

تأثیر عصاره آبی کلاله زعفران *Crocus sativus* بر بیان ژن‌های VEGF و FGF در روند آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه

محمدرضا پورمحمد^۱، جینا خیاطزاده^{۲*}، هانیه ستاری‌فرد^۳، مریم طهرانی‌پور^۴، حسن رخشنده^۵، سعیده ظفر بالانژاد^۶

تاریخ دریافت ۱۴۰۳/۰۴/۳۱ تاریخ پذیرش ۱۴۰۳/۰۷/۳۰

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: آنژیوژنز فرایند زیستی جوانه زدن رگ‌های جدید از رگ‌های موجود در بافت است. عامل اصلی در هدایت مولکولی این فرایند، فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) هستند. با توجه به اهمیت علوم گیاه‌پزشکی و از طرفی نقش رگ زایی در فرایندهایی مانند ترمیم زخم، سیکل‌های قاعدگی، رشد جفت و تخمک‌گذاری، هدف این پژوهش بررسی اثر عصاره آبی کلاله زعفران (به‌عنوان یکی از گیاهان دارویی شاخص در طب سنتی) بر تغییرات بیان ژن‌های VEGF و FGF در مسیر آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوئیک (CAM) جنین جوجه بود.

روش بررسی: در این تحقیق تعداد ۴۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار نژاد Ross به‌طور تصادفی به ۴ گروه شامل گروه شاهد، شاهد آزمایشگاهی (pbs)، و ۲ گروه تجربی تقسیم شدند. در روز هشتم انکوباسیون (دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۵ تا ۶۰ درصد)، گروه شاهد آزمایشگاهی با نرمال سالین و گروه‌های تجربی با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی کلاله زعفران تیمار شدند. در روز دوازدهم از پرده کوریوآلانتوئیک عکس‌برداری و نمونه جهت استخراج RNA و ساخت cDNA گرفته شد. داده‌های جمع‌آوری‌شده توسط نرم‌افزارهای آماری SPSS 20 و Excel مورد تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: میانگین تعداد عروق $6/25 \pm 0/25$ و طول عروق $15/58 \pm 1/11$ در گروه تیمار شده کاهش معناداری ($P < 0/05$) را نسبت به گروه شاهد نشان داد. همچنین میزان بیان ژن‌های VEGF ($0/3235$) و FGF ($0/3875$) در گروه تیمار شده به‌طور معناداری ($P < 0/05$) کمتر از گروه شاهد بود.

بحث و نتیجه‌گیری: عصاره آبی کلاله زعفران می‌تواند موجب کاهش میزان بیان ژن‌های VEGF و FGF و روند رگ زایی پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه گردد.

کلیدواژه‌ها: عصاره آبی کلاله زعفران، پرده کوریو آلانتوئیک، آنژیوژنز، VEGF، FGF

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و پنجم، شماره ششم، ص ۴۹۱-۴۷۹، شهریور ۱۴۰۳

آدرس مکاتبه: مشهد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، تلفن: ۰۵۱۳۸۴۳۵۰۵۰

Email: j.khayatzadeh@mshdiau.ac.ir

مقدمه

اندوتلیال است و تشکیل رگ‌های فعال مستلزم برهم‌کنش‌های هماهنگ بین سلول‌های اندوتلیال، ماتریکس خارج سلولی و سلول‌های احاطه‌کننده آن‌ها است (۱). این سلول‌ها در بلوغ خاموش هستند ولی توانایی فعال شدن در پاسخ به عوامل مناسب را دارند. رگ زایی یک فرآیند ضروری در فیزیولوژی بدن با واسطه تعادل بین فاکتورهای القاکننده و مهارکننده رگ زایی است. در صورتی که این

اولین رگ‌های خونی در اثر پدیده واسکولوژنز از سلول‌های پیش‌ساز آندوتلیال با آرایش خاص به وجود می‌آیند و به تدریج شروع به انتشار، توسعه و تشکیل شاخه‌های جدید می‌کنند که به آن آنژیوژنز می‌گویند. آنژیوژنز یا رگ زایی فرآیند تکثیر فعال سلول‌های

^۱ کارشناس ارشد، گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

^۲ استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

^۴ دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

^۵ استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

^۶ استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تبادل از بین برود، زمینه برای بروز برخی بیماری‌ها ازجمله رشد و متاستاز تومور فراهم می‌شود (۲).

مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر بر آنژیوژنز شامل فاکتور سلول بنیادی (Stem Cell Factor, SCF)، فاکتور رشد اپیتلیال (Epithelial Growth Factor, EGF)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (Fibroblast Growth Factor, FGF)، فاکتور رشد مشتق از پلاکت‌ها (Platelet Derivative Growth Factor, PDGF) و همچنین فاکتور رشد عروقی اندوتلیالی (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) است (۳).

شواهد نشان می‌دهد که VEGF یک عامل چندگانه است که عملکردهای بیولوژیکی متعددی ازجمله نفوذپذیری عروقی، متابولیسم، سیستم ایمنی، التهاب و عملکردهای عصبی را تنظیم می‌نماید. این فاکتور، یک پروتئین همودایمر باند شونده به هیارین با وزن مولکولی ۴۵ کیلوالتون است که توانایی فعالیت آنژیوژنیک را در شرایط درون‌سلولی و برون‌سلولی دارد. تحریک VEGF موجب رشد، مهاجرت و بقای سلول‌های اندوتلیال و در نتیجه گسترش بیشتر شبکه عروقی می‌شود (۴). عوامل رشد فیبروبلاست یا FGF ها، در فرایند گسترش و تمایز طیف گسترده‌ای از سلول‌ها و بافت‌ها، آنژیوژنز و توسعه جنینی نقش دارند. این سیستم همچنین در حفظ بافت‌های طبیعی نقش دارد (۵).

در بسیاری از بیماری‌های پاتولوژیک نظیر تومورهای پیشرفته متاستاز، ورم مفاصل، تصلب شرائین و بسیاری از بیماری‌های دیگر آنژیوژنز به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. متاستاز نقش ویژه در گسترش سرطان‌هایی دارد که منجر به مرگ می‌گردند. در طی روند متاستاز سلول‌های سرطانی از طریق عروق خونی مهاجرت نموده و به سایر بافت‌ها وارد می‌شوند و در نهایت باعث درگیر شدن بافت‌های سالم بدن می‌گردند (۶).

از این‌رو مهار رگ زایی و متعاقب آن مهار متاستاز سلول‌ها روش مناسب و کارآمدی برای مقابله با سرطان است و شناخت عوامل درگیر در رگ زایی نرمال و یا غیرنرمال بسیار مهم و حیاتی به نظر می‌رسد (۷). با توجه به مصرف منابع گیاهی به‌طور گسترده در میان ملل مختلف نقش درمانی آن‌ها در بیماری‌ها اهمیت بسیاری پیدا کرده است. همچنین به دلیل عوارض جانبی کمتر گیاهان انجام مطالعات باهدف شناسایی ترکیبات ضدتوموری و ضد رگ‌زایی با منشأ گیاهی اهمیت شایانی پیدا کرده است. ترکیبات فنلی خواص آنتی‌اکسیدانی قوی دارند و غالباً در میوه‌ها و سبزی‌ها یافت می‌شوند (۸).

گیاهان حاوی ترکیبات مختلفی ازجمله فلاونوئیدها، تانن‌ها، استروئیدها، ساپونین‌ها، آلکالوئیدها، تربننوئیدها، کوئینون‌ها، گلیکوزیدهای قلبی و کومارین می‌باشند که این ترکیبات می‌توانند

پتانسیل بالقوه‌ای در درمان بیماری‌های مختلف ناشی از ضایعات پاتولوژیک آنژیوژنز را دارا باشند (۹). اخیراً توجه زیادی از محققان به کشف داروهای طبیعی و سنتزی به‌عنوان ترکیبات ضد آنژیوژنز معطوف شده است تا بتوانند آن‌ها را به‌عنوان درمان سرطان‌های مختلف و یا حداقل بخشی از پروتکل‌های درمانی تومورها مطرح کنند (۱۰).

زعفران گیاهی کوچک و چندساله از خانواده زنبق به ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر و دارای پیازی سخت و مدور و گوشت دار و پوشیده از غشاهای نازک قهوه‌ای است. قسمت مورد استفاده این گیاه، انتهای خامه و کلالة سه‌شاخه است که به نام زعفران مشهور است (۱۱). در کلالة‌های زعفران، حدود ۱۵۰ نوع ترکیب فعال و غیرفعال وجود دارد که مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آن شامل فلاونوئیدها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها (ریبوفلاوین و تیامین)، آمینواسیدها، صمغ‌ها و همچنین کاروتنوئیدهایی مثل سافرانال، کروستین و کروستین است (۱۲). با توجه به ترکیبات این گیاه، اثرات شناخته‌شده‌ای در پیشگیری و درمان بیماری‌های قلبی عروقی، حافظه و بیماری‌های چشمی، بیماری‌های گوارشی، بیماری‌های مرتبط با سیستم عصبی، اثرات ضددرد، ضدالتهاب و ضد تشنج، کاهش اضطراب و بی‌خوابی، اثرات ضد ایسکمی در عضلات، کلیه‌ها، قلب، مغز و غیره دارد (۱۳). یکی از مدل‌های آزمایشگاهی جهت بررسی آنژیوژنز استفاده از پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه است. از طرفی استفاده از تخم‌مرغ جنین‌دار یک روش ساده و مقرون‌به‌صرفه است و چون پرده کوریوآلانتوئیک یک سیستم بسته است، نیمه‌عمر ترکیبات مختلفی که استفاده می‌شوند نسبت به مدل‌های حیوانی بیشتر خواهد بود (۱۲). با توجه به اثرات ضد سرطانی کلالة زعفران و نظر به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثرات عصاره آبی آن بر روی آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه مشاهده نشده است، هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن‌های VEGF و FGF در روند آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه تحت اثر عصاره آبی کلالة زعفران بر روی تخم‌مرغ جنین‌دار به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی بود. این مطالعه در نیمه دوم سال ۱۴۰۲ در دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه یک پژوهش تجربی بود که در سال ۱۴۰۲ انجام شد. کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی آزاد مشهد با شناسه IR.IAU.MSHD.REC.1402.101 این مطالعه را تأیید کرد. برای انجام آزمایش‌ها از تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار نژاد Ross به‌عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده شد. نمونه‌های مورد مطالعه از شرکت مرغداری جهاد کشاورزی مشهد تهیه گردید. برای انجام

مطالعات تعداد ۴۰ عدد تخم مرغ نطفه دار مطابق سایر تحقیقات انجام شده به طور تصادفی به ۴ گروه آزمایشگاهی تقسیم شدند. گروه های مورد مطالعه شامل گروه شاهد (بدون تیمار)، شاهد آزمایشگاهی (تیمار با نرمال سالین)، گروه های تجربی ۱ و ۲ (تیمار با عصاره آبی کلاله زعفران با دوز ۵۰ و ۱۰۰ $\mu\text{l/ml}$) بود.

آماده سازی عصاره آبی کلاله زعفران:

کلاله خشک زعفران خوراکی معروف به زعفران پوشالی از قائنات تهیه شد. سپس برای آماده کردن عصاره آبی زعفران از روش خیساندن استفاده گردید. به این ترتیب که پس از ریختن کلاله خشک شده زعفران در داخل ظرف شیشه ای استوانه ای (بشر) به ازای هر ۱ گرم کلاله زعفران ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به ظروف اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بر روی دستگاه چرخاننده به آرامی مخلوط گردیده تا استخراج به خوبی صورت گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسط صافی از هم جدا شد تا عصاره اولیه به دست آید. عصاره اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلأ گردیده و در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد حلال آن ها به آرامی تبخیر گشت و عصاره تغلیظ شده به دست آمد. محلول حاصل به مدت دو هفته در دستگاه بن ماری با دمای ۵۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا حلال عصاره نیز به آرامی تبخیر شده و پودر عصاره به جا بماند. در نهایت عصاره خشک شده برای به دست آوردن غلظت های مورد نظر با حلال مخصوص (PBS) رقیق گردید (۱۵).

تزریق به تخم مرغ جنین دار:

تخم مرغ های تهیه شده پس از ضد عفونی کردن پوسته آن ها با الکل ۷۰ درصد، در دستگاه جوجه کشی (ایران درنا سیستم پارس) با دمای ۳۸ درجه سانتی گراد و رطوبت ۵۵ تا ۶۰ درصد قرار داده شد و دستگاه در وضعیت روشن و در حالت چرخش خودکار قرار گرفت. دستگاه جوجه کشی برای تبدیل خودکار تخم مرغ نطفه دار به جوجه یک روزه استفاده می شود، در واقع تخم مرغ نطفه دار در داخل دستگاه قرار گرفته و جوجه یک روزه از آن خارج می گردد. فرآیند تبدیل تخم به جوجه به صورت خودکار صورت می گیرد. روز دوم انکوباسیون در شرایط استریل و زیر هود لامینار به کمک پنس استریل در سمت پهن تخم مرغ سوراخ کوچکی ایجاد و سپس در سمت پهلویی آن پنجره ایجاد شد و محل نیز به وسیله لامل، چسب و پارافیلیم استریل پوشانده و تخم مرغ ها به دستگاه جوجه کشی برگردانده شد. روز هشتم انکوباسیون پنجره در زیر هود لامینار باز شد و روی پرده کوریوآلانتوئیک جوجه یک اسفنج ژلاتینی به ابعاد $4 \times 4 \times 1$ میلی متر قرار داده شد تا تیمارها در آن ناحیه صورت گیرد. در نمونه شاهد آزمایشگاهی تیمار با نرمال سالین انجام و در

نمونه های تحت تیمار با عصاره آبی کلاله زعفران به اسفنج ژلاتینی مقدار ۱۰ میکرو لیتر از عصاره های آبی کلاله زعفران با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ اضافه گردید، سپس پنجره ها مجدداً بسته شدند و تخم مرغ ها به دستگاه جوجه کشی برگردانده شد. در روز دوازدهم انکوباسیون تصاویر از عروق خونی سطح پرده کوریوآلانتوئیک تمام نمونه ها با استفاده از فوتواستروئومیکروسکوپ تحقیقاتی تهیه و با کمک نرم افزار imageJ تعداد و طول انشعابات عروقی در سطح مقطع یکسان برای تمام نمونه ها اندازه گیری شد. در پایان کار طول سری - دمی وضعیت مورفولوژیکی و وزن جنین های هر گروه نیز بررسی و ثبت گردید (۱۶).

استخراج RNA:

جهت استخراج RNA، پرده CAM جدا و به درون هاون چینی استریل انتقال داده شد و با استفاده از ازت مایع کوبیده و پودر شد. مراحل استخراج RNA طبق پروتکل کیت استخراج RNA (شرکت دنا زیست آسیا (S-۱۰۲۰۱) انجام شد. سپس RNA استخراج شده تغلیظ شد. نمونه های به دست آمده تا مراحل بعدی تحقیق در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای اطمینان از درستی استخراج RNA کیفیت و کمیت آن توسط ژل الکتروفورز و فن اسپکتروفتومتری نانودراپ بررسی گردید و در مرحله بعد از نمونه های استخراج شده cDNA سنتز گردید. کیت مخصوص سنتز cDNA از شرکت پارس توس تهیه و در پایان سنتز cDNA ها به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد بازگردانده شدند (۱۷).

بررسی بیان ژن های VEGF و FGF با استفاده از فن Real time PCR

برای بررسی بیان ژن VEGF و FGF پرایمرهای اختصاصی به کمک سایت NCBI طراحی و سپس جهت اطمینان از درستی آن BLAST گردید. همچنین توالی پرایمر ژن GAPDH به عنوان هاوس کیپینگ ژن تعیین و طراحی گردید. جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق را نشان می دهد. در نهایت برای دستیابی به پاسخ بیان ژن تحت تأثیر عصاره های مورد نظر، واکنش Real Time PCR انجام گردید. بر این اساس، ۱۰ میکرو لیتر Master Mix از شرکت Bioneer، ۷ میکرو لیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرو لیتر cDNA تهیه شده، ۱ میکرو لیتر پرایمر Forward و ۱ میکرو لیتر پرایمر Reverse باهم ترکیب شدند. برنامه زمان بندی PCR برای بیان ژن VEGF و FGF عبارت بود از: یک مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ سیکل شامل واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طولی سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به

مدت ۳۰ ثانیه و طول‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد آگاروز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید منتقل و الکتروفورز گردیدند به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. در پایان محصولات PCR بر روی ژل (۱۸).

توالی پرایمرهای اختصاصی ژن‌های VEGF، GAPDH و FGF

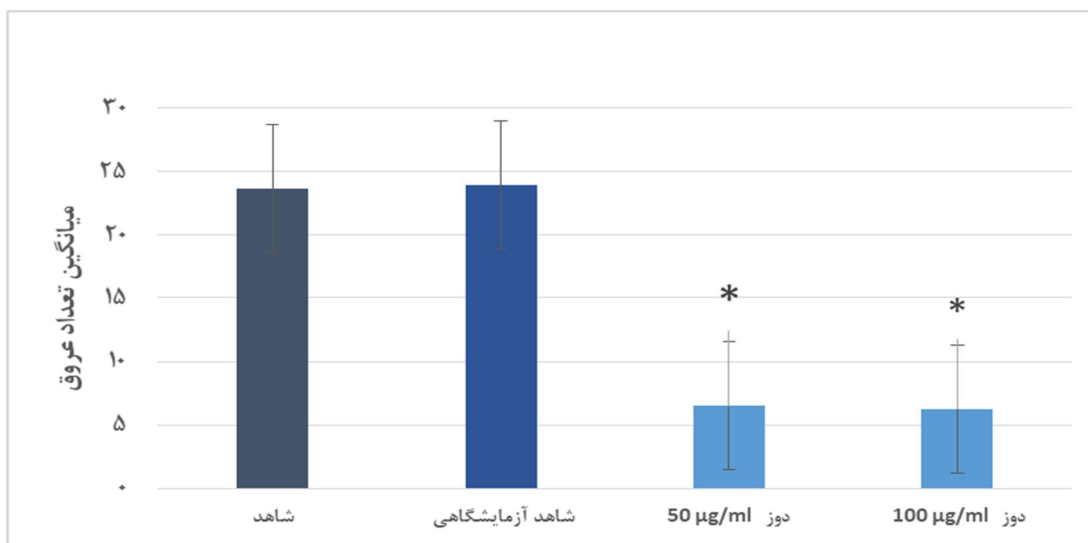
ردیف	نام ژن	توالی رفت (Forward)	توالی برگشت (Reverse)
1	VEGF	CCTGCCTTGC TGCTCTACC	CACACAGGATGG CTTGAAG
2	GAPDH	TGCTGGTGCTGAGTATGTCG	GCATGTCAGATCCACAACGG
3	FGF	AAACAGCGTCTTCAGTATCC	ATCCTCTCCACAAACTCACA

آنالیز آماری:

داده‌های جمع‌آوری‌شده توسط نرم‌افزارهای آماری Excel و SPSS 20 مورد تحلیل قرار گرفتند. روش‌های آماری مورد استفاده در این پژوهش عبارت بودند از آزمون تی استیودنت (T student)، آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون توکی (Tukey Test). همچنین از میانگین، خطای معیار و نمودارهای ستونی جهت توصیف اطلاعات استفاده شد. سطح معناداری آماری ۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

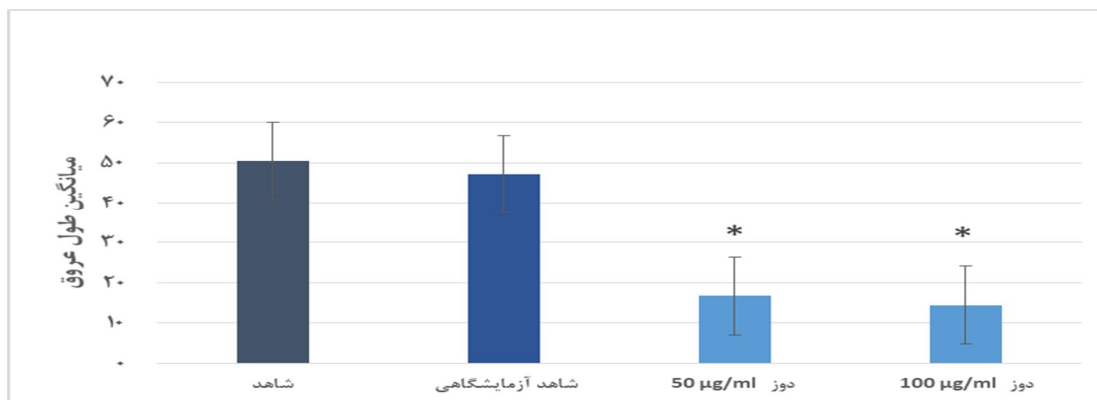
این تحقیق باهدف بررسی روند آنژیوژنز و میزان تغییرات بیان ژن VEGF و FGF تحت تیمار با عصاره آبی کلالة زعفران در مدل آزمایشگاهی پرده CAM در جنین جوجه صورت گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد با افزایش دوز عصاره آبی کلالة زعفران روند آنژیوژنز و میزان بیان ژن‌های دخیل در این فرایند کاهش پیدا می‌کند.



نمودار ۱: میانگین تعداد انشعابات عروقی در گروه‌های مختلف

استفاده از دارو و مکمل‌های غذایی بود. لذا در بررسی‌های بعدی تمام نمونه‌ها با گروه شاهد مقایسه گردید. مقایسه میانگین تعداد انشعابات عروقی بین گروه تجربی ۱ و ۲ (به ترتیب تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره آبی کلالة زعفران) با گروه شاهد نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح خطای ۰/۰۵ بود.

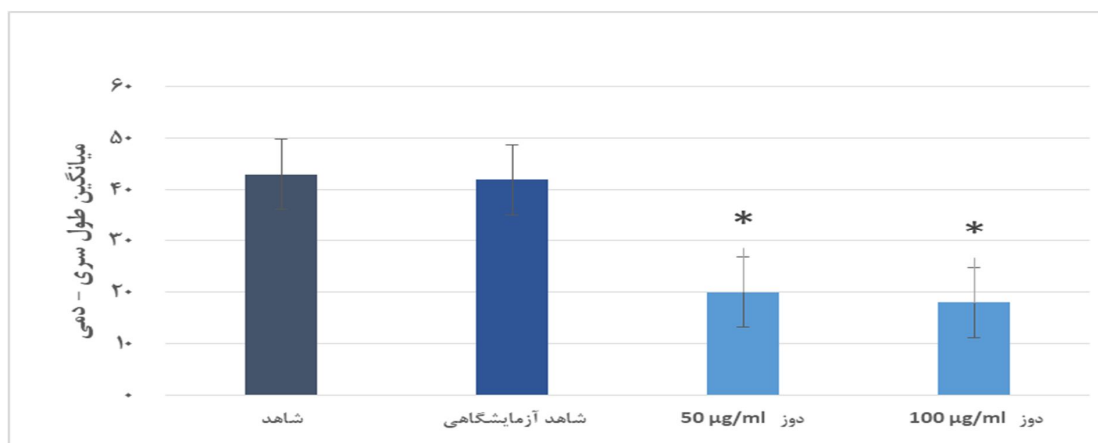
مقایسه میانگین تعداد انشعابات عروقی در گروه شاهد (۲۳/۲±۵/۴۵) با شاهد آزمایشگاهی (۲۴/۲ ± ۱/۱۳) نشان داد که اختلاف معناداری بین این دو گروه وجود ندارد (p>۰/۰۵). ازجمله علل عدم تفاوت می‌توان به یکسان بودن شرایط نگهداری و عدم



نمودار ۲: میانگین طول انشعابات عروقی در گروه‌های مختلف

گروه شاهد مقایسه شدند. همچنین، مقایسه میانگین طول انشعابات عروقی بین گروه‌های تجربی ۱ و ۲ (که به ترتیب با ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره آبی کلاله زعفران تیمار شده بودند) و گروه شاهد، تفاوت معناداری را در سطح خطای ۰/۰۵ نشان داد.

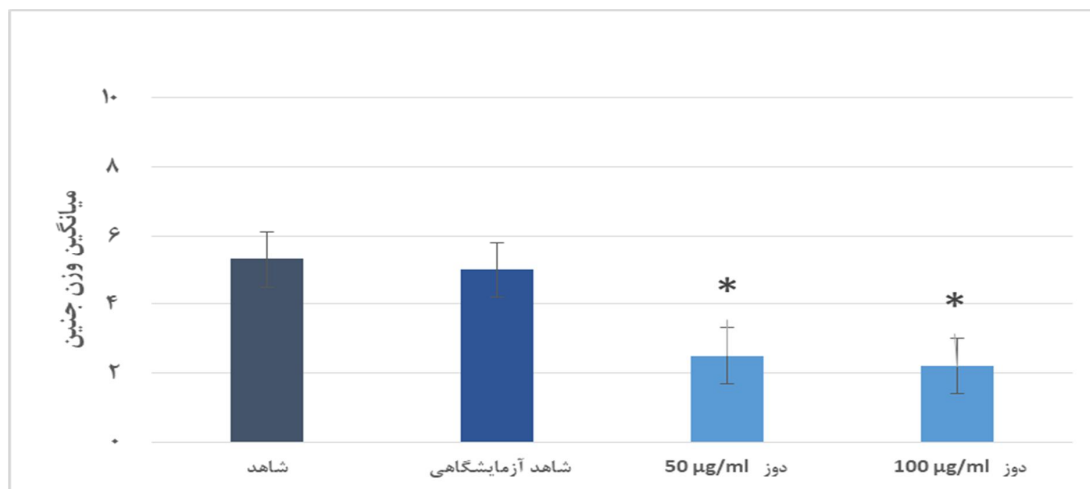
مقایسه میانگین طول انشعابات عروقی در گروه شاهد (با میانگین $50/1 \pm 2/35$) و گروه شاهد آزمایشگاهی (با میانگین $1/25 \pm 47/9$) نشان داد که بین این دو گروه اختلاف معناداری وجود ندارد ($p > 0/05$). بنابراین، در بررسی‌های بعدی، تمامی نمونه‌ها با



نمودار ۳: میانگین طول سری - دمی در گروه‌های مختلف

شاهد مقایسه شدند. همچنین، مقایسه میانگین طول سری - دمی بین گروه‌های تجربی ۱ و ۲ (که به ترتیب با ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره آبی کلاله زعفران تیمار شده بودند) و گروه شاهد، تفاوت معناداری را در سطح خطای ۰/۰۵ نشان داد.

مقایسه میانگین طول سری - دمی در گروه شاهد (با میانگین $1/45 \pm 43/2$) و گروه شاهد آزمایشگاهی (با میانگین $1/65 \pm 42/05$) نشان داد که بین این دو گروه اختلاف معناداری وجود ندارد ($p > 0/05$). بنابراین، در بررسی‌های بعدی، تمامی نمونه‌ها با گروه



نمودار ۴: میانگین وزن جنین‌ها در گروه‌های مختلف

تمام نمونه‌ها با گروه شاهد مقایسه گردید. مقایسه میانگین وزن جنین‌ها بین گروه تجربی ۱ و ۲ (به ترتیب تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره آبی کلالة زعفران) با گروه شاهد نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح خطای ۰/۰۵ بود.

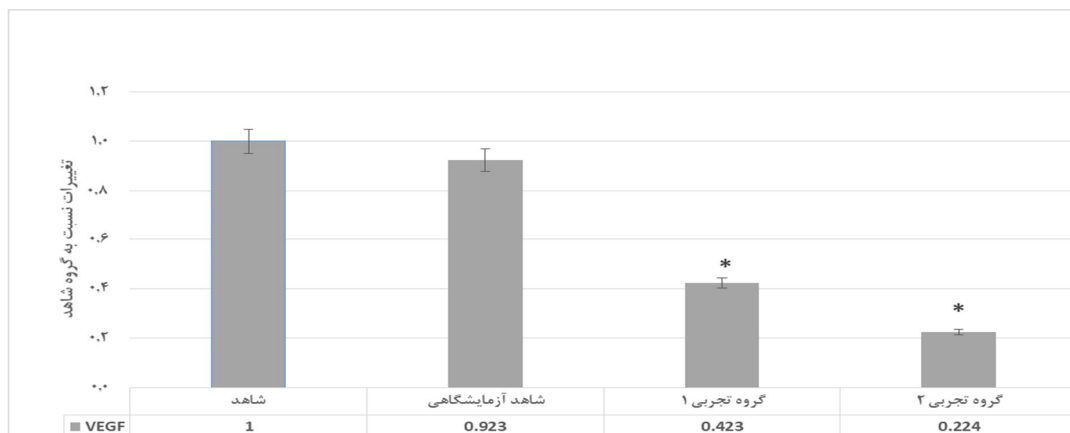
مقایسه میانگین وزن جنین‌ها در گروه شاهد (5.2 ± 0.55) با شاهد آزمایشگاهی (5.0 ± 0.2) نشان داد که اختلاف معناداری بین این دو گروه وجود ندارد ($p > 0.05$). لذا در بررسی‌های بعدی



نمودار ۵: تغییرات بیان ژن FGF در گروه‌های مختلف

شاهد مقایسه شدند. همچنین، مقایسه بیان ژن FGF بین گروه تجربی ۱ و ۲ (که به ترتیب با ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره آبی کلالة زعفران تیمار شده بودند) و گروه شاهد، تفاوت معناداری را در سطح خطای ۰/۰۵ نشان داد.

مقایسه بیان ژن FGF در گروه شاهد و گروه شاهد آزمایشگاهی نشان داد که بین این دو گروه تفاوت معناداری وجود ندارد ($p > 0.05$). بنابراین، در بررسی‌های بعدی، تمامی نمونه‌ها با گروه



نمودار ۶: تغییرات بیان ژن VEGF در گروه‌های مختلف

تمامی این ترکیبات قادر به مهار آنژیوژنز هستند به نظر می‌رسد ترکیباتی که از گیاهان و داروهای گیاهی تهیه می‌شوند از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر هستند از طرفی به مقدار زیاد در دسترس هستند. همچنین در صورت استفاده از آن‌ها به صورت خوراکی این ترکیبات به پروتئین‌ها مقاوم هستند (۲۸).

مرور تجربیات قبلی نشان می‌دهد که عصاره تام زعفران دارای فعالیت آنتی توموری علیه سلول‌های HepG است و نیز فعالیت ضد سرطانی عصاره تام زعفران علیه سرطان‌های القا شده توسط مواد شیمیایی به صورتی است که سه فرآیند مهم متابولیسم یعنی ساخت DNA و RNA و پروتئین را در سلول‌های سرطان انسانی متوقف و مهار می‌کند. این یافته‌ها نشان دهند که اثر بازدارندگی زعفران روی سنتز اسید نوکلئیک می‌تواند یک اساس بیوشیمیایی برای اثر بازدارندگی آن روی تکثیر داشته باشد (۲۹). Das و همکارانش مکانیسم‌های احتمالی متعددی برای اثرات ضد توموری زعفران و اجزای آن شامل اسید نوکلئیک، واکنش زنجیره‌ای آزاد، اثر کارتنوئیدها بر توپوایزومراز ۲ و القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول پیشنهاد کردند (۳۰). از سوی دیگر نتایج تحقیقات صورت گرفته بیانگر این نکته می‌باشند 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 طولانی‌تر می‌کند (۳۱). نتایج پژوهش حاضر با تحقیق فوق هم‌راستا است. طبق پژوهش حاضر عصاره آبی کلاله زعفران باعث کاهش روند آنژیوژنز و کاهش بیان ژن‌های VEGF و FGF در پرده کوربوالانتوتئیک جنین جوجه می‌شود. کلاله زعفران می‌تواند با کاهش روند رگ زایی دارای اثرات بالقوه در درمان سرطان باشد که البته نیازمند انجام مطالعات بالینی است.

مقایسه بیان ژن VEGF در گروه شاهد با شاهد آزمایشگاهی نشان داد که اختلاف معناداری بین این دو گروه وجود ندارد ($p > 0.05$). لذا در بررسی‌های بعدی تمام نمونه‌ها با گروه شاهد مقایسه گردید. مقایسه بیان ژن VEGF بین گروه تجربی ۱ و ۲ (به ترتیب تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره آبی کلاله زعفران) با گروه شاهد نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح خطای ۰/۰۵ بود.

بحث

در تحقیق حاضر اثر عصاره آبی کلاله زعفران بر روند آنژیوژنز و میزان تغییرات بیان ژن‌های VEGF و FGF با استفاده از پرده CAM جنین جوجه مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد عصاره آبی کلاله زعفران منجر به کاهش پارامترهای مورفولوژیکی از جمله تعداد عروق، طول عروق، طول سری-دمی و وزن جنین‌ها می‌شود. همچنین می‌تواند میزان بیان ژن‌های VEGF و FGF در پرده کوربوالانتوتئیک جنین جوجه را کاهش دهد. در سال‌های اخیر میزان سرطان در جهان روند صعودی داشته است و بنابراین تلاش در جهت جستجوی داروهای ضد سرطانی نیز افزایش پیدا کرده است. اخیراً توجه محققان به استفاده از ترکیبات ضد آنژیوژنز با منابع مختلف معطوف شده است (۱۹). از جمله پروتئین مهارکننده تریپسین کونیتز (۲۰)، فراکسیون‌های غضروف کوسه (۲۱)، ترکیبات گیاهی مانند پیاز با نام علمی Allium ascalonicum (۲۲)، مریم‌گلی salvia officinalis (۲۳)، انجیر FicusCarica (۲۴)، کانابینوئیدها (۲۵) و حتی قارچ‌ها (۲۶)، یا آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مانند Bevacizumab (۲۷). اگرچه

تحقیقات مختلفی گزارش کرده‌اند که کاروتنوئیدهای طبیعی استحصال شده از زعفران همچون کروستین و کروستین اثرات مهاری بر رشد و القای تمایز سلول‌ها در لوسمی دارد. این اجزا در مهار رشد و القای تمایز سلولی در لوسمی پرومیلوسیتیک مؤثرند (۳۲). لذا ممکن است ماده مؤثره کروستین 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 آنجاکه میزان رگ زایی با اکسیژن‌رسانی بافتی مرتبط است و هیپوکسی یکی از علل آغاز رگ زایی به شمار می‌رود این محتمل است که ازدیاد اکسیژن‌رسانی حاصل از تیمار با زعفران و ماده مؤثره آن یعنی سافرانال کاهنده آنژیوژنز باشد (۳۳). برخی تحقیقات گزارش کرده‌اند که زعفران به‌طور بالقوه اثرات آنتی ژنوتوکسیک و پیشگیری از سرطان دارد و می‌توان از آن به همراه داروهای شیمی‌درمانی استفاده کرد. از جمله اثرات زعفران بر تغییرات پراکسیداسیون لیپید و وضعیت آنتی‌اکسیدانی با مصرف سیس پلاتین، سیکلوفسفامید و مایتومایسین بررسی و مشخص شده است که تجویز زعفران پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش و هم‌زمان سطح آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی همچون سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و نیز آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی همچون گلووتاتیون احیاء شده کبدی را افزایش می‌دهد (۳۴). همچنین با انجام برخی تجربیات، مکانیسم عمل ترکیبات زعفران را در سطح سلولی و مولکولی بررسی و گزارش شده است که کاروتنوئیدها و مونوترپن‌های دهیدها به‌عنوان مهم‌ترین اجزای زعفران می‌باشند که با DNA میان‌کنش می‌دهند و اثرات این ترکیبات بر ساختار الیگنوکلئوتیدها متفاوت است که منجر به خواص متفاوت این ترکیبات می‌شود (۳۵). نتایج پژوهش حاضر با تحقیق فوق هم‌راستا است. طبق پژوهش حاضر عصاره آبی کلاله زعفران باعث کاهش روند آنژیوژنز و کاهش بیان ژن‌های VEGF و FGF در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه می‌شود. کلاله زعفران می‌تواند با کاهش روند رگ زایی دارای اثرات بالقوه در درمان سرطان باشد که البته نیازمند انجام مطالعات بالینی است.

زعفران باعث مهار آنژیوژنز می‌شود. آنژیوژنز در بیماری‌زایی بسیاری از بیماری‌ها از جمله رتینوپاتی دیابتی و دژنراسانس ناشی از سن ماکولا و بسیاری از بیماری‌های دیگر مانند سوختگی شیمیایی و تومورها مؤثر است و داکسی سایکلین با مهار آن می‌تواند در درمان کمک‌کننده باشد (۳۶). این خاصیت هم از طریق مهار فعالیت MMPs و هم از مسیر مستقل از MMPs انجام می‌گیرد. این مسیر مستقل ناشی از تعدیل در مسیر PI3k-Akt/eNOS است. NO مشتق از eNOS یک واسطه کلیدی در ازدیاد سلول‌های اندوتلیال و آنژیوژنز است و مهار این مسیر و مهار

MMPs، زعفران می‌تواند اندازه و میزان (Corneal Neovascularization) CNV را کاهش دهد (۳۷). نتایج پژوهش حاضر با تحقیقات فوق هم‌راستا است. زعفران به علت خواص فارماکولوژیک بسیار ارزشمند و مکانیسم‌هایی همچون کاهش فعالیت کلاژناز، فسفولیپاز A₂ و چندین ماتریکس متالوپروتئیناز باعث کاهش روند آنژیوژنز و کاهش بیان ژن‌های VEGF و FGF در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه گردید.

مکانیسم‌های پیشنهادی متنوعی برای اثرات ضد توموری زعفران و اجزای آن شامل مهار رونویسی اسید نوکلئیک، اثر کاروتنوئیدها بر توپوایزومراز ۲ و القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول بیان کرده‌اند. تحقیقات نشان داده‌اند که زعفران و زیر واحدهای اصلی آن به‌ویژه کروستین سرعت رشد تومورها را در رت کاهش می‌دهد. کاروتنوئیدهای موجود در زعفران به‌ویژه کروستین و کروستین و دیمیتیل کروستین مستقیم می‌توانند به شیار کوچک در DNA باند شده و تغییر شکل فضایی را در آن‌ها القا نمایند. از این رو این احتمال وجود آرد که در این تحقیق کروستین و کروستین موجود در عصاره آبی زعفران با تغییر شکل فضایی DNA در سلول‌های اندوتلیالی در فرایند سیگنال‌رسانی مسیر رگ زایی اختلال ایجاد کرده و روند طبیعی آنژیوژنز را دچار مشکل نمایند و از این روش برای مهار رگ زایی در سلول‌های تومور و در نتیجه مهار تومور و متاستاز می‌توان استفاده کرد (۳۸).

بر روی سافرانال که یکی از اجزای اصلی زعفران است نیز تحقیقاتی صورت گرفته است. صادق نیا و همکاران وی نشان دادند که سافرانال اکسیژن‌رسانی بافتی را افزایش می‌دهد و همچنین دارای اثرات جمع‌کنندگی رادیکال‌های آزاد است و می‌تواند استرس اکسیداتیو ناشی از ترکیبات ژنوتوکسیک را مهار نماید. سافرانال دارای اثرات محافظتی بر روی پراکسیداسیون لیپیدها است. از آنجاکه میزان رگ زایی با اکسیژن‌رسانی بافتی مرتبط است و هیپوکسی یکی از علل آغاز رگ زایی به شمار می‌رود این احتمال وجود دارد ازدیاد اکسیژن‌رسانی حاصل از تیمار با زعفران و ماده مؤثره آن یعنی سافرانال کاهنده آنژیوژنز باشد (۳۹). از طرف دیگر با توجه به اینکه زعفران دارای لکتین است و حداقل بخشی از خواص آنتی توموری آن می‌تواند وابسته به لکتین باشد بنابراین یکی دیگر از پیشنهادها می‌تواند القای آپوپتوز باشد (۴۰).

این مطالعه از محدودیت‌هایی برخوردار بود که برطرف نمودن آن‌ها در مطالعات آینده می‌تواند نتایج دقیق‌تری را فراهم سازد از مهم‌ترین محدودیت‌ها عدم بررسی دوزهای مختلف، امکان وجود اثرات جانبی و عدم انجام آزمایش‌های مولکولی بیشتر اشاره کرد. امیداست در آینده در این زمینه تحقیق‌های مولکولی و فارماکولوژی

تشکر و قدردانی:

این مطالعه حاصل طرح پژوهشی با شماره ۶۲۳۸۲/د ۶۳۳۸۲/د مصوب باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان است. در راستای پیش برد این طرح لازم است از ریاست محترم باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان خانم دکتر فرحناز مولوی تشکر و قدردانی گردد.

حمایت مالی:

ندارد.

تضاد منافع:

هیچ گونه تضاد منافی بین نویسندگان وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی:

این مطالعه با کد اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1402.101 در کمیته اخلاق پژوهی دانشگاه علوم پزشکی آزاد مشهد به تصویب رسیده است و اصول اخلاقی تماماً در این مقاله رعایت شده است.

بیشتری انجام شود. همچنین پیشنهاد می شود تأثیر عصاره آبی کلاله زعفران در بیماری های متعدد از جمله بررسی آنژیوژن در حلقه آئورت موش و بررسی اثرات آن در تأیید یافته های این پژوهش مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه گیری

مطابق با نتایج این پژوهش، عصاره آبی کلاله زعفران دارای اثرات ضد رگ زایی است و می تواند با کاهش بیان ژن های مرتبط با آنژیوژن مانند VEGF و FGF، بر روند رگ زایی تأثیر بگذارد. با این حال، نتایج تنها در مدل جنینی جوجه (CAM) به دست آمده اند و برای تعمیم به درمان بیماری های انسانی، نیازمند انجام مطالعات پیش بالینی و بالینی بیشتری بر روی مدل های حیوانی و انسانی است. پیشنهاد می شود در مطالعات آینده، اثرات ترکیبات فعال زعفران مانند کروسین و سافرانال به صورت جداگانه بررسی و مکانیزم های دقیق اثرات آن ها در مسیرهای مختلف مولکولی آنژیوژن ارزیابی گردد.

References:

1. Ramezani T, Baharara J. A review on Angiogenesis in tumor. J Cell Tissue 2014; 5(1): 89-100. (Persian)
2. Pourmohammad M, Khayatzaheh J, Azarizadeh M, Pouresmaeil V, Zafar Balanjad S. The Effect of the Hydroalcoholic Extract of Ferula Assa- Foetida Resin Root and Shoot on the VEGF and FGF Gene Expression in the Chorioallantoic Membrane of Chick Embryos. Pejouhesh dar Pezeshki 2024;48(1):50-62. (Persian)
3. Vimalraj S, Renugaa S, Dhanasekaran A. Chick embryo chorioallantoic membrane: a biomaterial testing platform for tissue engineering applications. Process Biochem 2023 Jan 1; 124:81-91. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.11.007>
4. yadamani S, neamati A, homayouni tabrizi M, yadamani S. Evaluation of effect Schiff base complex Cu²⁺ N,N'-dipyridoxyl(1,2 diaminobenzene) on angiogenesis process on chorioallantoic membrane and genes expression of VEGF and VEGF-R. Stud Med Sci 2018; 29 (9):642-650.
5. Gulcu A, Akkaya O. Investigation of the antiangiogenic properties of zoledronic acid by using chorioallantoic membrane model. Dose-Response 2022 Apr 7;20(2):15593258221093410. <https://doi.org/10.1177/15593258221093410>
6. CHU, Pei-Yu, et al. Applications of the chick chorioallantoic membrane as an alternative model for cancer studies. Cells Tissues Organs 2022, 211.2: 222-237. <https://doi.org/10.1159/000513039>
7. shali R, neamati A, Ardalan P. Quantitative assessment and morphometric investigation of anti-angiogenic properties of silver nanoparticles synthesized using Persicaria bistorta extracts on chick chorioallantoic membrane. Stud Med Sci 2018; 29 (3):208-216.
8. Boeing H, Bechthold A, Bub A, Ellinger S, Haller D, Kroke A, et al. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. Eur J Nutr 2012; 51(6): 637-63. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0380-y>
9. Prabhakar P, Mukherjee S, Kumar A, Kumar S, Verma DK, Dhara S, et al. Optimization of

- microwave-assisted extraction (MAE) of key phenolic compounds from pigeon pea (*Cajanus cajan* L.), their characterization, and measurement of their anti-diabetic and cytotoxic potential. *J Food Meas Charact* 2023 Jul 31;1-24. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02082-5>
10. Majnooni MB, Fakhri S, Ghanadian SM, Bahrami G, Mansouri K, Iranpanah A, et al. Inhibiting angiogenesis by anti-cancer saponins: from phytochemistry to cellular signaling pathways. *Metabolites* 2023 Feb 22;13(3):323.. <https://doi.org/10.3390/metabo13030323>
11. Ramezani T, Baharara J, Saghiri N. The Effect of Saffron Aqueous Extract (*Crocus sativus* L) on Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Birjand Univ Med Sci* 2014; 21(2):169-178.
12. Rezaee R, Hosseinzadeh H. Safranal: from an aromatic natural product to a rewarding pharmacological agent. *Iran J Basic Med Sci* 2013;16(1):12-26.
13. Pourmohammad M, Alammar H, Khakzad M, and Khayatzaadeh J. Relationship of Asthma Severity with Haemophilus Influenzae Type A Infection in Patients with Asthma Compared to Healthy People. *RES MOL MED* 2023 May 10;11(2):0
14. Ejaz S, Anwar K, Taj R, Ashraf M. A novel link between angiogenesis and natural products: Anti - angiogenic effects of *Opuntia dillenii*. *Open Life Sci* 2014;9(3):298-308. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0266-x>
15. Shirali, S., Bathayi, S., Nakhjavani, M., Ashoori, M. Effects of saffron (*Crocus Sativus* L.) aqueous extract on serum biochemical factors in streptozotocin-induced diabetic rats. *IJMAPR* 2012; 28(2): 293-308. doi: 10.22092/ijmapr.2012.3045
16. Hajebi S, Homayouni Tabrizi M, Nakhaei Moghaddam M. The antiangiogenic and cytotoxic properties of green synthesized Silver nanoparticles using liquid extract of Rapeseed Flower Pollen. *Stud Med Sci* 2019; 30 (4):268-280.
17. Hormozi M, Talebi S, Khorshid HRK, Zarnani A-H, Kamali K, Jeddi-Tehrani M, et al. The effect of Setarud (IMODTM) on angiogenesis in transplanted human ovarian tissue to nude mice. *Iran J Reprod Med* 2015;13(10):605.
18. Abdullah NK, Shindala MK, Mustafa NG. VEGF Gene Expression and Angiogenesis in the Chorioallantoic Membrane: the Role of Cloprostenol. *Egypt J Vet Sci* 2023;54(3):359-68. <https://doi.org/10.21608/ejvs.2023.183294.1420>
19. Norooznezhad AH, Norooznezhad F, Ahmadi K. Next target of tranilast: inhibition of corneal neovascularization. *Med Hypotheses* 2014;82(6):700-2. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2014.03.007>
20. Shakiba Y, Mansouri K, Mostafaie A. Antiangiogenic effect of soybean kunitz trypsin inhibitor on human umbilical vein endothelial cells. *Fitoterapia* 2007;78(7-8):587-9. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.03.027>
21. Hassan ZM, Feyzi R, Sheikhan A, Bargahi A, Mostafaie A, Mansouri K, et al. Low molecular weight fraction of shark cartilage can modulate immune responses and abolish angiogenesis. *Int Immunopharmacol* 2005;5(6):961-70. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.01.006>
22. Motlagh HRM, Mansouri K, Shakiba Y, Keshavarz M, Khodarahmi R, Siami A, et al. Antiangiogenic effect of aqueous extract of shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs in rat aorta ring model. *Yakhteh Med J* 2009;11(2):190-5.
23. Daneshvari A, Khayatzaadeh J, Pourmohammad M, Tehranipour M, Mahdavi Shahri N. Comparison of the Index Finger and Ring Anthropometric Surveys in the Genetically Deafness Female Population Compared With Healthy Girls With Research Ethnic Background. *Iran J Forensic Med* 2023 Sep 10;29(2):120-7.

24. Mostafaei A, Mansouri K, Norouznezhad A, Mohammadi MH. Anti-angiogenic activity of Ficus carica latex extract on human umbilical vein endothelial cells. *Cell J* 2011;12(4):525-528.
25. Keshavarz M, Norouznezhad A, Mansouri K, Mostafaei A. Cannabinoid (JWH-133) therapy could be effective for treatment of corneal neovascularization. *Iran J Med Hypotheses Idea* 2010;4(3).
26. Pourmohammad M, Jomeh H, khakzad M, Khayatzaadeh J, Mokhtari Amirmajidi E. Human papillomavirus and Helicobacter pylori co-infection in gastric cancer patients. *Feyz Med Sci J* 2023; 27 (6):679-687
27. Nguyen A, Hoang V, Laquer V, Kelly KM. Angiogenesis in cutaneous disease: part I. *J Am Acad Dermatol* 2009;61(6):921-42.
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.05.052>
28. Ghandehari S, HomayouniTabrizi M, Ardalan P. Evaluation of Anti-angiogenic Activity of Silver Nanoparticle Synthesis by Rubina tinctorum L (RuAgNPs) Using Chicken Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay. *J Arak Uni Med Sci* 2018; 21(1):82- 90.
29. 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.
30. 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.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.02.003>
31. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227(1): 20-5.
<https://doi.org/10.1177/153537020222700104>
32. 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.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.05.017>
33. Chermahini SH, Majid FA, Sarmidi MR, Taghizadeh E, Salehnezhad S. Impact of saffron as an anti-cancer and anti-tumor herb. *Afr J Pharm Pharmacol* 2010 Nov 1;4(11):834-40.
34. 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. <https://doi.org/10.1002/ptr.1209>
35. Kaefer CM, Milner JA. The role of herbs and spices in cancer prevention. *J Nutr Biochem* 2008; 19(6): 347-61.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.11.003>
36. Zhao C, Kam HT, Chen Y, Gong G, Hoi MP, Skalicka-Woźniak K, et al. Crocetin and its glycoside crocin, two bioactive constituents from *Crocus sativus* L. (saffron), differentially inhibit angiogenesis by inhibiting endothelial cytoskeleton organization and cell migration through VEGFR2/SRC/FAK and VEGFR2/MEK/ERK signaling pathways. *Front Pharmacol* 2021 Apr 30;12:675359.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.675359>
37. Abdalla A, Murali C, Amin A. Safranin inhibits angiogenesis via targeting HIF-1 α /VEGF machinery: in vitro and ex vivo insights. *Front Oncol* 2022 Feb 2;11:789172.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.789172>
38. Soleymani SM, Assaradegan F, Habibi SA, Mahboubi A, Esmaily H. The effect of crocin on movement disorders and oxidative DNA damage in Parkinson's disease: Insights from a randomized controlled trial. *Parkinsonism Relat Disord* 2024 Sep 1;126:107051.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2024.107051>
39. Alavi MS, Fanoudi S, Fard AV, Soukhtanloo M, Hosseini M, Barzegar H, et al. Safranin attenuates excitotoxin-induced oxidative OLN-93 cells

- injury. Drug research 2019 Jun;69(06):323-9.
<https://doi.org/10.1055/a-0790-8200>
40. Zarrineh M, Ashrafian S, Jensen P, Nawrocki A, Ansari AM, Rezadoost H, et al. Comprehensive proteomics and sialomics of the anti-proliferative activity of safranal on triple negative MDA-MB-231 breast cancer cell lines. J Proteomics 2022 May 15;259:104539.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104539>

THE EFFECT OF AQUEOUS EXTRACT OF CROCUS SATIVUS ON THE VEGF AND FGF GENE EXPRESSION IN THE PROCESS OF ANGIOGENESIS OF THE CHORIOALLANTOIC MEMBRANE OF CHICK EMBRYOS

Mohammadreza Pourmohammad¹, Jina Khayat-zadeh^{2*}, Haniyeh Sattari Fard³, Maryam Tehranipour⁴, Hasan Rakhshandeh⁵, Saeedeh Zafar Balanjad⁶

Received: 21 July, 2024; Accepted: 21 October, 2024

Abstract

Background & Aim: Angiogenesis is the biological process of sprouting new vessels from existing vessels in the tissue. The main factors in the molecular guidance of this process are vascular endothelial growth factors (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF). Considering the importance of plant medicine sciences and also, the role of angiogenesis in processes such as wound healing, menstrual cycles, placental growth, and ovulation, the aim of this study was to investigate the effect of aqueous extract of *Crocus sativus* (as one of the prominent medicinal plants in traditional medicine) on changes in the gene expression of VEGF and FGF in the angiogenesis pathway of the chorioallantoic membrane (CAM) of chick embryos.

Materials & Methods: In this research, 40 Ross fertilized eggs were randomly divided into 4 groups including the control group, laboratory control (PBS), and 2 experimental groups. On the eighth day of incubation (temperature 38 degrees Celsius and humidity 55 to 60 percent), the laboratory control group was treated with normal saline, and the experimental groups were treated with doses of 50 and 100 µg/ml of the aqueous extract of *Crocus sativus*. On the twelfth day, a photo was taken of the chorioallantoic membrane, and a sample was taken for RNA extraction and cDNA production. The collected data were analyzed using Excel and SPSS 20 statistical software.

Results: The average number of vessels (6.25 ± 0.25) and vessel length (15.58 ± 1.11) in the treated group showed a significant decrease ($P < 0.05$) compared to the control group. Also, the expression level of VEGF (0.3235) and FGF (0.3875) genes in the treated group was significantly ($P < 0.05$) lower than the control group.

Conclusion: Aqueous extract of *Crocus sativus* can reduce the expression of VEGF and FGF genes and the angiogenic process of the chorioallantoic membrane of chicken embryos.

Keywords: aqueous extract of *Crocus sativus*, chorioallantoic membrane, angiogenesis, VEGF, FGF

Address: Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Tel: +985138435050

Email: j.khayatzadeh@mshdiau.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2024; 35(6): 491 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](#) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ MS, Department of Medical Parasitology, Faculty of Paramedicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

² Assistant professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran (Corresponding Author)

³ Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

⁴ Associate professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁶ Assistant professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran