

## مهار رگ زایی با زهر زنبور عسل در مدل حلقه آئورت موش صحرایی

جواد بهارآرا<sup>۱</sup>، نسرین حسینی<sup>۲</sup>، طیبه رضانی<sup>۳</sup>

دریافت مقاله: ۹۲/۱۱/۱ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۲/۱۲/۱۳ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۳/۳/۲۰ پذیرش مقاله: ۹۳/۴/۱

### چکیده

زمینه و هدف: رگ‌زایی (تشکیل رگ‌های خونی جدید از رگ‌های قبلی)، یک فرآیند ضروری در تکوین محسوب می‌شود. زهر زنبور عسل سال‌هاست که در درمان بیماری‌های مختلف کاربرد دارد. در پژوهش حاضر اثر زهر زنبور عسل بر رگ‌زایی در مدل حلقه آئورت موش صحرایی نژاد ویستار بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی آئورت موش صحرایی به قطعات یک میلی‌متری برش و در ماتریکس کلاژن کشت داده شد. پس از ظاهر شدن نخستین جوانه‌ها نمونه‌ها به گروه‌های شاهد و تجربی (تیمار با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تقسیم‌بندی شدند. رگ‌زایی با میکروسکوپ معکوس بررسی و عکس‌برداری شد. تعداد و طول انشعابات رگی توسط نرم‌افزار Image J تعیین و داده‌های کمی توسط نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون‌های آماری ANOVA و TUKEY در سطح  $(p < 0/05)$  تحلیل گردید.

یافته‌ها: میانگین طول و تعداد عروق خونی در گروه‌های تجربی تیمار با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد تغییرات معنی‌دار نشان نداد ( $p > 0/05$ ) همچنین در گروه‌های تجربی تیمار با غلظت‌های ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کاهش معنی‌دار مشاهده شد ( $p < 0/05$ ).

نتیجه‌گیری: غلظت‌های مناسب زهر زنبور عسل اثر مهار روی رگ‌زایی دارد، لذا می‌تواند در مطالعات مربوط به سرطان و حالات پاتولوژیک وابسته به رگ‌زایی مورد توجه خاص قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: رگ‌زایی، زهر، آئورت، سرطان، زنبور عسل

### مقدمه

شرایط فیزیولوژیک برای رشد و نمو طبیعی جنین، سیکل

تولید مثلی و ترمیم زخم و ترمیم بافت اهمیت دارد [۱]  
علاوه بر این، در پیشرفت پدیده‌های پاتولوژیک و بروز

رگ‌زایی (Angiogenesis) به فرآیند تشکیل عروق  
خونی جدید از عروق موجود گفته می‌شود، این فرآیند در

۱- (نویسنده مسئول) دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری و گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران  
تلفن: ۰۵۱۱-۸۴۳۷۰۹۲، دورنگار: ۰۵۱۱-۸۴۳۷۰۹۲، پست الکترونیکی: baharara@yahoo.com

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی تکوینی، گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

۳- دانشجوی دکتری تخصصی تکوین جانوری، دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

کرد [۷-۸]. همچنین حلقه آئورت پلی بین مطالعات آزمایشگاهی و طبیعی است. در این سیستم، کشت حلقه آئورت در ژل کلاژن به یک شبکه مویرگی تبدیل می‌شود [۹]، که موجب ارائه یک تصویر کامل تر از فرایندهای رگ‌زایی در مقایسه با سنجش‌های قدیمی‌تر مبتنی بر سلول است [۱۰].

کشت اکسپلانت عروقی (روش مورد استفاده برای جداسازی سلول‌ها از یک قطعه بافت موجود زنده و کشت آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی) مانند حلقه آئورت در ماتریکس ژله‌ای شده و سپس مشاهده سلول‌های آندوتلیال به عنوان یک مدل سه بعدی محسوب می‌شود، این مدل اولین بار توسط Nicizia ارائه گردید و هنوز به طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۱-۱۲]. از ماتریکس کلاژنی به عنوان یکی از انواع مدل‌های کشت، استفاده فراوانی شده است، بعنوان نمونه Besse و همکاران از داربست کلاژنی به عنوان یک مدل مناسب روند رگ‌زایی در موش‌های پیر و جوان استفاده نموده است [۱۳].

زهر زنبور عسل، ترکیبی است که از زمان باستان برای تسکین درد و درمان بیماری‌های التهابی مزمن (مانند آرتریت‌ها) مورد استفاده قرار می‌گرفته است و تحقیقات متعددی که اخیراً صورت گرفته‌اند حاکی از اثرات بالقوه زهر زنبور عسل در درمان سرطان می‌باشد [۱۴]. زهر زنبور عسل ترکیب بسیار پیچیده‌ای از پپتیدها، آنزیم‌ها و آمین‌های فعال زیستی می‌باشد. ملیتین و فسفولیپاز A<sub>2</sub> دو ترکیب عمده زهر زنبور عسل دارای اثرات ضد توموری قوی می‌باشند [۱۵]. همچنین، اثرات ضد التهابی و ضد توموری زهر زنبور عسل در موش صحرایی بررسی شده

بیماری‌های مختلف همچون آسیب شبکه چشم در بیماران دیابتی، آرتریت روماتوئید و پسوریازیس دخالت دارد و به خصوص رشد تومور و متاستاز آن وابستگی زیادی به فرایند رگ‌زایی دارد [۲]. بافت توموری می‌تواند مواد تغذیه‌ای و اکسیژن کافی را از طریق انتشار ساده به فاصله ۱-۲ mm جذب نمایند و از این نقطه به بعد نیازمند ایجاد رگ‌های تغذیه کننده جدید می‌باشند [۳].

از سوی دیگر بنظر می‌رسد درمان‌هایی که مستقیماً سلول‌های آندوتلیالی پایدار را هدف‌گیری می‌کنند، خطر کمتری را از نظر ایجاد مقاومت به داروها در پی دارند و از این لحاظ مشکل مقاوم شدن تومور نسبت به درمان‌ها بر طرف می‌گردد، از این رو سنجش‌های رگ‌زایی برای شناسایی عوامل بالقوه رگ‌زا و مهار کننده‌های فارکولوژیک رگ‌زایی ضروری هستند [۴]. روش درمانی مهار رگ‌زایی، منجر به طراحی و تکوین ترکیباتی شد که رشد تومور را بوسیله مهار کردن توانایی تشکیل رگ‌های تغذیه‌کننده و یا هدف‌گیری رگ‌های موجود مهار می‌کند، در نتیجه در دو دهه گذشته تحقیقات گسترده‌ای در زمینه تنظیم رگ‌زایی انجام گرفته است، بسیاری از این مطالعات در جهت تشخیص و شناسایی فاکتورهای رگ‌زا و عوامل مهار کننده آن صورت گرفته است [۵]. برای بررسی رگ‌زایی در شرایط آزمایشگاهی چندین مدل نظیر پرده کوریوآلانتوئیک جوجه، مدل تشکیل عروق جدید در قرنیه چشم، ماتریژل، مدل آمیون انسانی و حلقه آئورت مورد توجه می‌باشد [۶]. از میان این مدل‌ها، مدل حلقه آئورت، به طور گسترده برای بررسی رگ‌زایی و سازوکارهای آن مورد استفاده قرار می‌گیرد، از ویژگی‌های مهم این مدل می‌توان به تکرار پذیری آسان، اثر بخشی، هزینه کم اشاره

از تشکیل داربست، حلقه‌های آنورت را درون داربست قرارداده و در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ دقیقه قرار دادیم و پس از تبدیل محلول کلاژن به ژل، پلیت را از انکوباتور خارج و زیر هود، محیط کشت DMEM حاوی ۳۰ درصد سرم گوساله FBS (Gibco, USA) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (Gibco, USA) و ۱٪ استرپتومایسین (Gibco, USA) به آن اضافه نمودیم [۲۰].

**جداسازی حلقه آنورت موش صحرایی:** برای انجام تحقیقات، موش‌های نر صحرایی نژاد ویستار با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته و محدود وزن ۱۲۰ تا ۱۵۰ گرم از پژوهشکده بوعلی‌سینا دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه و در اتاق حیوانات در شرایط استاندارد نگهداری شدند. برای انجام آزمایش ابتدا موش‌ها با استفاده از کلروفورم بیهوش شدند و محل حفره شکمی با استفاده از الکل ۷۰٪ استریل شد. حفره شکمی توسط وسایل جراحی شکافته و پس از پیدا کردن آنورت قطعه‌ای با طول مناسب جدا گردید و بلافاصله به بافر استریل که حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین بود منتقل گردید. در شرایط استریل و زیر هود کشت سلولی، ساختارهای اطراف حذف گردید و سپس با استفاده از تیغ جراحی، به اندازه ۱ تا ۲ میلی‌متری قطعه قطعه شد [۲۱]. محققان این پروژه در کلیه مراحل متعهد به رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات مطابق آئین‌نامه‌های مربوطه بوده‌اند.

**گروه‌بندی نمونه‌ها:** نمونه‌ها به گروه‌های شاهد (بدون تیمار)، تجربی ۱ (تیمار با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، گروه تجربی ۲ (تیمار با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، گروه تجربی ۳ (تیمار با غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، گروه تجربی ۴ (تیمار با غلظت

است [۱۷-۱۶]. ولی تاکنون مطالعات اندکی در زمینه اثرات ضد رگ‌زایی زهر زنبور عسل صورت پذیرفته است. لذا با توجه به اثرات ضد توموری و ضد تکثیر زهر زنبور عسل و اهمیت مطالعات مربوط به رگ‌زایی در مطالعه حاضر اثرات ضد رگ‌زایی زهر زنبور عسل در مدل حلقه آنورت موش صحرایی نژاد ویستار بررسی شده است.

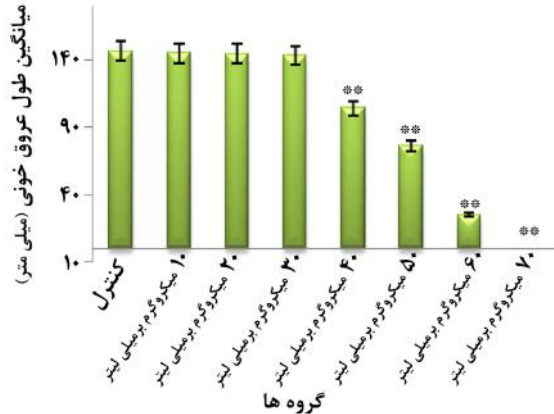
## مواد و روش‌ها

**تهیه محلول اولیه زهر:** در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی زهر زنبور عسل از گروه حشره‌شناسی دانشگاه علوم تحقیقات تهران تهیه گردید، این زهر به روش شوک الکتریکی تهیه شده بود [۱۸]. جهت تهیه محلول اولیه با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، ۱ میلی‌گرم از پودر زهر زنبور عسل را در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت در شرایط استریل حل شد، محلول تهیه شده در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری و در مراحل بعدی جهت رقیق‌سازی و تهیه غلظت‌های مورد نظر از محیط کشت کامل استفاده گردید.

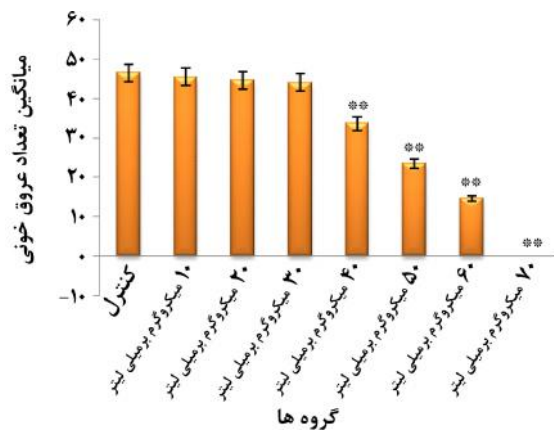
**استخراج کلاژن و تهیه داربست کلاژنی:** کلاژن با غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از دم موش صحرایی نژاد ویستار استخراج گردید (برای تعیین غلظت از روش بردفورد استفاده شد)، مطابق این روش رشته‌های تاندونی دم جدا شد و ۳ بار شستشو با PBS انجام گردید و سپس در الکل ۷۰٪ به مدت ۱ ساعت قرار داده شد و در مرحله آخر به مدت ۶۰ دقیقه با دور  $16000\text{ rpm}$  سانتریفیوژ و کلاژن مورد نیاز آماده شد [۱۹].

برای تهیه داربست، کلاژن استخراجی از دم موش صحرایی، بیکربنات سدیم، محیط کشت DMEM (Sigma, France) را به نسبت ۱،۱،۱ مخلوط کردیم، پس

بازه زمانی ۲۴ ساعت مشاهده گردید ( $p < 0.001$ ) (نمودار ۱).



نمودار ۱- میانگین طول انشعابات عروقی در نمونه‌های تحت تیمار با زهر زنبور عسل با غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل در قیاس با شاهد \*\* ( $p < 0.001$ )



نمودار ۲- میانگین تعداد انشعابات عروق خونی در نمونه‌های تحت تیمار با زهر زنبور عسل و نمونه با غلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل در مقایسه با شاهد \*\* ( $p < 0.001$ )

اثر تیمار با زهر زنبور بر تعداد عروق: میانگین تعداد عروق خونی در گروه تجربی ۱ ( $144/4 \pm 1/14$ ) و گروه تجربی ۲ ( $144/6 \pm 0/7$ ) و گروه تجربی ۳ ( $144 \pm 0/7$ ) نسبت به گروه شاهد تغییر معنی‌دار در زمان ۲۴ ساعت پس از تیمار نشان نداد ( $p > 0.05$ )، در حالی که مقایسه تعداد عروق خونی گروه تجربی ۴ ( $33/6 \pm 2/0$ ) و گروه تجربی ۵ ( $23/4 \pm 1/14$ ) و گروه تجربی ۶ ( $14/6 \pm 1/14$ ) و گروه تجربی ۷ (لیز کامل) کاهش معنی‌دار نشان داد ( $p < 0.001$ ) (نمودار ۲ و شکل ۱).

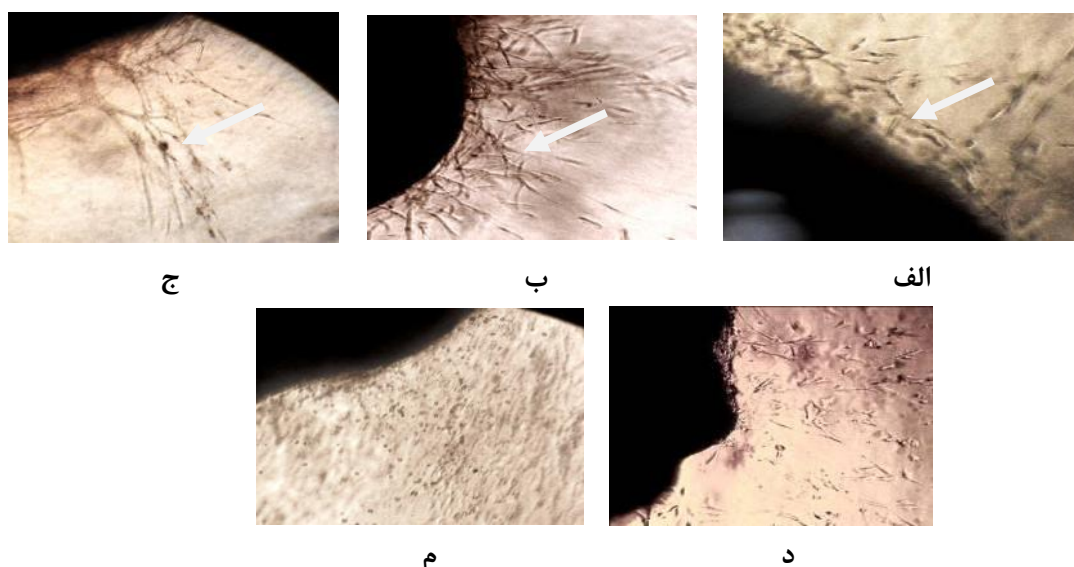
۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، گروه تجربی ۵ (تیمار با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، گروه تجربی ۶ (تیمار با غلظت ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، گروه تجربی ۷ (تیمار با غلظت ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تقسیم‌بندی گردید.

تیمار با زهر زنبور عسل: غلظت‌های ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۳۰، ۲۰، ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از استوک اولیه تهیه گردید و به چاهک‌هایی که جوانه زنی رگ در آن‌ها صورت گرفته بود اضافه گردید. قبل از تیمار و بعد از ۲۴ ساعت تیمارها با میکروسکوپ معکوس در یک بزرگ‌نمایی ثابت بررسی و عکس‌برداری انجام و تعداد و طول انشعابات رگی در داخل ۴ مربع با اندازه یکسان ۱۰ در ۱۰ که به صورت تصادفی روی تصاویر توسط نرم‌افزار ImageJ رسم شده بود، تعیین گردید. در هر بار آزمایش برای هر دوز ۵ نمونه در نظر گرفته شد و کلیه آزمایش‌ها ۳ بار تکرار گردید.

روش آماری: داده‌های آماری حاصل در نرم افزار SPSS و به کمک آزمون آماری ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey در سطح معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) تحلیل شد.

## نتایج

اثر تیمار با زهر زنبور بر طول عروق: میانگین طول عروق خونی در گروه تجربی ۱ ( $144/04 \pm 3/1$  mm) و در گروه‌های تجربی ۲ ( $144/32 \pm 3/08$  mm) و گروه تجربی ۳ ( $143/28 \pm 3/31$  mm) نسبت به گروه شاهد تغییر معنی‌دار در زمان ۲۴ ساعت پس از تیمار نشان نداد ( $p > 0.05$ )، در حالی که میانگین طول عروق خونی گروه تجربی ۴ ( $104/16 \pm 3/5$  mm)، گروه تجربی ۵ ( $76/25 \pm 3/6$  mm)، گروه تجربی ۶ ( $24/98 \pm 3/4$  mm) و گروه تجربی ۷ کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل در



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ نوری معکوس (بزرگنمایی  $\times 100$ ). از راست به چپ پدیدار شدن زوائد شبکه رگی از حلقه آئورت کشت شده در ماتریکس کلاژن در روز سوم نشان داده شده است علامت پیکان پدیدار شدن جوانه‌ها (الف). گسترش جوانه‌های عروقی در روز ششم فلش گسترش جوانه‌های مویرگی را نشان می‌دهد (ب). در غلظت ۳۰ میکروگرم زهر زنبور رگ‌زایی مهار شد، پیکان جوانه‌های لیز نشده را نشان می‌دهد (ج). غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر زهر زنبور با اثر مهار ضعیف، پیکان جوانه‌های مویرگی که به طور ضعیفی دچار مهار شده‌اند نشان می‌دهد (د) و غلظت ۷۰ میکروگرم زهر زنبور عسل با اثر مهاری قوی مشاهده شد، پیکان جوانه‌های لیز شده را نشان می‌دهد (م).

## بحث

این بیماری‌ها به صورت کامل موفقیت آمیز نبوده است و پژوهش‌های زیادی در جهت شناخت مکانیسم‌های درگیر در رشد و تکثیر سلولی‌های سرطانی بدخیم و یا عوامل موثر دیگر در رشد آن‌ها از جمله رگ‌زایی در تومور در حال انجام است که درمان با فرآورده‌های طبیعی بخش وسیعی از این پژوهش‌ها را به خود اختصاص داده‌اند [۲۲]. سلول‌های سرطانی بدون حضور رگ‌های خونی قادر به تأمین مواد غذایی مورد نیاز برای رشد نخواهند بود و تکثیر آن‌ها متوقف خواهد شد، بنابراین استفاده از روش‌های درمانی با مهار رگ‌زایی روشی امید بخش برای کنترل رشد و متاستاز تومور می‌باشد [۴]. از ماتریکس کلاژنی به عنوان یکی از انواع مدل‌های کشت استفاده فراوانی شده است. Mohammadi Motlagh و همکاران با استفاده از داربست کلاژنی به عنوان یک مدل مناسب برای

در این پژوهش مشاهده گردید که زهر زنبور عسل با اثرات وابسته به دوز در غلظت‌های مشخص منجر به مهار رگ‌زایی در مدل حلقه آئورت موش صحرایی گردید، بدین ترتیب که غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زهر زنبور عسل تغییر معناداری در میانگین اندازه و تعداد جوانه‌های عروق نسبت به گروه کنترل مشاهده نگردید در حالی که کاربرد دوزهای ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زهر زنبور عسل منجر کاهش معنی دار میانگین اندازه و تعداد جوانه‌های عروقی در مقایسه با کنترل گردید و دوزهای بالاتر از ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زهر زنبور منجر به تخریب کامل ساختارهای عروقی گردید. علی‌رغم پیشرفت‌های فراوان در زمینه کنترل و درمان بیماری‌های بدخیم از جمله سرطان‌ها، هنوز فرآیندهای درمان و مهار

کشت حلقه آئورت، اثر عصاره گیاه موسیر را بر روند رگ‌زایی آن مورد بررسی قرار دادند [۲۱]. اساس مدل‌های سه بعدی رگ‌زایی بر پایه ظرفیت سلول‌های آندوتلیال فعال شده و جهت تهاجم به محیط‌های سه بعدی (ماتریکس) بنا نهاده شده است، این ماتریکس ممکن است ژل کلاژن یا فیبرین، ماتریژل یا مخلوطی از این پروتئین‌ها به همراه فاکتورهای دیگر باشد. به طور کلی مدل‌های سه بعدی نسبت به دو بعدی دارای ویژگی‌ها و شرایط نزدیکتر به محیط درون بدن هستند و در حقیقت بسته به ترکیب محیط کشت (درصد سرم، اضافه کردن فاکتورهای رشد وسایتوکاین‌ها)، در این نوع مدل‌ها، سلول‌ها را می‌توان برای جوانه زدن یا ایجاد انشعاب، تکثیر و مهاجرت و یا تمایز سه بعدی تحریک کرد [۲۳].

زهر زنبور عسل ترکیبی متشکل از پروتئین‌ها، آمین‌های بیولوژیک فعال و ترکیبات غیرپپتیدی می‌باشد [۲۴]. در این پژوهش تجربی، اثرات آن بر روند رگ‌زایی و مهار آن مورد توجه قرار گرفته است. نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که زهر زنبور عسل در دوزهای ۱۰ تا ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قادر به مهار رگ‌زایی در مدل حلقه آئورت نمی‌باشد، به طوری که بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌های آندوتلیال و جوانه‌های مویرگی مشتق از حلقه آئورت ظاهری طبیعی داشتند و تفاوت قابل ملاحظه‌ای با نمونه‌های کنترل از نظر طول و تعداد انشعابات نداشتند، اما دوزهای ۵۰ تا ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با مهار رگ‌زایی در مدل حلقه آئورت موجب کاهش معنی دار در تعداد و طول عروق در نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه شاهد گردید.

به صورتی که سلول‌ها از حالت طبیعی و کشیده خارج و ساختارهای مویرگی بهم ریخته شده بودند. این داده‌ها

نشان می‌دهد که زهر زنبور عسل بصورت وابسته به دوز قادر به مهار رگ‌زایی و القای مرگ‌سلولی در جوانه‌های مویرگی مشتق از حلقه آئورت موش صحرایی می‌باشد. Huh و همکاران نشان دادند که زهر زنبور عسل قادر به مهار رگ‌زایی در تومورهای القا شده به وسیله سلول‌های سرطان سینه در موش‌های صحرایی نژاد لوئیس است، که منجر به کاهش حجم توده سرطانی القا شده می‌شود و همچنین، آن‌ها بیان نمودند زهر زنبور عسل در مدل *in vitro* منجر به کاهش تکثیر سلولی و همچنین جلوگیری از تشکیل ساختارهای لوله مانند به وسیله سلول‌های آندوتلیال مشتق از بند ناف به صورت وابسته به دوز می‌گردند که با مطالعات این پژوهش همسو می‌باشد [۲۵]. به نظر می‌رسد زهر زنبور عسل اثرات مهاری بر مهاجرت سلولی با مهار ماتریکس متالوپروتئاز (MMP) دارند، بعلاوه این ترکیب طبیعی قادر به کاهش بیان رسپتور فاکتور رشد آندوتلیال عروق (VEGFR) می‌باشد، این فاکتور رشد نقش مرکزی در فرآیند رگ‌زایی دارد و بوسیله سلول‌های سرطانی ترشح می‌شود و گیرنده‌های آن بر روی سلول‌های آندوتلیال وجود دارد [۲۶].

در این زمینه Parivar و همکاران طی مطالعاتی نشان دادند که زهر زنبور عسل توانایی القا تمایز رده سلولی میلوئیدی k562 به دودمان اریتروئیدی و همچنین توانایی القامرگ برنامه‌ریزی شده سلول را دارد، که می‌توان به اهمیت زهر زنبور عسل به عنوان ماده طبیعی که دارای خاصیت ضد سرطانی است پی برد [۲۷]. Enas در طی مطالعاتی نشان داد که زهر زنبور دارای توانایی مهار رشد تومور می‌باشد که غلظت مشخصی از زهر زنبور عسل قادر به تکه تکه کردن DNA به دنبال فعال شدن آندونوکلازها، القاء تغییرات مورفولوژیکی مرتبط به مرگ

نتایج تحقیق حاضر می‌تواند مقدمه ای برای تحقیقات آینده روی زهر زنبور عسل و متابولیت‌های فعال آن باشد به نظر می‌رسد اثرات مهاری بر تکثیر سلول، سمیت در سلول و خواص ضد رگ‌زایی و همچنین توانایی القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، آن را به عنوان کاندید مناسب داروی ضد سرطان پیشنهاد می‌نماید.

### نتیجه‌گیری

نتایج بیانگر آن است که زهر زنبور به صورت وابسته به دوز دارای اثر مهاری بر رگ‌زایی در مدل حلقه آئورت موش صحرایی است. بنابراین می‌تواند کاندید مناسبی برای مطالعات بیشتر به عنوان یک داروی مورد استفاده در حالت پاتولوژیک وابسته به رگ‌زایی قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاران محترم مرکز تحقیقاتی بیولوژی- کاربردی دانشگاه آزاد اسلامی تشکر می‌شود.

برنامه‌ریزی شده سلول مانند، تشکیل اجسام آپوپتیک، افزایش بیان BAX و کاسپاز ۳ و کاهش بیان BCL-2 می‌شود و همچنین در درمان بیماری‌های عفونی کاربرد دارد [۲۸]. Liu و همکاران گزارش کردند که ملیتین اثر مهاری بر تکثیر سلول‌های سرطانی کبدی دارد و دریافتند Rac1 که در متاستاز سلول‌های سرطانی دخالت دارد بوسیله ملیتین مهار می‌شود، بنابراین تکثیر سلولی و متاستاز وابسته به Rac1 در این سلول‌ها به وسیله زهر زنبور عسل مهار می‌شود [۲۹]. این مطالعات با نتایج پژوهش حاضر هم سو می‌باشد. طبق نتایج حاصل از پژوهش حاضر زهر زنبور عسل با مهار رگ‌زایی می‌تواند در مهار توسعه و متاستاز تومورها نقش ایفا نماید.

مطالعات بالینی متعددی که به تازگی در سراسر نقاط جهان روی فرآورده‌های طبیعی مشتق از جانوران انجام شده است محققان را بر آن داشته تا از فواید متعدد این فرآورده‌ها در درمان بیماران سرطانی استفاده نمایند [۳۰].

## References

- [1] Talukdar S, Mindal M, Hutmacher D, Soekmadji C, Kundu S, Russell P. Engineered silk Fibrin protein 3D matrixes for in vitro tumor model. *Biomates* 2011; 32(8): 2149-59.
- [2] Ribatti D, Crivellato E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochimica et Biophysica Acta Review* 2012; 18(22): 2-8.
- [3] Ribatti D. Novel angiogenesis inhibitors: Addressing the issue of redundancy in the angiogenic signaling pathway. *Cancer Treatment Reviews* 2011; 37: 344-352.
- [4] Baharara J, Zafar-Balanezhad S, Nejad-Shahrokhbadi Kh. The effects of different doses of atorvastatin on angiogenesis of chorioallantoic membrane of chick

- embryo. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2012; 14(2): 82-9. [Farsi]
- [5] Nakagawa K, Shibata A, Saito T, Sookwong P, Kato SH, Tsuduki T, et al. Phosphatidylcholine hydroperoxide promotes VEGF-induced angiogenesis in endothelial cells and rat aorta ring cultures. *Biochemical ET Biophysical Acta* 2011; (12): 1205-11.
- [6] Mansouri K, Mostafaie A, Mohammadi Motlagh H. Angiogenesis and Tumor Biology. *J Improve, Kermanshah Univ Med Sci* 2010; 14(4): 315-05.
- [7] Cao Y. Angiogenesis: What can it offer for future medicine? *Experimental Cell Res* 2010; 316(8): 1304-8.
- [8] Nicosia R. The aortic ring model of angiogenesis: a quarter century of search and discovery. Angiogenesis Review Series. *Cell Mol Med* 2009; 13(10): 4113-36.
- [9] Alfred C, Fogel A, Zorzi P, Roberto F. Nicosia R: The Aortic Ring Model of Angiogenesis. *Methods Enzymol* 2008; 443(4): 119-136.
- [10] Baker M, Robinson D, Lechertier T, Barber P, Tavora B, D'Amico G, et al. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat Protoc* 2011; 7(1): 89-104.
- [11] Estrada O, Manue J, Salazar-Bookaman M, Fernández A, Cardozo A, Alvarado-Castillo C. Pomolic acid of *Licania pittieri* elicits endothelium-dependent relaxation in rat aortic rings. *Phytomedicine J* 2011; 18(6): 464-9.
- [12] Tao L, Shuai Hu H, Chun Shen X. Endothelium-dependent vasodilatation effects of the Essential Oil from *Fructu Alpiniae Zerumbet* (EOFAZ) on rat thoracic aortic rings in vitro. *Phytomed J* 2013; 20(6): 387-93.
- [13] Besse S, Comte R, Fréchault S, Courty J, Leiris -Joël D, Delbé J. Pleiotrophin promotes capillary-like sprouting from senescent aortic rings. *Cytokine* 2013; 62(1): 44-7.
- [14] Nabiuni M, Parivar K, Divsalar A, Safaei Nejad Z. A review of the anti-cancer effects of bee venom. *J Med Sci* 2011; 3(10): 13. [Farsi]
- [15] Nabiuni M, Parivar K, Divsalar A, Safaei Nejad Z. Effect of honey bee venom on apoptosis of human acute lymphoblastic leukemia cell cancer cell line T. *A two-month Feiz Scientific Research* 2012; 16(2): 16. [Farsi]
- [16] Chen H, Qu F, He X, Wang Y, Wen W. Chemical or surgical sympathectomy prevents mechanical hyperalgesia induced by intraplantar injection of bee venom in rats. *Brain Res* 2010; 1353(1): 86-93.
- [17] Oršoli N, Josipovi P, Baši I. Direct antitumor activity of honey bee venom in vivo and in vitro. *Egyp J Natu Tox* 2009; 6(1): 1-15.
- [18] Nabiuni M, Bahar Ara J, Amini E, Jalali H. Determination of Apoptotic Doses of Bee Venom on Human Promyelocytic Leukemia Cells. *J Cell Tissue (JCT)* 2012; 2(4): 425-33.
- [19] des Rieux A, Ucakar B, Mupendwa BP, Colau D, Feron O, Carmeliet P, et al. 3D systems delivering



- VEGF to promote angiogenesis For tissue engineering. *J Controll Release* 2011; 150(3): 272-8.
- [20] Gloria Tse H, Nga Yu Hui M, Li L, Ming Yuen Lee S. Antigenic efficacy of simplified 2-herb formula (NF3) in zebra fish embryos in vivo and rat aortic ring in vitro. *J Ethno Pharm* 2012; 139(11): 447-53.
- [21] Mohammadi Motlagh HR, Mansouri K, Shakiba Y, Keshavarz M, Khodarahmi R, Siami A, et al. Anti-Angiogenic Effect of Aqueous Extract of Shallot (*Allium ascalonicum*) Bulbs in Rat Aorta Ring Model. *Yakhte Med J* 2009; 11(2): 190-5.[farsi]
- [22] Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song, HS, et al. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol Ther* 2007; 115(2): 246-27.
- [23] Xinsheng Xu, Huixia Lu, Huili Lin, Xiaolu Li, Meh Ni, Chingjiang Li. Aortic adventitial angiogenesis and lymphangiogenesis promote intimal inflammation and hyperplasia. *Cardiovascular Pathol* 2009; 18(5): 267-78.
- [24] IPSW, Liao SS, Lin SY, Lin JP, Yang JS, Lin ML, et al. The role of mitochondria in bee venom-induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells; in vivo. 2008; 22(2): 237-46.
- [25] Huh J, Baek Y, Lee M, Choi D, Park D, Lee J. Bee venom inhibits tumor angiogenesis and metastasis by inhibiting tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 in LLC-tumor-bearing mice. *Cancer Lett* 2010; 292(1): 98-110.
- [26] Nabiuni M Nasri S, Poyanmanesh P, Karimzadeh L. Honey Bee Venom Modulates Hyperglycemia in Response to Hyperandrogenism in Polycystic Ovarian Syndrome-Induced Rats. *Environ Appl Sci* 2012; 7(5): 949-52.
- [27] Parivar k, Nabiuni M, Kouchesfahani H, Ramezani T, Amini. Effect of bee venom-induced differentiation of K562 cells to erythroid lineage. *Med Sci J Islamic Azad Univ* 2012; 22(4): 244-50.
- [28] Enas M. Ali. Dissection of antimycotic and antitumor effect of honey bee venom in- vitro and vivo. *Afri J Microbi Res* 2013; 7(29): 3730-9.
- [29] Liu S, Yu M, He Y, Xiao L, Wang F, Song C, et al. Melittin Prevents Liver Cancer Cell Metastasis Through Inhibition of the Rac1-Dependent Pathway. *Hepato* 2008; 47(6): 1964-73.
- [30] Park HJ, Lee HJ, Choi MS, Son DJ, Song HS, Lee JM, et al. JNK pathway is involved in the inhibition of inflammatory target gene expression and NF-kappa B activation by melittin. *J Inflamm* 2008; 29(2): 5-7.

## Angiogenesis Inhibition by Bee Venom in Rat Aortic Model

J. Baharara<sup>1</sup>, N. Hosseini<sup>2</sup>, T. Ramezani<sup>3</sup>

Received: 21/01/2014 Sent for Revision: 04/03/2014 Received Revised Manuscript: 10/06/2014 Accepted: 22/06/2014

**Background and Objective:** Angiogenesis- formation of new blood vessels from former ones- is an essential process in development. Bee venom has been used to cure diverse ills for many years. In the present research the inhibitory effect of bee venom on angiogenesis has been investigated in a wistar rat aortic model.

**Materials and Methods:** Rat's aorta was cut into 1 mm pieces and cultured in collagen matrix. After observation of the first sprouting of angiogenesis, the samples were divided into control and experimental groups. Experimental groups were treated with bee venom in concentration 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70  $\mu\text{g/ml}$ . Angiogenesis was investigated and photographed by invert microscope. Numbers and lengths of vessels were measured by Image J software. Data were analyzed by SPSS software and ANOVA & TUKEY in significant level ( $p < 0.05$ ).

**Results:** Lengths average and numbers of blood vessels in experimental groups at concentration of 10, 20, 30  $\mu\text{g/ml}$  in comparison to control group showed any significant changes ( $p > 0.05$ ). length average and numbers of blood vessels in experimental groups with 40, 50, 60, 70  $\mu\text{g/ml}$  concentration showed a significant decrease in comparison to control group ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The proper concentrations of BV inhibits angiogenesis. So it can be considered in studies of cancer and pathological conditions associated with angiogenesis.

**Key words:** Angiogenesis, Venom, Aorta, Cancer, Bee

**Funding:** This research was funded by Islamic Azad University of Mashhad.

**Conflict of Interest:** None declared.

**Ethical approval:** The Ethics Committee of Islamic Azad University, Mashhad Branch, approved the study.

**How to cite this article:** Baharara J, Hosseini N, Ramezani T. Angiogenesis Inhibition by Bee Venom in Rat Aortic Model. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2014; 13(4): 361-70. [Farsi]

1- Associate Prof., Dept. of Animal Developmental Biology, Research Center for Animal Development Applied Biology & Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

(Corresponding Author): Tel: (0511) 8437092, Fax: (0511) 8437092, E-mail: baharara@yahoo.com

2- MSc Student in Cell & Developmental Biology, Department Biology, Faculty of Sciences, Young Researchers Club, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

3- Ph.D Student, Animal Developmental Biology Faculty of, Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran