

## آنژیوزنز و تومور

کامران منصوری<sup>1\*</sup>؛ علی مصطفایی<sup>1</sup>؛ حمیدرضا محمدی مطلق<sup>1</sup>

## چکیده

رگ‌زایی یا آنژیوزنز، به فرایند تشکیل عروق خونی جدید از عروق پیشین گفته می‌شود. این فرایند نقش مهمی در وقایع فیزیولوژیک مانند رشد و نمو، ترمیم زخم و تولید مثل دارد. علاوه بر این، در پیشرفت پدیده‌های پاتولوژیکی و بروز بیماری‌های مختلف به‌خصوص رشد تومور و متاستاز، نقش حیاتی دارد. به‌طور کلی، این فرایند تحت تأثیر عوامل مختلف بوده و دربرگیرنده یکسری رخدادهای سلولی از قبیل مهاجرت، تکثیر و تمایز سلول‌های اندوتلیال و در نهایت تشکیل عروق، بلوغ و بازسازی نهایی آن‌ها است. به‌همین دلیل، مهار رگ‌زایی به‌عنوان یک عامل کمک‌کننده در درمان‌های مرسوم سرطان مانند شیمی‌درمانی و پرتودرمانی، توجه محققانی که در این زمینه به مطالعه می‌پردازند را به خود معطوف کرده است. در سال‌های اخیر، مهار رگ‌زایی به‌عنوان ایده‌ای نوین در کنترل و درمان انواعی از اختلالات وابسته به رگ‌زایی، به‌ویژه رشد و متاستاز تومور مطرح شده است.

کلیدواژه‌ها: رگ‌زایی، سرطان، متاستاز

«دریافت: 1388/9/3 پذیرش: 1389/3/4»

1. مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

\*عهده‌دار مکاتبات: کرمانشاه، صندوق پستی 1568، سرخه لیژه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، تلفاکس: 831-4276471.

Email: kmansouri@kums.ac.ir

## مقدمه

تومور (TAF= Tumor Angiogenic Factor) یاد می‌کند در نهایت، اظهار داشت که "از لحاظ تئوری، اگر بتوان آنژیوزنز را مهار نمود، تومورها در اندازه کوچک باقی می‌مانند و سرانجام آسیب‌رسان نخواهند شد". نظریه جدید فولکمن همچون سایر نظریات، ابتدا با بدبینی زیادی از سوی جامعه علمی مواجه شد و پذیرش آن نزدیک به یک دهه به طول انجامید. اکنون، پس از گذشت بیش از 30 سال از انتشار تئوری فولکمن، آنژیوزنز تومور به‌عنوان یک اصل اساسی در تحقیقات مربوط به سرطان مورد توجه است. علاوه بر این در سال 1984، فولکمن و همکارانش مقاله دیگری در مجله Science منتشر کردند و توجه جامعه علمی دنیا را به سوی اولین فاکتور شناسایی شده آنژیوزنزی سوق دادند. این مقاله موجب ایجاد انگیزه‌های بسیاری برای تحقیق در این زمینه شد به‌طوری‌که اکنون فاکتورهای محرک و بازدارنده آنژیوزنزی زیادی مورد شناسایی قرار گرفته‌اند (1 و 2).

واژه آنژیوزنز به‌معنی ایجاد مویرگ‌های جدید از عروق موجود برای اولین بار توسط محقق بنام Hertig در سال 1935 به‌کار رفت. هرچند اساس بسیاری از تحقیقات بنیادی آنژیوزنز بر طبق نظریات پروفیسور جودا فولکمن (Judah Folkman) بنا نهاده شده است. در سال 1971 فولکمن مقاله‌ای را در مجله پزشکی نیوانگلند (New England Journal of Medicine) منتشر کرد که تئوری جدید آنژیوزنز را براساس چندین سال کار و تحقیق مورد بحث قرار می‌داد. در این تحقیق، فولکمن خاطرنشان کرد که "تومورها هرگز فراتر از اندازه مشخصی رشد نمی‌کنند مگر این‌که عروق آن‌ها افزایش یابد". در این مقاله، او همچنین نظریه‌ای را مطرح کرد مبنی بر این که تومورها دارای رگ‌های خونی جدیدی هستند که فاکتوری قابل انتشار را به‌نوعی به کار می‌گیرند. او از این فاکتورها به‌عنوان فاکتور آنژیوزنزی

## آنژیوژنز و سرطان

آنژیوژنز (Angiogenesis) یا رگ‌زایی، به معنی تشکیل مویرگ‌های جدید از عروق اولیه است که در حالات مختلف پاتولوژیک از قبیل رشد تومور، متاستاز، آرتريت روماتوئید (Rheumatoid arthritis) و همچنین در فرایندهای فیزیولوژیک مانند رشد و نمو ارگان، ترمیم زخم و تولید مثل دخالت دارد. اساساً آنژیوژنز یک فرایند لازم در فیزیولوژی طبیعی است و در صورتی که تعادل بین فاکتورهای القاء‌کننده و مهارکننده آنژیوژنز بر هم خورد، شرایط برای بروز برخی بیماری‌ها به وجود می‌آید. به طور کلی برای فرایند آنژیوژنز، 10 مرحله متوالی در نظر گرفته می‌شود که یک یا چند مرحله از این مراحل می‌تواند هدف عوامل محرک و یا بازدارنده آنژیوژنز باشد. هنگامی که بافت‌ها دچار هیپوکسی 3 (کمبود اکسیژن) می‌شوند، این بافت‌های آسیب‌دیده اقدام به سنتز و رهاسازی فاکتورهای آنژیوژنیک می‌کنند. سپس فاکتورهای مذکور با اتصال به گیرنده‌های خود واقع بر روی سلول‌های اندوتلیال، منجر به فعال شدن آن‌ها می‌شوند. در مرحله بعد، پروتئازها از این سلول‌ها رها شده تا غشای پایه را حل کنند، با حل شدن غشای پایه، سلول‌های اندوتلیال مهاجرت کرده و تکثیر می‌یابند، علاوه بر این، مولکول‌های اتصالی (از قبیل اینتگرین  $\alpha v \beta 5$  و  $\alpha 3 \beta v$ ) نیز به کشیدن و جلو رفتن رگ‌های خونی در حال جوانه‌زدن کمک می‌کنند، در ادامه، متالوپروتئینازهای ماتریکس (MMP= Matrix metalloproteinases)، برای تجزیه ماتریکس خارج سلولی و آغاز بازسازی مجدد آن تولید می‌گردند. سپس برهمکنش آنژیوپوئیتین-2 موجب تعدیل تشکیل لوله می‌گردد و سیستم EphB-ephrinB نیز تنظیم تشکیل حلقه را بر عهده گرفته و در نهایت پری‌سیت‌ها و سلول‌های ماهیچه صاف برای پایدار کردن رگ خونی تازه تشکیل شده به این ساختار اضافه می‌شوند (3 و 4).

ویرچو (Virchow) اولین کسی بود که وجود میزان

زیاد عروق‌زایی را در تومورها ثابت کرده و گزارش آن را در سال 1863 منتشر کرد. او پیشنهاد کرد که این پدیده در ارتباط با طبیعت بی‌نظم سلول‌های توموری است. منشأ رگ‌های مشاهده شده ابتدا نامشخص بود و علت آن می‌توانست سلول‌های تغییر یافته توموری یا سلول‌های طبیعی که از بافت‌های خوش‌خیم مجاور منشأ گرفته بودند، باشد. مدتی بعد این تئوری مطرح شد که عامل محرک رشد زیاد رگ‌های خونی در تومورها از سلول‌های بدخیم مهاجم منشأ می‌گیرد و به این ترتیب پیشنهاد شد که تحریک ایجاد عروق جدید از میزبان، ویژگی مشخص سلول‌های توموری است. در طی روند این همکاری، تومورها در ابتدا عروق میزبان را برای بقای خود به کار می‌گیرند که این امر همراه با اضمحلال عروق میزبان است. رشد مداوم سلول توموری در ادامه منجر به آغاز آنژیوژنز می‌گردد (5 و 6).

به‌خاطر اهمیت آن در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک، بسیاری از محققین آنژیوژنز را در انواعی از مدل‌های آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار داده‌اند. این ایده که فرایند آنژیوژنز می‌تواند هدفی برای درمان باشد، تنها پس از مشخص شدن این که گسترش تومور توپر نیازمند ایجاد رگ‌های جدید است، مطرح گردید. علاوه بر این، مطالعات اخیر به اثبات رسانده‌اند که بیماری‌هایی از قبیل لوسمی و لنفوما هم وابسته به آنژیوژنز هستند. در واقع، افزایش بیان VEGF و FGF در لوسمی حاد میلوئیدی، لوسمی لنفوئیدی حاد و لنفوما مشاهده شده‌اند و به همین دلیل، آنژیوژنز ممکن است یک هدف درمانی برای تومورهای خونی نیز باشد (7-13).

## آنژیوژنز در پاتوژنز متاستاز

ادامه رشد نئوپلاسم اولیه و متاستاز بستگی به خون‌رسانی کافی به آن منطقه دارد. فرایند تشکیل عروق جدید یا همان آنژیوژنز، به تومورها این امکان را می‌دهد که فراتر از 1-2 میلی‌متر مکعب توسعه یابند. به استثنای تومورهای خوش‌خیم که آنژیوژنز کمی دارند و سرعت

فاکتورهایی مستقیم در این گونه موارد شده است. در واقع این فاکتورها، علامت لانه‌گزینی (Homing) هستند که از طریق سایتوکاین‌های جلب‌کننده برای سلول‌های توموری در حال متاستاز ارسال می‌شوند (16).

شناخت پدیده آنژیوژنز در ایجاد و گسترش تومورها

رشد تومورهای توپر (Solid tumor) به‌طور کامل به ایجاد رگ‌های جدید و رفع نیازهای تغذیه‌ای تومور بستگی دارد. فاکتورهای آنژیوژنیک به‌وسیله سلول‌های توموری در محیط رها و موجب تحریک انواع مختلف سلول‌های طبیعی مانند سلول‌های اندوتلیال مویرگ‌های مجاور تومور می‌گردند. این سلول‌ها غشای پایه خود (تکیه‌گاه سلول‌های اندوتلیال) را تجزیه کرده و با جداشدن از سلول‌های همسایه و ورود به ماتریکس خارج سلولی، به سمت توده تومورها مهاجرت می‌کنند.

VEGF برای سلول‌های اندوتلیال عروق مشتق شده از سرخرگ‌ها، سیاه‌رگ‌ها و عروق لنفاوی به‌عنوان میتوزن عمل کرده و باعث افزایش آنژیوژنز می‌شود. مطالعات همچنین نشان می‌دهند که VEGF باعث نفوذپذیری عروق می‌شود به طوری که افزایش در نفوذپذیری عروق، یک مرحله مهم و اساسی در آنژیوژنز تومورها و زخم‌ها است. طبق این تئوری، عملکرد اصلی VEGF/VEGF در فرایند آنژیوژنز، افزایش نشت پروتئین‌های پلاسمایی است. این اثر منجر به تشکیل ژل فیبرین در خارج عروق می‌شود که سوبسترای برای رشد سلول‌های توموری و اندوتلیال است. علاوه بر این، تقسیم سلولی نیز در جوانه به‌وجود آمده اتفاق افتاده و با افزایش مهاجرت سلول‌های اندوتلیال، رشته‌ای از این سلول‌ها تشکیل شده و غشای پایه خارج و داخل سلولی را تکامل می‌بخشد. حلقه‌های این رشته‌های توخالی با هم ارتباط پیدا کرده و ساختمان عروق جدید را که در آخر به سیستم گردش خون متصل می‌گردد تشکیل می‌دهند. بدین ترتیب شبکه مویرگی در توده توموری ایجاد شده و می‌تواند به رشدش ادامه دهد

رشد آن‌ها کند است، تومورهای بدخیم دارای عروق زیاد هستند و رشدشان سریع است. گسترش سیستم عروقی، احتمال تهاجم سلول‌های توموری را از طریق وارد شدن به جریان خون و انتشار به اندام‌های دیگر افزایش می‌دهد. علاوه بر این، نشان داده شده که تشکیل سیستم عروقی در تومورهای بدخیم با قدرت متاستاز تومور رابطه مستقیم دارد. به‌طور کلی در بافت‌های سالم و پایدار (Quiescent) فاکتورهایی که از آنژیوژنز ممانعت می‌کنند غالب هستند اما در بافت‌هایی که به‌سرعت تقسیم می‌شوند مولکول‌هایی که فرایند آنژیوژنز را تحریک می‌کنند غلبه دارند. به‌عنوان مثال در فیبروبلاست‌های کشت داده‌شده، از دست دادن آلل ژن سرکوبگر TP53 منجر به فنوتیپ آنژیوژنز می‌شود که نتیجه آن کاهش تولید TSP-1 است (14 و 15).

نقش محیط سلولی (Microenvironment) اندام‌ها در وقوع متاستاز

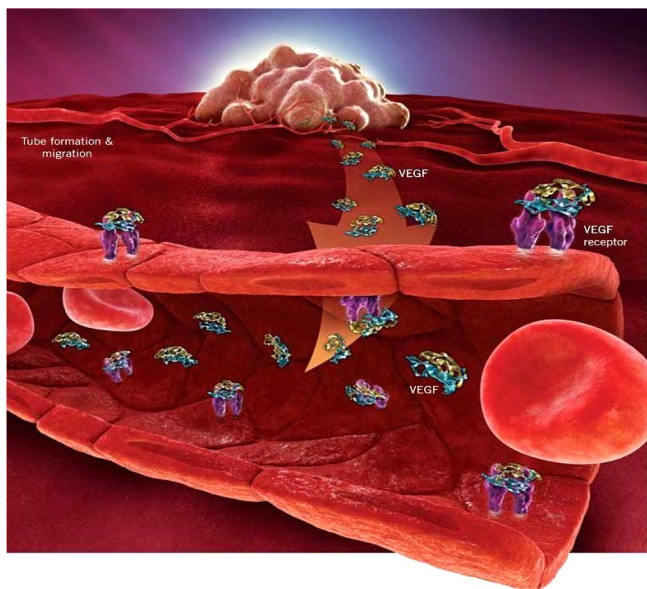
مطالعات نشان داده‌اند که محل متاستاز علاوه بر ویژگی‌های سلول‌های نئوپلاستیک، به محیط در برگیرنده بافت یا اندام میزبان نیز ارتباط دارد این پدیده، تئوری دانه و خاک نام گرفته است. تئوری دانه و خاک (Seed and Soil) شامل سه قسمت است:

اول این‌که، نئوپلاسم‌ها از نظر بیولوژیک ناهمگون بوده و شامل جمعیت‌های سلولی با خاصیت‌های بیولوژیکی متفاوت است. از سوی دیگر، فرایند متاستاز بسیار انتخابی است همچنین، نتایج متاستاز بستگی به واکنش‌های مختلف سلول‌های متاستاتیک با مکانیسم‌های هموستازی دارد به طوری که می‌تواند در میان تومورهای مختلف با منشأ بافتی یکسان در بیماران مختلف، متفاوت باشد. به‌رحال، متاستاز در بسیاری از تومورهای منتشرشونده از مسیرهای آناتومیک پیروی می‌کند. با وجود این، توانایی سرطان معده در ایجاد متاستازهایی روی سطح تخمدان و توانایی سرطان تخمدان برای متاستاز به پستان، باعث ارائه پیشنهادهایی مبنی بر وجود

(تصویر 1) (17 و 18).

برای تکثیر مداوم تومور ایجاد می‌کنند که منجر به هایپوکسی مداوم می‌شود. این پدیده سبب تعدیل سایتوکین‌ها و گیرنده‌هایی می‌شود که در آنژیوژنز نقش دارند (جدول 1) (19).

از سوی دیگر رشد تومورها موجب بروز هایپوکسی و اسیدوز پیشرفته می‌شود. به هر حال، عروق تومور دارای عملکرد طبیعی دستگاه عروقی نیستند و یک فیدبک مثبت



تصویر 1- نقش فاکتور آنژیوژنیک VEGF در آنژیوژنز تومورها. مولکول‌های VEGF ترشح شده توسط تومورها با اتصال بر روی گیرنده‌های خود بر روی سلول‌های اندوتلیال اطراف تومور، سبب شروع و تحریک فرایند آنژیوژنز و در نهایت ایجاد عروق جدید برای تغذیه سلول‌های توموری می‌گردند.

جدول 1- فهرست سایتوکین‌ها و گیرنده‌هایی که عرضه آن‌ها توسط هایپوکسی تعدیل می‌شود.

Cytokines or receptor	Hypoxia level		Gene expression
	PO <sub>2</sub>	Time	
Angiopoietin 1	NS	18 h	↓ (27)
aFGF, bFGF	2.0%	24 h	↑ (28)
Flk-1/KDR	2.0/2.0%	24/24 h	↓/↑ (29 <sup>a</sup> , 30 <sup>b</sup> )
Flt-1	2.0%	24 h	↑ (30)
Interleukin-8	2.0%	24 h	↑ (31)
PDGF-A, PDGF-B	1.0%	16 h	↑ (32)
TGF-β	0.0%	24 h	↑ (33)
TNF-α	1.0%	24 h	↑ (34)
VEGF	1.0%	06 h	↑ (35)

↑: increase, ↓: decrease, NS: not specified.

a: Reoxygenation performed in the experiments.

b: Conflicting data has been reported in the papers.

$\alpha 2$ ، سرکوبگر فعال‌کننده پلاسمینوژن و احتمالاً آنژیواستاتین می‌باشند. از آنجایی که تومورها یا زخم‌ها موجب سست شدن غشاهای پایه می‌شوند، پلی‌پپتیدهای جدیدی که قبلاً به صورت مخفی بودند ممکن است در این هنگام با فعالیت آنتی‌آنژیوژنیک در معرض قرار گیرند. این پلی‌پپتیدها ممکن است از کلاژن، فیبرونکتین و سایر اجزای ماتریکس حاصل شوند. اجزای حاصل از این تجزیه با فعالیت بیولوژیکی ممکن است توسط ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP) و سایر آنزیم‌های ترشح‌شده توسط تومورها و حتی دیگر سلول‌ها ایجاد شوند. بنابراین، سیستم هموستازی احتمالاً به‌عنوان تنظیم‌کننده مهم آنژیوژن عمل می‌کند، به‌ویژه از این جهت که آنژیوژن در بهبود زخم‌ها نقش انکارناپذیری دارد (23 و 24).

#### کانستاتین (Canstatin)

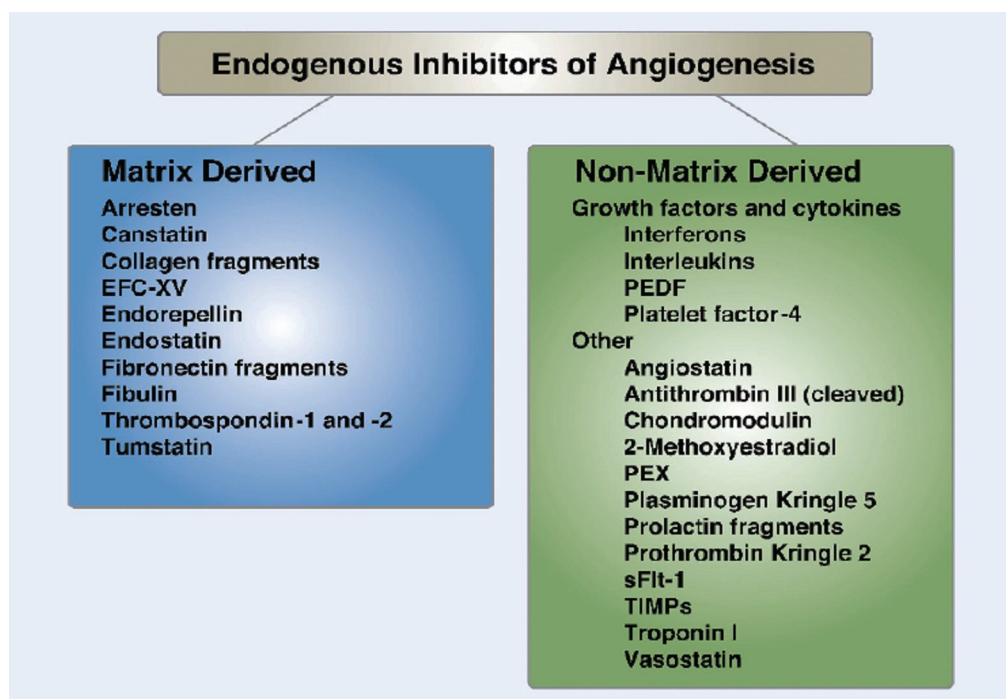
کانستاتین شامل قطعه‌ای 24 کیلودالتونی از زنجیره  $\alpha 2$  کلاژن نوع چهارم است. مطالعات انجام‌شده با کانستاتین نوترکیب نشان داده‌اند که این مولکول به

مهار آنژیوژن و فاکتورهای مهارکننده آنژیوژن تاکنون تعداد زیادی از فاکتورهای درون‌زای مهارکننده آنژیوژن شناسایی شده‌اند که بسیاری از آنها به‌طور طبیعی از ماتریکس خارج سلولی منشأ گرفته و برخی هم پروتئین‌های غشای پایه هستند. به‌طورکلی مهارکننده‌های آنژیوژن به دو کلاس اصلی تقسیم می‌شوند که شامل مهارکننده‌های مشتق از ماتریکس و مهارکننده‌های مشتق‌نشده از ماتریکس هستند (جدول 2) (20-22).

#### فاکتورهای آنتی‌آنژیوژنیک درون‌زا

بسیاری از فاکتورهای مهارکننده آنژیوژن، قطعاتی از مولکول‌های پیش‌ساز بزرگ‌تر هستند که برخی از آنها به‌عنوان عوامل میانجی‌کننده انعقاد و فیبرینولیز عمل می‌کنند. برخی از این فاکتورهای مهارکننده آنتی‌آنژیوژنیک شامل دومین 5 از کینوزن با وزن مولکولی بالا (HMWK)، قطعات 1 و 2 پروترومبین و آنتی‌ترومبین 3 (AT-III) هستند. علاوه بر این، تنظیم‌کننده‌های آنژیوژن در مسیر فیبرینولیز شامل آنتی‌پلاسمین  $\alpha 2$ ، ماکروگلوبولین

جدول 2- مهارکننده‌های درون‌زای آنژیوژن. این مهارکننده‌ها به دو گروه مشتق از ماتریکس و مشتق‌نشده از ماتریکس تقسیم‌بندی می‌گردند.



مهارکننده آنژیوژنز مشتق از ماتریکس دیگری است، متصل شده و با اثرات ضد آنژیوژنزی آن مقابله می‌کند. مکانیسم دقیق اندورپلین هنوز شناخته نشده است، اما مشخص شده که اینتگرین  $\beta 1$  و دستروگلیکان  $\alpha$  با ناحیه کربوکسیل پرلکان (ناحیه حاوی اندورپلین) برهمکنش می‌کنند (26 و 27).

### اندوستاتین (Endostatin)

اندوستاتین یک مهارکننده درون‌زای آنژیوژنزی مشتق از کلاژن نوع 18 بوده که نخست از رده سلولی همانژیواندوتلیوما (hemangioendothelioma) موش مورین تخلیص شده و بعداً در موش‌های mice نیز شناسایی و تعیین خصوصیت گردید. فرم نوترکیب اندوستاتین که یک قطعه 20 کیلودالتونی مشتق از دومن کربوکسیل NC1 کلاژن نوع 18 است، از آنژیوژنز ممانعت کرده و رشد اولیه تومور و متاستاز را در مدل‌های حیوانی آزمایشگاهی بدون اثرات جانبی محسوس، سمیت یا مقاومت به دارو سرکوب می‌کند. مطالعات جدید همچنین نشان داده‌اند که اندوستاتین، اعمال مختلف دیگری از قبیل تداخل با انتقال پیام‌القائه شده توسط FGF-2، مهار تحرک سلول اندوتلیال، تحریک آپوپتوز، توقف مرحله G1 در سلول‌های اندوتلیال از طریق مهار سیکلین D1، مهار پیام‌رسانی از طریق VEGF توسط برهمکنش مستقیم با گیرنده تیروزین کینازی Fik-1/KDR/VEGF-R2 در سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بند ناف و سرکوب فاکتور نکروزی محرک را نیز انجام می‌دهد. علاوه بر این‌ها، اندوستاتین سریعاً موجب افزایش بیان بسیاری از ژن‌ها در سلول‌های اندوتلیال در حال رشد، شامل ژن‌های با پاسخ فوری، ژن‌های مرتبط با چرخه سلولی، ژن‌های تنظیم‌کننده مهار آپوپتوز، MAPKs، FAKs و پروتئین G جفت‌شده با گیرنده‌های انتقال پیام رشد سلول اندوتلیال، فاکتورهای میتوژنی، مولکول‌های اتصالی و اجزای ساختار سلولی می‌شود. اخیراً نیز نشان داده شده است که اندوستاتین موجب

خوبی از مهاجرت سلول اندوتلیال و تشکیل لوله به روش وابسته به دوز ممانعت می‌کند. کانستاتین از تکثیر سلول اندوتلیال انسان تحریک شده توسط سرم نیز جلوگیری کرده و آپوپتوز را بدون هیچ اثر مهاری بر روی تکثیر یا آپوپتوز سلول‌های غیراندوتلیال فعال می‌کند. کانستاتین همچنین موجب تحریک بیان لیگاند Fas (L) شده و با برش پروکاسپازهای 8 و 9 موجب فعال شدن آن‌ها می‌شود. این مهارکننده همچنین سبب کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری شده و مرگ سلولی را افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد که آپوپتوز تحریک‌شده توسط کانستاتین، از طریق مهار فسفاتیدیل اینوزیتول 3-کیناز Akt / (PI3K) بوده و وابسته به وقایع پیام‌رسانی هدایت‌شده از طریق گیرنده‌های مرگ غشاء باشد. با وجودی که گیرنده‌های عملکردی برای این مولکول هنوز شناسایی نشده‌اند، اما احتمال می‌رود که آن‌ها از طریق اینتگرین‌های سطح سلولی عمل کنند. علاوه بر دومن‌های NC1 مربوط به زنجیره‌های  $\alpha 1$ ،  $\alpha 2$  و  $\alpha 3$  کلاژن نوع چهارم، زنجیره  $\alpha 6$  دارای فعالیت آنتی‌آنژیوژنیک بوده و رشد تومور را مهار می‌کند. در واقع، دومن محلول زنجیره  $\alpha 6$  اتصال و مهاجرت سلول اندوتلیال را تنظیم می‌کند (25).

### اندورپلین (Endorepellin)

پرلکان (Perlecan) یک پروتئوگلیکان هپاران سولفات غشای پایه است که نقش‌های کلیدی در رشد عروق ایفا می‌کند. انتهای کربوکسیل پرلکان که اندورپلین یا دومن 5 پرلکان نامیده می‌شود، آنژیوژنز را از طریق مکانیسم‌های گوناگون به‌خوبی مهار می‌ند. از جمله این مکانیسم‌ها، ممانعت از مهاجرت سلول اندوتلیال و تشکیل ساختار لوله‌ای تحریک‌شده توسط کلاژن، مهار رشد رگ خونی در آزمایشات غشاء کوریوآلاتوئیک و جلوگیری از اتصال سلول اندوتلیال به فیبرونکتین و کلاژن نوع اول بدون اتصال مستقیم به پروتئین‌های ماتریکس مذکور می‌باشد. علاوه بر این، اندورپلین به اندوستاتین، که

شماره 5 نیز خودش به تنهایی دارای فعالیت آنتی آنژیوژنیک است. آنژیواستاتین، تکثیر سلول اندوتلیال و مهاجرت آن را مهار می‌کند. از جمله اهداف عمل آنژیواستاتین، اتصال مستقیم به آنزیم سنتتاز موجود بر روی سطح سلول‌های اندوتلیال است. این عمل ممکن است منجر به کاهش و سقوط pH درون سلولی شده و به همین دلیل باعث رخ دادن وقایع آپوپتوزی در سلول‌های اندوتلیال شود. علاوه بر این، نشان داده شده است که هم آنژیواستاتین و هم پلاسمین به طور اختصاصی به اینتگرین  $\alpha v\beta 3$  متصل می‌شوند. آنژیواستاتین به طور ویژه‌ای از مهاجرت سلولی القاء شده توسط پلاسمین ممانعت می‌کند. این موضوع پیشنهاد می‌کند که اتصال پلاسمین به اینتگرین  $\alpha v\beta 3$  برای فعالیت آن ضروری است و آنژیواستاتین ممکن است با چنین فعالیتی مداخله کند (30).

### آنتی ترومبین برش خورده 3 و پروترومبین کرینگل 2

به نظر می‌رسد که فاکتورهای انعقادی در حال گردش در خون، نقش مهمی در آنژیوژنز ایفا می‌نمایند. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که علاوه بر آنژیواستاتین، ترومبوسپوندين‌ها، فاکتور پلاکتی 4 (PF-4)، آنتی ترومبین 2 و پروترومبین کرینگل 2 که دارای ویژگی‌های آنتی آنژیوژنیک می‌باشند، در خون وجود دارند. برش حلقه انتهای کربوکسیل آنتی ترومبین، با ایجاد تغییر کنفورماسیونی در مولکول به آن خواص قوی آنتی آنژیوژنیک و ضدتوموری می‌دهد. در این زمینه، مطالعات همچنین نشان داده‌اند که دومن پروترومبین کرینگل 2 نیز از تکثیر سلول‌های اندوتلیال ممانعت می‌کند (31).

### کندرومدولین یک Chondromodulin-I

گرچه غضروف حاوی بسیاری از فاکتورهای محرک آنژیوژنز (آنژیوژنیک) در طی استخوانی شدن است، ولی در افراد بالغ یک بافت بدون عروق محسوب می‌شود.

افزایش بیان بسیاری از ژن‌های مهارکننده آنژیوژنز شده و همچنین مکانیسم‌های پیام‌رسانی را که مرتبط با آنژیوژنز نیستند، تحت تأثیر خود قرار می‌دهد. این مولکول به اینتگرین  $\alpha\beta$  متصل شده و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال را توسط بلوکه کردن مسیرهای پیام‌رسانی وابسته به Ras و Raf مهار می‌کند. علاوه بر این، مطالعات جدیدتر نشان می‌دهند که عمل اندوستاتین وابسته به بیان سلکتین-E موجود بر روی سلول‌های اندوتلیال بوده، گرچه اتصال مستقیم اندوستاتین به این سلکتین مشاهده نشده است. به نظر می‌رسد فعالیت آنتی آنژیوژنیک اندوستاتین وابسته به برهمکنش با پروتئوگلیکان‌های هیپران سولفات از طریق برهمکنش بین دومن‌های مجزای سولفات در پروتئوگلیکان‌های هیپران سولفات و خوشه‌های آرژینین در سطح اندوستاتین باشد. اخیراً یک موتیف شامل توالی ویژه غنی از آرژینین متعلق به مولکول اندوستاتین انسانی، که به احتمال زیاد مسئول فعالیت آنتی آنژیوژنیک آن است، شناسایی شده که با اینتگرین  $\beta 1$  برهمکنش کرده و از مهاجرت سلول اندوتلیال و تشکیل لوله ممانعت می‌کند. علاوه بر این‌ها، این مولکول از فعال‌سازی و فعالیت متالوپروتئینازهای ماتریکس 2، 9 و 13 و همچنین MT1-MMP به جز MMP-8 از طریق اتصال به آن‌ها جلوگیری کرده و با اعمال دیگر پروتئازها مانند سیستم فعال‌کننده پلاسمینوژن نیز تداخل می‌کند (28 و 29).

### مهارکننده‌های آنژیوژنز مشتق از منابع غیرماتریکسی آنژیواستاتین (Angiostatin)

پلاسمینوژن حاوی پنج کرینگل (kringle) است. برش این آنزیم توسط پروتئازها منجر به تشکیل پپتیدهای ضد آنژیوژنز 38-45 کیلو دالتونی می‌شود که حاوی دومن‌های کرینگلی با پل‌های سولفیدی سه‌تایی همانند کرینگل 1 تا 4 یا کرینگل 1 تا 3 می‌شود و در مجموع آنژیواستاتین نامیده می‌شوند. برخی مطالعات نشان داده‌اند که کرینگل

اندوتلیال از طریق ممانعت از فعالیت کلاژناز می‌گردند زیرا تجزیه و حل شدن کلاژن مهم‌ترین قدم در رخداد آنژیوژنز است. هر چند که قطعات مجزای اسید هیالورونیک دارای اثرات آنژیوژنیک هستند اما این اسید با وزن مولکولی بالا در مدل Chick embryo limb bud از آنژیوژنز ممانعت می‌کند و موجب تمایز و رشد عروق، بیشتر از طریق افزایش فعالیت هیالورونیداز بافتی می‌شود. همچنین اسید هیالورونیک می‌تواند سرعت رشد و نمو مویرگ‌های تازه تشکیل‌شده را در اطراف محل‌هایی که به‌صورت زیر جلدی قرار گرفته‌اند، افزایش دهد (34).

#### راه‌های مداخله در آنژیوژنز

تاکنون، استراتژی‌های وسیعی توسط دانشمندان جهت مداخله در آنژیوژنز تعریف و ارائه شده و مورد توجه محققان و پزشکان بسیاری قرار گرفته است. از آنجایی‌که، آنژیوژنز اساساً وابسته به فعال شدن تکثیر، اتصال، مهاجرت و بلوغ سلول اندوتلیال است، بنابراین اکثر رویکردها برای تعدیل آنژیوژنز، بر اعمال سلول‌های اندوتلیال در طی تشکیل رگ خونی متمرکز شده است (35 و 36).

#### مداخله در رشد سلول اندوتلیال

تا به امروز، موفق‌ترین استراتژی برای مهار آنژیوژنز، استفاده از عواملی بوده است که به‌طور اختصاصی از رشد سلول‌های اندوتلیال ممانعت می‌نمایند. یکی از اولین ترکیباتی که برای نشان دادن اثرات مهار بر روی رشد سلول‌ها مخصوصاً سلول‌های اندوتلیال مورد استفاده قرار گرفت، ترکیب O- کلرواستیل کرپامیل فوماژیلول (O-chloroacetyl carbamoyl fumagillol) یا AGM-470 (1470/TNP- بود. این ترکیب یک آنالوگ آنتی‌بیوتیک مشتق از قارچ فوماژیلین است. طی سال‌های بعد، چندین مولکول درون‌زا با فعالیت مهار آنژیوژنز شناسایی شدند. از بین این مولکول‌ها، می‌توان از ترومبوسپوندین -

پروتئین 25 کیلودالتونی ماتریکس NC1 اختصاصی غضروف کندرومدولین یک، دارای خواص مهارکنندگی آنژیوژنز است. تجویز موضعی کندرومدولین I انسانی تا حد زیادی سبب توقف و مهار تهاجم عروقی و رشد تومور در شرایط in vivo شده و علاوه بر این، از رشد آدنوکارسینومای کولون در شرایط in vivo جلوگیری می‌کند که این خود دلالت بر پتانسیل درمانی آن برای تومورهای توپر دارد (32).

#### تیروزین کیناز یک شبیه Fms محلول Soluble (sFlt-1) Fms-like tyrosine kinase 1

نسخه محلول VEGFR-1 (تیروزین کیناز یک محلول شبه Fms یا sFlt-1) توسط کندال (Kendall) و همکارانش شناسایی گردید. sFlt-1 تمایل قوی برای VEGF و فاکتور رشد جفتی دارد. مطالعات انسانی نشان داده‌اند که VEGF می‌تواند به‌صورت اتصال به sFlt-1 و یا در حالت آزاد و بسته به مقدار sFlt-1 در جریان خون گردش کند. بنابراین، امکان استفاده از مولکول sFlt-1 به‌عنوان یک عامل ضد توموری مهار کننده VEGF وجود دارد (33).

#### اینترفرون‌ها Interferons

اینترفرون‌ها (IFNs)، سایتوکاین‌هایی با اثرات چندگانه یا پلی‌تروپیک بوده و از جمله اولین عوامل تنظیم‌کننده درون‌زای شناخته‌شده با خواص آنتی‌آنژیوژنیک هستند که پاسخ‌های ضد ویروسی، ضد توموری، آپوپتوزی و پاسخ‌های ایمنی سلولی را نیز تنظیم می‌کنند. مطالعه اثر سایتوکاین‌ها بر آنژیوژنز القاء‌شده توسط سلول‌های توموری موش حاکی از اثبات عمل ممانعت‌کنندگی آن‌هاست. مطالعات همچنین نشان داده‌اند که IFN- $\alpha$  یا IFN- $\beta$  فعالیت بیولوژیکی بر ضد کارسینوماهای سلول اسکواموس داشته و از آنژیوژنز در موش‌های nude توموردار جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، محققان نشان داده‌اند که فاکتورهای مشتق‌شده از غضروف نیز سبب مهار تکثیر و مهاجرت سلول‌های



trypsin inhibitor) از دانه سویا (44)، مطالعه خواص و مکانیسم‌های ضد رگ‌زایی گیاه موسیر (45 و 46) و گیاه مریم گلی (47)، همچنین مطالعه اثر ضد آنژیوژنز چای سبز (48) و عصاره موم عسل (49) شده‌اند.

### نتیجه‌گیری و بحث

با توجه به این‌که امروزه افزایش مقاومت سرطان‌ها نسبت به درمان‌های رایج، مسأله دردساز شده است، تلاش‌ها برای کشف و شناسایی عوامل ضد سرطانی جدید که موجب افزایش میزان حساسیت سلول‌های سرطانی گردند، رو به افزایش است. مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به داروهای شیمیایی منجر به کاهش سطح پاسخ این سلول‌ها نسبت به دارو و در نتیجه شکست اقدامات درمانی می‌گردد. بنابراین، تحقیق و توسعه داروهای مؤثرتر و یا با اثرات جانبی کم‌تر از اهمیت فزاینده‌ای برخوردار است (50). فولکمن از اولین محققانی بود که استفاده از مهار تشکیل عروق تومور را جهت درمان سرطان پیشنهاد کرد. پیشنهاد او و دیگر محققان منجر به توسعه تحقیق و بررسی کلینیکی بیش از 20 داروی متنوع شده که مراحل مختلف رگ‌زایی را مهار می‌کنند. از جمله مزایای بالقوه این نوع درمان که می‌توان ذکر کرد شامل دسترسی آسان به اهداف داخل عروقی، عدم وجود مشکل مقاومت سلول توموری در مقایسه با شیمی درمانی مرسوم بر علیه سرطان و همچنین کاربرد گسترده این نوع استراتژی برای درمان انواع بسیاری از بیماری‌های وابسته به آنژیوژنز می‌باشد. بنابراین، استراتژی مهار رگ‌زایی از این لحاظ اهمیت دارد که ممکن است سلول‌های سرطانی، مقاومت کم‌تری نسبت به درمان با این روش نشان دهند، زیرا این قضیه مستقیماً و بیشتر مربوط به استروما می‌شود نه به سلول‌های توموری که از لحاظ ژنتیکی ناپایدار هستند. طرح این ایده براساس این حقیقت است که فرایندهای به‌کار رفته توسط سلول‌های اندوتلیال در رگ‌زایی، نتیجه تغییرات ژنتیکی در فعالیت ژن سرکوب‌کننده انکوژن سلول‌های

1 (Thrombospondin-1)، فاکتور پلاکتی-4 (Platelet factor-4) و پروتئین-10 القاء‌شونده توسط اینترفرون (Interferon-inducible protein-10) نام برد. دو عضو دیگر این کلاس که به‌صورت درون‌زا تولید می‌گردند پروتئین‌های آنتی‌آنژیوژنیک آنژیواستاتین (Angiostatin) و اندوستاتین (Endostatin) هستند. راه‌کار مستقل دیگر برای مداخله در آنژیوژنز، مقابله با فاکتورهای آنژیوژنیک از قبیل VEGF یا FGF و گیرنده‌های آن‌ها است (37) و (38).

### مقابله با اتصال و مهاجرت سلول اندوتلیال

به‌دلیل این‌که فرایند آنژیوژنز همچنین وابسته به وقایع اتصال سلول اندوتلیال به ماتریکس خارج سلولی و مهاجرت این سلول‌ها از طریق آن است، پایه و اساس بسیاری از تلاش‌ها برای تحقیق در مورد عوامل مؤثر بر مهار این برهمکنش‌ها بنا نهاده شده است. اولین عضو شناخته شده این گروه از ترکیبات، سایتوکاین اینترفرون است که از مهاجرت سلول‌های اندوتلیال مویرگ ممانعت می‌کند. گرچه اینترفرون‌ها ممکن است به اندازه کافی برای درمان همه تومورها مؤثر نباشند، اما تومورهای خوش‌خیم عمدتاً دارای سلول‌های اندوتلیالی هستند که مخصوصاً به درمان با اینترفرون حساس هستند. زمانی که محققان پی بردند که سلول‌های اندوتلیال فعال‌شده موجب افزایش بیان گیرنده‌هایی جهت ترکیبات ماتریکس خارج سلولی می‌شوند، برهمکنش سلول‌های اندوتلیال با ماتریکس به‌عنوان یک هدف برای مهار آنژیوژنز انتخاب شد (39-41).

در این زمینه، محققان کشورمان نیز همچون دیگر محققان در سراسر دنیا با بهره‌گیری از مدل‌های آنژیوژنز موفق به مطالعه، شناسایی و مطالعه انواعی از ترکیبات مهارکننده آنژیوژنز همچون شناسایی پپتید ضد آنژیوژنزی از غضروف کوسه ماهی (42)، آنتی‌بادی مونوکلونال ضد پلاسمینوژن (43)، مهارکننده تریپسین کونیتز (Kunitz)

بیماری‌های مختلف از جمله انواعی از تومورها که با آنژیوژنز ارتباط تنگاتنگی داشته و به آن وابسته هستند، روش‌های مهار آنژیوژنز که به هدف تداخل با این فرآیند مهم جهت‌گیری نموده‌اند، مسیر امیدوارکننده‌ای برای درمان بیماری‌های وابسته به آنژیوژنز محسوب می‌گردند. بر این اساس، توسعه و استفاده از مدل‌های مختلف آنژیوژنز برای این منظور، بیش از پیش اهمیت پیدا می‌کند تا جایی که محققان بسیاری در سراسر جهان از مدل‌های مختلف آنژیوژنز برای مطالعه این پدیده مهم و عوامل تأثیر گذار بر آن سود می‌برند.

اندوتلیال نیستند. به عبارت دیگر، نبود مقاومت دارویی به مهارکننده‌های رگ‌زایی در فرایند ضد رگ‌زایی درمانی به احتمال فراوان به این علت است که سلول‌های اندوتلیال به‌طور ژنتیکی فعال هستند و به اشکال مقاوم به دارو جهش نمی‌یابند. گرچه این نوع درمان بسیار امیدوارکننده است، عدم مقاومت قویاً به نوع درمان آنژیواستاتیکی به‌کار رفته وابسته است (51).

با توجه به آنچه که ذکر شد و اهمیت آنژیوژنز در تحقیقات مربوط به کشف و شناسایی فاکتورهای آنژیوژنیک و عوامل مهارکننده آنژیوژنز برای درمان

## References

- Makhni E. Angiogenesis: an examination of both tumorigenic and rehabilitative properties. *J MUR* 2003; 8: 23-6.
- Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A. The history of angiogenic switch concept. *Leukemia* 2007; 21(1): 44-52.
- Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* 2003; 3(7): 643-51.
- Heidenreich R, R?cken M, Ghoreschi K. Angiogenesis: the new potential target for the therapy of psoriasis? *Drug News Perspect* 2008; 21(2): 97-105.
- Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Vasculogenic mimicry and tumor-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 411-21.
- Noonan DM, Benelli R, Albin A. Angiogenesis and cancer prevention: a vision. *Recent Results Cancer Res* 2007; 174: 219-24.
- Mansouri K, Mostafaei A, Mirshahi M, Mohammadi Motlagh HR, Maleki A, Keshavarz M. Human coagulated plasma as a natural and low cost matrix for in vitro Angiogenesis. *Iran Biomed J* 2009; 13(3): 179-83.
- Mansouri K, Sheikh Aleslami A, Bahrami GH, Mostafaei A. [Isolation of human umbilical vein endothelial cells and development of an angiogenesis model in fibrin matrix (Persian)]. *J Zanjan Univ Med Sci & Health Serv* 2006; 14(55): 17-23.
- Mansouri K, Mirshahi M, Pourfathelah AA, Hasan ZM. [Development of an experimental model of angiogenesis in 3-dimensional fibrin matrix for screening of angiogenesis agents (Persian)]. *Behbood Journal* 2005; 9 (3): 27-35.
- Vailhé B, Vittet D, Feige JJ. In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 2001; 81(4): 439-52.
- Griggs J, Metcalfe JC, Hesketh R. Targeting tumour vasculature: the development of combretastatin A4. *Lancet Oncol* 2001; 2(2): 82-7.
- Foa R, Norton L, Seidman AD. Taxol (paclitaxel): a novel anti-microtubule agent with remarkable anti-neoplastic activity. *Int J Clin Lab Res* 1994; 24(1): 6-14.
- Kruger EA, Duray PH, Price DK, Pluda JM, Figg WD. Approaches to preclinical screening of antiangiogenic agents. *Semin Oncol* 2001; 28(6): 570-6.
- Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 358(19): 2039-49.
- Tortora G, Melisi D, Ciardiello F. Angiogenesis: A target for cancer therapy. *Curr Pharm Design* 2004; 10: 11-26.
- Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 1996; 32: 2451-60.
- Makrilia N, Lappa T, Xyla V, Nikolaidis I, Syrigos K. Role of angiogenesis in solid tumours: an overview. *Eur. J. Int. Med.* 2009; 20: 663-71.
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-34.
- Folkman J. Angiogenesis. *Ann Rev Med* 2006; 57: 1-18.
- Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition. *An Overview EXS* 1997; 79: 1-8.
- Ruhberg C. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *J Cell Sci* 2001; 14: 3215-16.
- Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* 2005; 65: 3967-79.
- Kampa GD, Colorado PC, Panka DJ, et al. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem* 2000; 275 (2): 1209-15.

24. Mongiat M, Sweeney SM, San Antonio JD, Iozzo RV. Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *J Biol Chem* 2003; 278 (6): 4238-49.
25. Bix G, Castello R, Burrows M, Zoeller JJ, Weech M, Iozzo RA, et al. Endorepellin in vivo: targeting the tumor vasculature and retarding cancer growth and metabolism. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98 (22): 1634-46.
26. Zheng MJ. Endostatin derivative angiogenesis inhibitors. *Chin Med J* 2009; 122(16): 1947-51.
27. Ribatti D. Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. *Lewk Res* 2009; 33 (5): 638-44.
28. Le TY, Muschal S, Parvda EA, Folkman J, Abdollahi A, Javaherian K. Angiostatin regulates the expression of antiangiogenic and proapoptotic pathways via targeted inhibition of mitochondrial proteins. *Blood* 2009; 114(9): 1727-8.
29. Larsson H, Akerud P, Nordling K, Raub-Segall E, Claesson-Welsh L, Björk I. A novel anti-angiogenic from antithrombin with retained proteinase binding ability and heparin affinity. *J Biol Chem* 2001; 267 (15): 1196-2002.
30. Shukunami C, Hiraki Y. Role of cartilage-derived anti-angiogenic factor, chondromodulin-1, during endochondral bone formation. *Osteoarthr Cartilage* 2001; 9: S91-S101.
31. Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors. *Blood Cells, Molecules, Disease J* 2007; 38: 258-68.
32. Albin A, Marchisone C, Del Grosso F, Benelli R, Masiello L, Tacchetti C, et al. Inhibition of angiogenesis and vascular tumor growth by interferon-producing cells, a gene therapy approach. *Am J Pathol* 2000; 156(4): 1381-93.
33. Vernon RB, Sage EH. Between molecules and morphology. Extracellular matrix and creation of vascular form. *Am J Pathol* 1995; 147: 873-83.
34. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New Engl J Med*. 1971; 285 (21): 1182-6.
35. Madri JA, Williams SK. Capillary endothelial cell cultures: Phenotypic modulation by matrix components. *J Cell Biol* 1983; 97: 153-65.
36. Ingber DE, Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: Role of extracellular matrix. *J Cell Biol* 1989b; 109: 317-30.
37. DiPietro LA, Nebgen DR, Polverini PJ. Downregulation of endothelial cell thrombospondin 1 enhances in vitro angiogenesis. *J Vasc Res* 1994; 31: 178-85.
38. Quesada AR, Muñoz-Chapuli R, Medina MA. Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials. *Med Res Rev* 2006; 26: 483-530.
39. Trochon V, Li H, Vasse M, Franken F, Thomaidis A, Soria J, et al. Endothelial metalloprotease-disintegrin protein (ADAM) is implicated in angiogenesis in vitro. *Angiogenesis* 1998; 2: 277-85.
40. Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, Vassalli JD. Angiogenesis: A paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein* 1996; 49: 138-62.
41. Kruger EA, Duray PH, Price DK, Pluda JM, Figg WD. Approaches to preclinical screening of antiangiogenic agents. *Semin Oncol* 2001; 28: 570-6.
42. 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; 4(3): 961-70.
43. Mansouri K, Maleki A, Mirshahi M, Pourfathelah AA, Hasan ZM, Taheripak R. Anti-plasminogen monoclonal antibody (MC2B8) inhibits angiogenesis. *Pak J Biol Sci* 2007; 10 (19): 3450-3.
44. Shakiba Y, Mansouri K, Mostafaie A. Anti-angiogenic effect of soybean kunitz trypsin inhibitor on human umbilical vein endothelial cells. *Fitoterapia* 2007; 78: 587-9.
45. 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 (Persian)]. *Yakhteh Med J* 2009; 11(2): 184-9.
46. Mohammadi Motlagh HR. [The study of anti-angiogenic effects of shallot (*Allium hirtifolium*) extract and isolation of effective fraction (Persian)]. MS.c Thesis. Tabriz: Azarbayjan Univ Tarbiat Moallem 2008.
47. Keshevarz M. [The study of anti-angiogenic effect of *Salvia officinalis* on human umbilical vein endothelial cells (Persian)]. MS.c Thesis. Kermanshah: Razi University, 2009.
48. Shakiba Y, Mostafaie A. Inhibition of corneal neovascularization with a nutrient mixture containing Lysine, Proline, ascorbic acid, and green tea extract. *Arch Med Res* 2007; 38: 789-91.
49. Keshavarz M, Mostafaie A, Mansouri K, Shakiba Y, Mohammadi Motlagh HR. Inhibition of corneal neovascularization with Propolis Extract. *Arch Med Res* 2009; 40: 59-61.
50. Kummalue T. Molecular Mechanism of Herbs in Human Lung Cancer Cells, *J. Med Assoc Thai* 2005; 88(11): 1725-34.
51. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997; 390: 404-7.