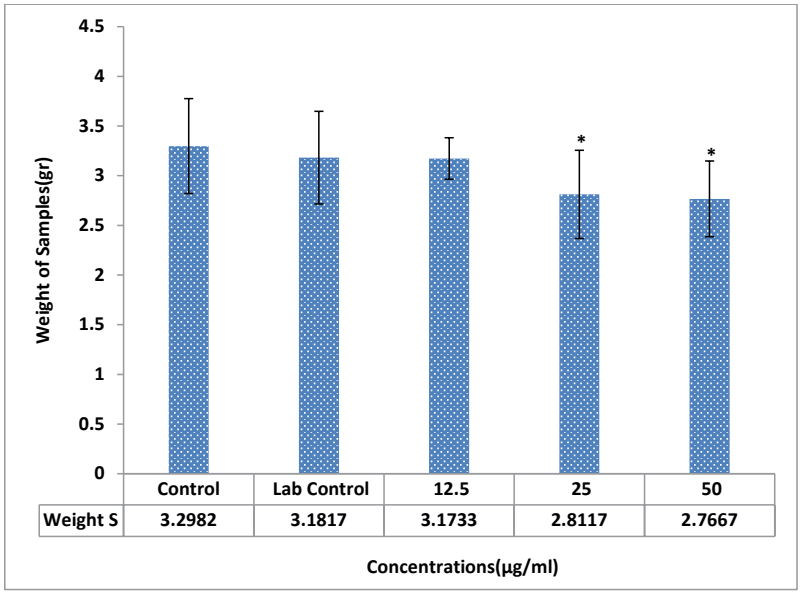
مقایسه با گروه کنترل و کنترل آزمایشگاهی که نشان‌دهنده کاهش قد در سطح معناداری *P<۰/۰۵ و **P<۰/۰۱ (در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) است.

بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل اختلاف معنادار **P<۰/۰۱ و ***P<۰/۰۰۱ را نشان می‌دهد (تصویر شماره ۴).

می‌شود که اختلاف معناداری بین گروه کنترل و کنترل آزمایشگاهی وجود ندارد، اما بین غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ تیمارشده با شاهد اختلاف معنادار *P<۰/۰۵ و ***P<۰/۰۰۱ وجود دارد.

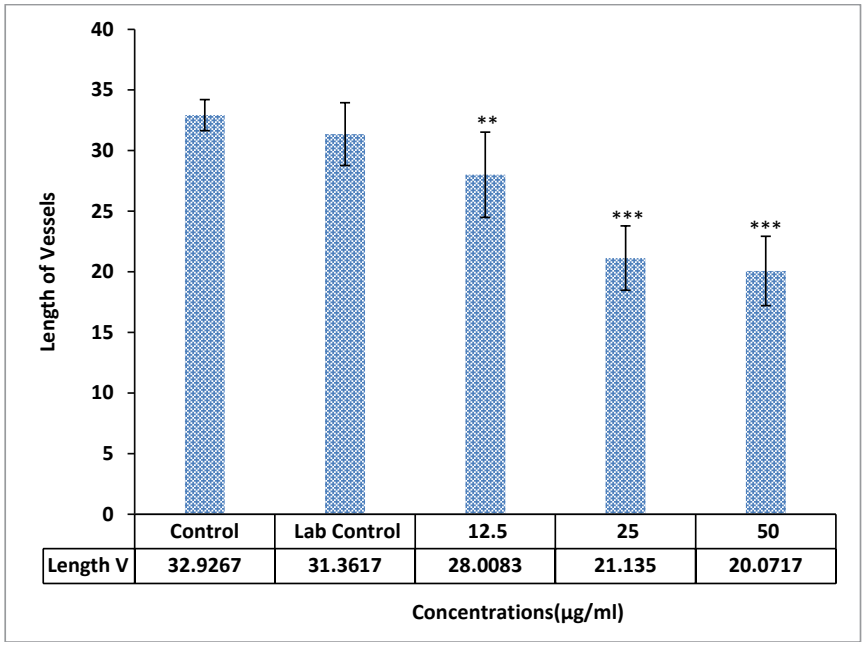
بررسی میانگین تعداد عروق خونی

در بررسی تصویر شماره ۵ مربوط به تعداد عروق خونی مشاهده



تصویر ۳. مقایسه میانگین وزن جنین‌ها در نمونه‌های تیمارشده با غلظت‌های مختلف نانوامولسیون (۱۲.۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)

مقایسه با کنترل و کنترل آزمایشگاهی که نشان‌دهنده کاهش وزن در سطح معناداری *P<۰.۰۵ (در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) است.

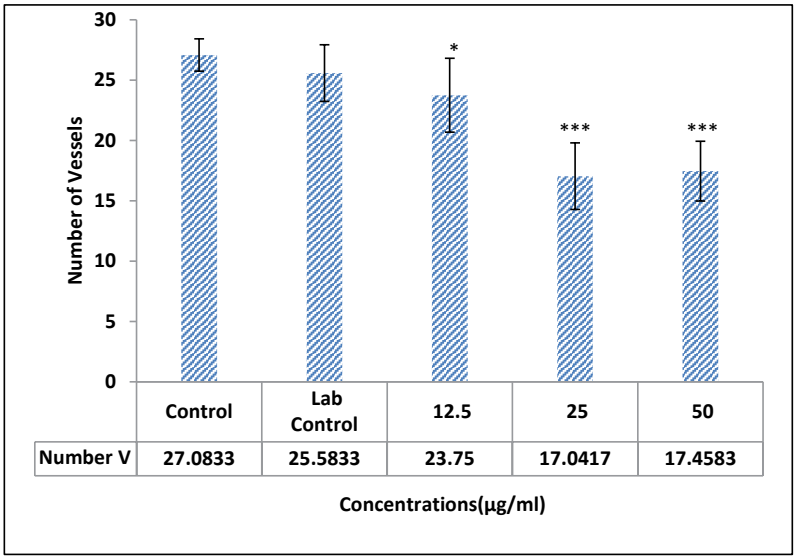


تصویر ۴. کاهش طول عروق خونی در نمونه‌های تیمارشده با غلظت‌های مختلف نانواملسیون (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)
مقایسه با کنترل و کنترل آزمایشگاهی در سطح معناداری $P<0/01^{**}$ و $P<0/001^{***}$ نشان می‌دهد.

بحث

نانواملسیون‌ها، املسیون‌های بسیار ریزشده یا املسیون‌های زیرمیکرون هستند که اندازه ذرات آنها پنجاه تا هزار نانومتر است و با توجه به ساختار و ویژگی‌های منحصربه‌فرد خود از نظر ترمودینامیکی، سیستم هایایزوتروبیک ثابتی هستند و کاربردهای زیادی دارند [۱۴].

اسانس‌ها مخلوطی از ترکیبات روغنی فرّار است که به عنوان یک متابولیت ثانویه در گیاهان دارویی ساخته می‌شوند، این ترکیبات آب‌گریز بوده و دارای حلالیت بسیار



تصویر ۵. مقایسه میانگین تعداد انشعابات عروقی در سطح پرده کوریو آلانتوئیک در نمونه‌های تیمارشده با غلظت‌های مختلف نانواملسیون (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)
مقایسه با کنترل و کنترل آزمایشگاهی که نشان‌دهنده کاهش تعداد عروق در سطح معناداری $P<0.05^{*}$ و $P<0.001^{***}$ است.

پایینی در آب هستند و به راحتی توسط گرما، نور و هوا اکسیده می‌شوند [۱۵، ۱۶]. روغن‌های گیاهی دارای محتوای فنولی بوده و به همین علت از عوامل مؤثر در درمان برخی بیماری‌ها، ازجمله سرطان به شمار می‌روند. تا کنون بسیاری از پژوهش‌ها اثرات این روغن‌ها را در درمان سرطان‌هایی همچون سینه، کبد، روده بزرگ و... بررسی کرده‌اند.

مهم‌ترین مشکل در به‌کارگیری این ترکیبات حلالیت ضعیف در آب و خاصیت چربی‌دوستی بالای آن‌ها بوده که استفاده از این ترکیبات را محدود کرده است. به همین دلیل، اخیراً تلاش شده که نانوامولسیون‌های سنتزشده از روغن‌های گیاهی به منظور افزایش سازگاری زیستی و اثربخشی بیشتر مورد استفاده قرار گیرد [۱۱].

بنابراین در این مطالعه از نانوامولسیون اسانس شوید به علت پایداری زیستی بالاتر نسبت به اسانس، جهت بررسی اثرات بیولوژیک استفاده کردیم. در بررسی حاضر، از نانوامولسیون شوید جهت ارزیابی اثرات رگ‌زایی روی پرده کوریوآلانتوئیک جوجه با روش CAM استفاده شد.

نتایج حاصل از بررسی میزان رگ‌زایی نشان می‌دهد که نانوامولسیون گیاه شوید قادر به کاهش تعداد و طول عروق خونی در جنین‌های تیمارشده در مقایسه با گروه تیمارنشده است و ممکن است کاهش رگ‌زایی سبب کاهش رشد جنین (کاهش قد و وزن) شود.

جلوگیری از توسعه سلول‌های سرطانی و مهار آن‌ها می‌تواند با راهکارهای مختلفی همچون القای آپوپتوز یا مهار رگ‌زایی صورت گیرد. مهار رگ‌زایی یکی از مهم‌ترین استراتژی‌ها جهت سرکوب سرطان به شمار می‌رود. ریزمحیط‌زیست تومور از ماتریس خارج سلولی (ECM)، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اپیتلیال، سلول‌های ایمنی، پریسیت‌ها، چربی‌ها، سلول‌های گلیال (موجود در سیستم عصبی)، پروتئین‌ها، سلول‌های عروقی و سلول‌های لنفاوی تشکیل شده است.

آنژیوژنز جزء مهمی از متاستاز تومور است و می‌تواند متاستاز تومور را با فراهم کردن زمینه‌ای برای خروج سلول‌های تومور و ترک محل و ورود به جریان خون تسهیل کند [۱۷]. کلونیزاسیون متاستازی بدون ایجاد عروق جدید نمی‌تواند به صورت موفق ایجاد شود، زیرا تمام سلول‌ها باید در حدود صد تا دویست میکرون از رگ‌های خونی برای دریافت اکسیژن و مواد مغذی فاصله داشته باشند [۱۸].

بنابراین مهار فرایند رگ‌زایی، سبب مهار رشد و توسعه سلول‌های سرطانی می‌شود. در سال‌های اخیر، بسیاری از داروهای ضدرگ‌زایی بررسی شده‌اند، اما بیشتر آن‌ها دارای سمیت بالا بوده و مقاومت ایجاد کرده‌اند و از طرفی توانایی عبور از موانع برای رسیدن به هدف مورد نظر را ندارند [۱۹].

نانومولسیون‌ها با توجه به اندازه کوچک خود توانایی عبور از سد خونی را داشته و به راحتی می‌توانند از طریق عروق خونی احاطه‌کننده تومور، در بافت‌های توموری حضور یافته و اثرات خود را اعمال کنند. علاوه بر این، آن‌ها همچنین می‌توانند برای کپسوله کردن انواع مختلفی از داروها و انتخاب اهداف خاص طراحی شوند [۲۰].

در پژوهش دهلین[1] و همکاران از نانوامولسیون دارای خاصیت آنتی‌آنژیوژنیک برای دارورسانی استفاده شد. آن‌ها اثر آنتی‌آنژیوژنیک نانوامولسیون سنتزشده از روغن دانه کتان را با استفاده از روش CAM بررسی کردند. نتایج نشان داد که این ترکیب با اثر بر مزانشیم رگ‌ها، از رگ‌زایی جلوگیری می‌کند [۲۱].

همچنین این گروه مطالعاتی در سال ۲۰۱۳ در طی تحقیق دیگری اثر نانوامولسیون بتولین (ترکیبی که از پوست درخت غان جدا شده بود) را بر رگ‌زایی در سلول‌های کارسینوم پوست در موش و غشای کوریون جنین مرغ بررسی کردند. نتایج این بررسی نیز تأییدکننده اثر ضدرگ‌زایی نانوامولسیون بود [۲۲].

درمطالعه‌یوسفیان‌وهمکاران،اثرآنتی‌انژیوژنیک‌نانوامولسیون‌اسانس لیموبااستفاده‌ازروش CAMموردمطالعه‌قرارگرفت‌ونتایج‌حاصل‌از آن نشان داد که این ترکیب از رگ‌زایی جلوگیری می‌کند [۲۳].

در مطالعه حاضر اثرات ضدرگ‌زایی نانوامولسیون گیاه شوید تأیید شده است. این بررسی مشابه مطالعات یادشده کاهش معنادار (P<۰/۰۰۱***) تعداد و طول رگ‌های خونی را در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه نشان داد.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، اثرات رگ‌زایی نانوامولسیون سنتزشده از اسانس گیاه شوید با استفاده از روش‌های CAM بررسی شد. نتایج این بررسی بیانگر توانایی نانوامولسیون گیاه شوید درکاهش میزان رگ‌زایی است. از آنجا که کاهش فرایند رگ‌زایی یکی از راه‌حل‌های مهم جهت مهار رشد تومور به شمار می رود؛ بنابراین می‌توان نانوامولسیون سنتزشده از گیاه شوید را به عنوان عاملی برای انجام تحقیقات بیشتر در زمینه درمان سرطان و پیشگیری از متاستاز با انجام آزمایش‌های بیشتر پیشنهاد کرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

تمامی آزمایش‌های این تحقیق با رعایت موازین اخلاقی و طبق تأیید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی با شناسه مصوبه IR.IAU.MSHD.REC.1398.027 انجام شد.

1. Dehelean

حامی مالی

این تحقیق هیچ کمک مالی خاصی از سازمان‌های تأمین مالی بخش‌های دولتی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی: مسعود همایونی تبریزی؛ روش‌شناسی: مسعود همایونی تبریزی، توران اردلان؛ اعتبارسنجی: مسعود همایونی تبریزی، توران اردلان؛ تحلیل، تحقیق و بررسی: هاله سادات توکل افشاری؛ نگارش پیش‌نویس: هاله سادات توکل افشاری؛ ویراستاری و نهایی‌سازی نوشته: مسعود همایونی تبریزی، توران اردلان؛ بصری‌سازی، نظارت، مدیریت پروژه و تأمین مالی: مسعود همایونی تبریزی.

تعارض منافع

طبق نظر نویسندگان این مقاله هیچ گونه تعارض منافعی ندارد.

Reference

[1] Van RN, Piek JJ, Schaper W, Bode C, Buschmann I. Arteriogenesis: Mechanisms and modulation of collateral artery development. J Nucl Cardiol. 2001; 8(6):687-93. [DOI:10.1067/mnc.2001.118924] [PMID]

[2] Korir A, Mauti N, Moats P, Gurka MJ, Mutuma G, Metheny C, et al. Developing clinical strength-of-evidence approach to define HIV-associated malignancies for cancer registration in Kenya. PloS one. 2014; 9(1):e85881. [DOI:10.1371/journal.pone.0085881] [PMID] [PMCID]

[3] Fiaschi T, Chiarugi P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: A diabolic liaison. Int J Cell Biol. 2012; 2012:762825. [DOI:10.1155/2012/762825] [PMID] [PMCID]

[4] Kouhestanian K, Baharara J, Ramezani T, Mousavi M. [Antiangiogenic effects of eugenol inchorioallantoic membrane of chick embryo (Persian)]. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2015; 23(4):2109-17. https://jssu.ssu.ac.ir/browse.php?a_code=A-10-1624-2&slc_lang=en&sid=1

[5] Salehi E, Amjadi FS, Khazaei M. [Angiogenesis in health and dDisease: Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Persian)]. J Isfahan Med Sch. 2011; 29(132):312-26. https://www.sid.ir/fa/Journal/ViewPaper.aspx?ID=139629

[6] Attarian F, Zafar Bala Nezhad S, Tehrani pour M. [The effect of stachys lavandulifolia alcoholic extract on angiogenesis in chorioallantoic membrane of ross chicken embryo (Persian)]. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2016; 23(11):1084-93. https://jssu.ssu.ac.ir/browse.php?a_code=A-10-2257-1&slc_lang=en&sid=1

[7] Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo assay to study antiangiogenesis. Pharmaceuticals. 2010; 3(3):482-513. [DOI:10.3390/ph3030482] [PMID] [PMCID]

[8] Gutiérrez JM, González C, Maestro A, Solè IM, Pey CM, Nolla J. Nanoemulsions: New applications and optimization of their preparation. Curr Opin Colloid Interface Sci. 2008; 13(4):245-51. [DOI:10.1016/j.cocis.2008.01.005]

[9] Gupta A, Eral HB, Hatton TA, Doyle PS. Nanoemulsions: Formation, properties and applications. Soft Matter. 2016; 12(11):2826-41. [DOI:10.1039/C5SM02958A] [PMID]

[10] Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. Adv Colloid Interface Sci. 2004; 108-9:303-18. [DOI:10.1016/j.cis.2003.10.023] [PMID]

[11] Nirmala MJ, Nagarajan R. Microemulsions as potent drug delivery systems. J Nanomed Nanotechnol. 2016; 7:e139. [DOI:10.4172/2157-7439.1000e139]

[12] Mohammed GJ, Kadhim MJ, Hussein HM. Characterization of bioactive chemical compounds from Aspergillus terreus and evaluation of antibacterial and antifungal activity. Int J Pharmacogn Phytochem Res. 2016; 8(6):889-905. https://www.researchgate.net/profile/Mohanad-Jawad/publication/304945402_Characterization_of_bioactive_chemical_compounds_from_aspergillus_terreus_and_evaluation_of_antibacterial_and_antifungal_activity/links/57e2482908ae9e25307eb3ba/Characterization-of-bioactive-chemical-compounds-from-aspergillus-terreus-and-evaluation-of-antibacterial-and-antifungal-activity.pdf

[13] Tavakkol Afshari HS, Homayouni Tabrizi M, Ardalan T. [Evaluation of Antioxidant and Anticancer Effects of Nanoemulsions Prepared Using Dill Essential Oil (Persian)]. J Arak Univ of Med Sci. 2019; 22(4):40-51. [DOI:10.32598/JAMS.22.4.40]

[14] Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: An advanced mode of drug delivery system. 3 Biotech. 2015; 5(2):123-7. [DOI:10.1007/s13205-014-0214-0] [PMID] [PMCID]

[15] Geng S, Cui Z, Huang X, Chen Y, Xu D, Xiong P. Variations in essential oil yield and composition during Cinnamomum cassia bark growth. Ind Crops Prod. 2011; 33(1):248-52. [DOI:10.1016/j.indcrop.2010.10.018]

[16] Sabzghabaee AM, Nili F, Ghannadi A, Eizadi-Mood N, Anvari M. Role of menthol in treatment of candidial napkin dermatitis. World J Pediatr. 2011; 7(2):167-70. [DOI:10.1007/s12519-011-0253-0] [PMID]

[17] Mäkelä S. [Use of mesoporous torture particles as a drug carrier in the development of therapies for visceral leishmaniasis (Finnish)] [MSc. Thesis]. Kuopio, Finland: University of Eastern Finland. 2015. https://erepo.uef.fi/bitstream/handle/123456789/16201/urn_nbn_fi_uef-20151124.pdf?sequence=-1

[18] Paduch R. The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. Cell Oncol. 2016; 39(5):397-410. [DOI:10.1007/s13402-016-0281-9] [PMID] [PMCID]

[19] Tan W, Wang H, Chen Y, Zhang X, Zhu H, Yang C, et al. Molecular aptamers for drug delivery. Trends Biotechnol. 2011; 29(12):634-40. [DOI:10.1016/j.tibtech.2011.06.009] [PMID] [PMCID]

[20] Sandip T, Yi-Meng T, Mansoor A. Preparation and in vitro characterization of multifunctional nanoemulsions for simultaneous MR imaging and targeted drug dleivery. J Biomed Nanotechnol. 2006; 2(3-4):217-24. [DOI:10.1166/jbn.2006.038]

[21] Dehelean CA, Feflea S, Ganta S, Amiji M. Anti-angiogenic effects of betulinic acid administered in nanoemulsion formulation using chorioallantoic membrane assay. J Biomed Nanotechnol. 2011; 7(2):317-24. [DOI:10.1166/jbn.2011.1297] [PMID]

[22] Dehelean CA, Feflea S, Gheorgheosu D, Ganta S, Cimpean AM, Munteanu D, et al. Anti-angiogenic and anti-cancer evaluation of betulin nanoemulsion in chicken chorioallantoic membrane and skin carcinoma in Balb/c mice. J Biomed Nanotechnol. 2013; 9(4):577-89. [DOI:10.1166/jbn.2013.1563] [PMID]

[23] Yousefian Rad E, Homayouni Tabrizi M, Ardalan P, Seyedi SM, Yadamani S, Zamani-Esmati P, et al. Citrus Lemon Essential Oil Nanoemulsion (CLEO-NE), a safe cell-depended apoptosis inducer in human A549 lung cancer cells with anti-angiogenic activity. J Microencapsul. 2020; 37(5):394-402. [DOI:10.1080/02652048.2020.1767223] [PMID]

This Page Intentionally Left Blank