

اثرات توأم آتورواستاتین و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم بر آنژیوژن در پرده کوریوآلاتوئیک جوجه

جواد بهارآرا^۱، سعیده ظفر بالائزاد^۲، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی^۳، زهرا حسامی^۴

چکیده

زمینه و هدف: استاتین‌ها باعث تکثیر و تمایز سلول‌های اندوتیلیابی و رگ‌زایی می‌شود. میدان الکترومغناطیسی نیز بر فرایند رگ‌زایی مؤثر است. در پژوهش حاضر اثرات توأم آتورواستاتین با میدان الکترومغناطیسی دارای فرکانس کم و شدت ۵۰ گاوس بر آنژیوژن در پرده کوریوآلاتوئیک جوجه بررسی شد.

روش تحقیق: ۹۸ عدد تخم مرغ نطفه‌دار در ۷ گروه مساوی توزیع شد. این گروه‌ها شامل گروه شاهد و گروه‌های تحریبی (۱) شاهد آزمایشگاهی، (۲) تیمار با آتورواستاتین $\mu\text{m}/۰.۱$ ، (۳) تیمار با آتورواستاتین $\mu\text{m}/۱۰$ ، (۴) تیمار با میدان الکترومغناطیسی، (۵) تیمار توأم آتورواستاتین $\mu\text{m}/۰.۱$ و میدان الکترومغناطیسی و (۶) تیمار توأم آتورواستاتین $\mu\text{m}/۱۰$ و میدان الکترومغناطیسی بود. در روز هشتم انکوباسیون یک اسفنج ژلاتینی روی پرده کوریوآلاتوئیک قرار گرفت که در گروه‌های ۲ و ۵ با ۱ mL محلول آتورواستاتین $\mu\text{m}/۰.۱$ و در گروه ۳ و ۶ با ۱ mL محلول آتورواستاتین $\mu\text{m}/۱۰$ آغشته گردید. در روز دهم، تخم مرغ‌های گروه ۴، ۵ و ۶ به مدت ۴ ساعت در میدان الکترومغناطیسی قرار گرفتند. در روز دوازدهم انکوباسیون تعداد و طول انشعبات عروقی در تمام نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. اطلاعات بدست آمده به کمک نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۶) توسط آزمون‌های ANOVA و Tukey در سطح 0.05 $P <$ تحلیل گردید.

یافته‌ها: میانگین تعداد و طول انشعبات عروقی در نمونه‌های شاهد و شاهد آزمایشگاهی اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). میانگین تعداد و طول انشعبات عروقی گروه تیمار با آتورواستاتین $\mu\text{m}/۰.۱$ در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار و گروه‌های ۳ و ۶ در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($P = 0.000$). میانگین طول انشعبات عروقی گروه ۴ در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($P = 0.001$).

نتیجه‌گیری: کاربرد توأم آتورواستاتین با غلظت $\mu\text{m}/۱۰$ و میدان الکترومغناطیسی بر آنژیوژن دارای اثر مهاری است. همچنین میدان الکترومغناطیسی می‌تواند اثر آنژیوژنیک ناشی از تیمار با آتورواستاتین $\mu\text{m}/۰.۱$ را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: آنژیوژن، آتورواستاتین، میدان الکترومغناطیسی، جوجه

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی پیرجند. ۱۳۹۱؛ ۱۹(۲): ۱۴۸-۱۵۶

دربافت: ۱۳۹۰/۰۶/۰۴ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۳/۲۳

^۱ نویسنده مسؤول، دانشیار، دکترای تخصصی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران
آدرس: مشهد- قاسم‌آباد- امامیه ۴۲- سازمان مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد- حوزه معاونت پژوهش و فناوری

تلفن: ۰۵۱۱- ۶۴۲۲۳۱۳۷- ۰۵۱۱- ۶۴۲۲۱۰۸۳. پست الکترونیکی: baharara@yahoo.com

^۲ مری، دکترای تخصصی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران

^۳ استادیار، دکترای تخصصی ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران

^۴ کارشناسی ارشد ریست‌شناسی سلوی تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران

مقدمه

می باشد (۸). گزارش های مختلفی از اثرات میدان های الکترومغناطیسی و بررسی ارتباط آن با وضعیت های پاتولوژیک ارایه شده است. در آن ها نوع میدان، شدت آن، مدت زمان در معرض قرار گیری و به نظر برخی محققین محتوى ژئی نمونه تیمار شده در نتایج این آزمایش ها مؤثر نشان داده شده است (۹).

در همین راستا نتیجه برخی پژوهش ها نشان داد که قرار گرفتن در معرض میدان های الکترومغناطیسی همیشه با ایجاد اثرهای منفی در بدن موجود زنده همراه نیست. این اثرها بسته به وضعیت بیولوژیک سلول مورد مطالعه، هدایت بافتی و شعاع سطحی که جریان از آن عبور می کند، می تواند به صورت مهار کننده یا فعال کننده عمل کند (۱۰). تغییر در بیان ژن، کنش متقابل و ارتباط های سلولی از جمله مواردی هستند که تحت تأثیر میدان های الکترومغناطیسی قرار می گیرند و باعث اختلال آنژیوژن می شوند (۱۱). گزارشی که از اثر میدان های الکترومغناطیسی بر آنژیوژن در پرده کوریوآلتوئیک جوچه منتشر شد، بیانگر اثر مهاری میدان های الکترومغناطیس باشد (۱۲). تسلسل بر آنژیوژن است (۱۲). پژوهش حاضر تلاش برای رسیدن به پاسخ این سؤال می باشد که آیا به کارگیری میدان الکترومغناطیسی به صورت توأم با آتورواستاتین با غلظت های متفاوت اثر شدیدی بر آنژیوژن دارد یا مهار کننده آنژیوژن می باشد؟ در این پژوهش اثر توأم میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم و شدت ۵۰ گاوس با داروی آتورواستاتین با غلظت های ۱۰ میکرومول و ۰/۱ میکرومول بر آنژیوژن در پرده کوریوآلتوئیک جوچه بررسی شد.

روش تحقیق

این پژوهش تجربی در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست شناسی تکوین جانوری گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در سال ۱۳۸۹-۹۰ انجام شد. جهت انجام تحقیق ها از تخم مرغ های نطفه دار نژاد Ross که از شرکت

آنژیوژن به فرایند بیولوژیکی جوانه زدن رگ های جدید از رگ های موجود در بافت اطلاق می شود (۱). آنژیوژن فیزیولوژیک، فرایندی به شدت تنظیم شده است که در مواردی مانند ترمیم زخم، سیکل های قاعدگی، رشد جفت، لانه گزینی جنین و تخمک گذاری اتفاق می افتد. در حالی که آنژیوژن پاتوفیزیولوژیک که اشاره به تکثیر غیر قابل کنترل اندوتیلیوم مویرگی دارد، در بیماری هایی مانند رتینوپاتی دیابتی، آترواسکلروز، رشد و متاستاز تومورها دیده می شود (۲). در حالت سلامت آنژیوژن به وسیله تعادل بین فاکتورهای آنژیوژنیک و آنتی آنژیوژنیک تنظیم می گردد. زمانی که مقدار فاکتورهای رشد آنژیوژنیک بیشتر از مهار کننده های آنژیوژن باشد، تعادل به سمت رشد رگ های جدید جایجا می شود (۳). از مهم ترین فاکتورهای آنژیوژنیک می توان از فاکتور رشد اندوتیلیال عروقی (VEGF) یا Fibroblast growth factor (Fibroblast growth factor)، فاکتور رشد مشتق از پلاکت ها و آنژیوپویتین نام برد. این فاکتورها پروتئینی هستند و به رسپتورهای اختصاصی در سطح غشای سلولی متصل می شوند (۴).

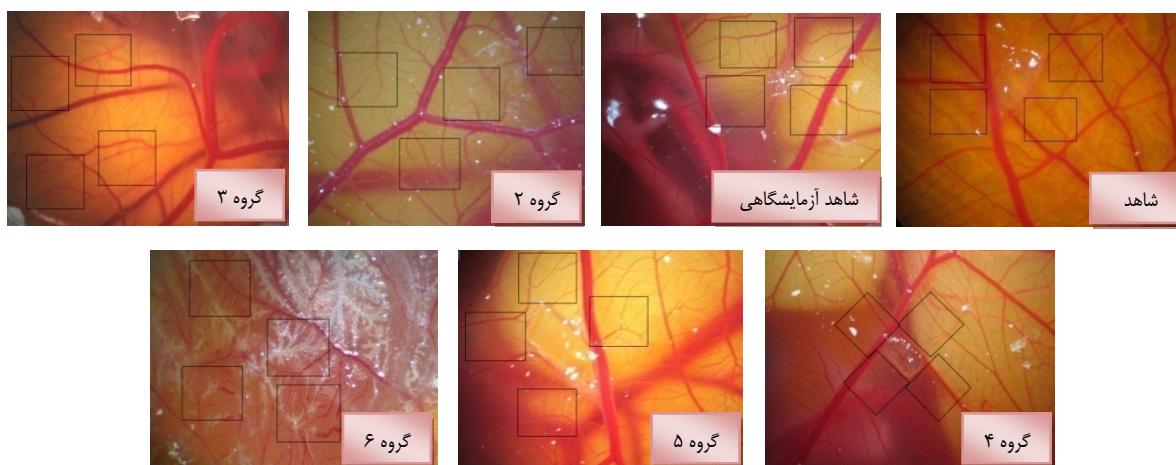
از جمله ترکیبات دارویی که تأثیرات آن ها بر فرایند رگ زایی مورد بررسی قرار گرفته است، استاتین ها می باشد. دسته دارویی مهار کننده آنژیم ۳ - هیدروکسی ۳ - متیل گلوتاریل کوآنژیم A ردوكتاز که به استاتین ها معروف هستند، به طور وسیعی جهت درمان افزایش کلسترول خون مورد استفاده قرار می گیرند (۵). تحقیق ها نشان دادند که استاتین ها علاوه بر اثرات کاهش دهنده سطح چربی خون دارای تأثیرات وسیعی بر فرایند التهاب و رگ زایی می باشند (۶). Walter و همکاران بیان کردند که استاتین ها باعث حرکت و تمایز سلول های اجدادی اندوتیلیال مشتق شده از مغز استخوان می شوند که رگ زایی و ایجاد پوشش اندوتیالی مجدد را سبب می شود (۷). Vincent و همکاران بیان کردند که استاتین ها قادر به کاهش تکثیر سلول های اندوتیلیال و مهاجرت آن ها

کوریوآلانتوئیک جوجه‌ها یک اسفنج ژلاتینی به ابعاد $10 \times 4 \times 4$ میلی‌متر قرار داده شد. این اسفنج مرکب از آلبومین سفیده تخمر غر و محلول آگار در نرمال سالین به نسبت مساوی بود که به صورت تازه در شرایط استریل تهیه می‌شد. در نمونه‌های تیمار گروههای تجربی ۲ و ۵ مقدار $10 \mu\text{L}$ آتورواستاتین $\mu\text{m} / ۱۰$ و در نمونه‌های گروههای ۳ و ۶ مقدار $10 \mu\text{L}$ محلول آتورواستاتین $\mu\text{m} / ۱۰$ به اسفنج ژلاتینی گروههای تیمار شده افزوده شد. سپس بار دیگر محل پنجره‌ها پوشانده شد و تخمر غر به انکوباتور برگردانده شد.

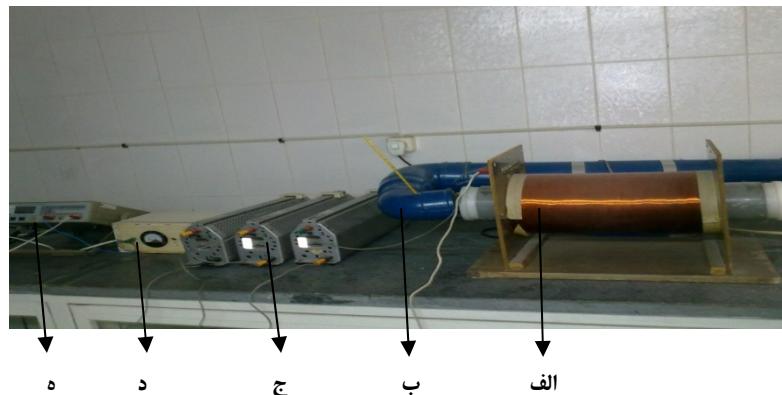
تشکیل پرده کوریوآلانتوئیک از روز پنجم انکوباسیون شروع می‌شود و در روز هشتم بیش از نیمی از وسعت درون تخمر غرها را اشغال می‌کند. در این روز قلب کاملاً تشکیل شده است و جدایی خون سیاهرگی و سرخرگی اتفاق افتاده است. از این روز تیمار شبکه عروقی در روز هشتم انکوباسیون Ruggiero می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. با توجه به گزارش Ruggiero و همکاران، روز هشتم برای تیمار با آتورواستاتین (۱۰ و $۱ / ۰$ میکرومول)، روز دهم برای تیمار با میدان الکترومغناطیسی (۵۰ گاوس) و روز دوازدهم برای تهیه عکس و اندازه‌گیری انتخاب شد (۱۲).

مرغداران طوس مشهد تهیه شده بود، به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده شد. تعداد ۹۸ عدد تخمر غر نطفه‌دار به ۷ گروه مساوی به صورت تصادفی تقسیم شد. این گروه‌ها در گروه شاهد و گروههای تجربی ۱. شاهد آزمایشگاهی، ۲. تیمار با آتورواستاتین $\mu\text{m} / ۱۰$ ، ۳. تیمار با آتورواستاتین $\mu\text{m} / ۱۰$ ، ۴. تیمار با میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم و شدت ۵۰ گاوس، ۵. تیمار توأم آتورواستاتین $\mu\text{m} / ۱۰$ و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم (۵۰ گاوس) و ۶. تیمار توأم با آتورواستاتین $\mu\text{m} / ۱۰$ و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم (۵۰ گاوس) قرار گرفتند.

تخمر غرها در دستگاه جوجه‌کشی در دمای $38 / ۵$ درجه سانتی‌گراد و رطوبت $۵۵-۶۵$ درصد (دستگاه جوجه‌کشی تحقیقاتی ۵۸ خانه ساخت هلند) قرار گرفتند. در روز دوم انکوباسیون در شرایط کاملاً استریل ایجاد شده توسط هودلامینار (Telstroa ۷-۱۰۰ Spain)، بخشی از پوسته تخمر غرها برداشته شد و توسط لامل و پارافین استریل پنجره‌ای روی یک طرف تخمر غرها ایجاد گردید. سپس تخمر غرها به انکوباتور برگردانده شد. روز هشتم انکوباسیون، پنجره‌ها در شرایط استریل برداشته شد. روی پرده



شکل ۱- گروه شاهد، گروههای تجربی ۱) شاهد آزمایشگاهی، ۲) تیمار با آتورواستاتین با غلظت $\mu\text{m} / ۱۰$ که افزایش تعداد و طول انشعابات عروقی در اطراف اسفنج ژلاتینی مشاهده می‌شود، ۳) تیمار آتورواستاتین با غلظت $\mu\text{m} / ۱۰$ و میدان الکترومغناطیسی ۵۰ گاوس، ۴) تیمار توأم آتورواستاتین با غلظت $\mu\text{m} / ۱۰$ و میدان الکترومغناطیسی ۵۰ گاوس، ۵) تیمار توأم با آتورواستاتین با غلظت $\mu\text{m} / ۱۰$ و میدان الکترومغناطیسی ۵۰ گاوس. در گروههای ۳، ۴ و ۶ کاهش تعداد و طول انشعابات عروقی در اطراف اسفنج ژلاتینی مشاهده می‌شود.



شکل ۲- دستگاه مولد میدان الکترومغناطیسی:

الف) سیم پیچ مولد میدان، ب) سیستم انکوباسیون، ج) رئوستا، د) خازن، ۵) آمپر متر

آزمون های ANOVA و تعقیبی Tukey در سطح ($P < 0.05$) برای تأمین میدان الکترومغناطیسی به همراه شرایط مناسب انکوباسیون از یک سیستم ویژه که در مطالعه قبلی طراحی و ساخته شده بود، استفاده گردید. این سیستم مولد میدان الکترومغناطیسی از یک سیم پیچ مسی که توسط جریان برق متناوب شهری تغذیه می کند، تشکیل شده است. سیم پیچ در مسیر جریان برق شهری با فرکانس ۵۰ هرتز و ولتاژ ۲۲۰ ولت سه رئوستا قرار دارد که شدت جریان برق ورودی به سیم پیچ توسط آنها تنظیم می گردد. این سیم پیچ قادر به تأمین شدت میدان الکترومغناطیسی بین ۱۰ تا ۴۰۰ گاوس می باشد. شدت میدان الکترومغناطیس با گاوس متر کالیبره و شرایط دما و رطوبت به کمک یک سیستم انکوباسیون مشابه دستگاه جوجه کشی معمولی تأمین شد (شکل ۲). روز دوازدهم آنکوباسیون از تمام نمونه های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تیمارهای پنج گانه از محدوده محل قرارگیری اسفنج ژلاتینی به کمک فوتواستر ئومیکروسکوپ تحقیقاتی (Ziess, Germany) تصاویری با درشت نمایی $4 \times 10 \times 1/6$ تهیه شد. داده های مورد بررسی شامل تعداد و طول انشعبات عروقی بود که در سطح مقطع یکسانی در ۴ طرف اصلاح اسفنج ژلاتینی با نرم افزار Image J در یک مونیتور ۱۵ اینچ برای تمام نمونه ها اندازه گیری شد.

داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۶) و نشان داد ($P = 0.001$) (نمودارهای ۱ و ۲).

یافته ها

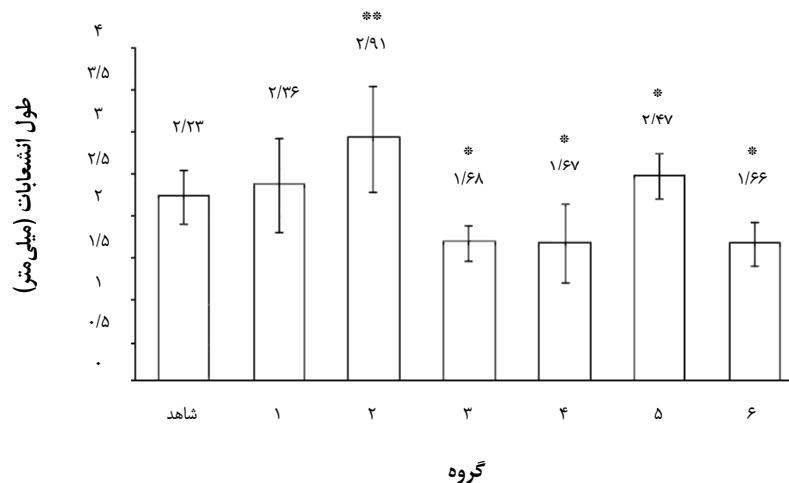
میانگین تعداد ($5/494 \pm 50/71$) و طول (0.840 ± 0.023 mm) انشعبات عروقی گروه شاهد نسبت به میانگین تعداد ($49/64 \pm 5/58$) و طول (0.149 ± 0.036 mm) انشعبات عروقی شاهد آزمایشگاهی اختلاف معنی داری نشان نداد ($P > 0.05$). میانگین تعداد ($9/257 \pm 9/07$) و طول (0.179 ± 0.091 mm) انشعبات عروقی در گروه ۲ نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری نشان داد ($P = 0.001$). میانگین تعداد ($1/636 \pm 1/636$) و طول (0.055 ± 0.055 mm) انشعبات عروقی در گروه ۳ نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری نشان داد ($P = 0.001$). میانگین طول (0.124 ± 0.076 mm) انشعبات عروقی در گروه ۴ نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری نشان داد ($P = 0.001$). میانگین تعداد ($3/832 \pm 55/36$) انشعبات عروقی در گروه ۵ نسبت به شاهد اختلاف معنی داری نشان نداد ($P > 0.05$). میانگین تعداد (0.677 ± 0.271) و طول (0.170 ± 0.170 mm) انشعبات عروقی در گروه ۶ نسبت به شاهد کاهش معنی داری نشان داد ($P = 0.001$) (نمودارهای ۱ و ۲).

برای تأمین میدان الکترومغناطیسی به همراه شرایط مناسب انکوباسیون از یک سیستم ویژه که در مطالعه قبلی طراحی و ساخته شده بود، استفاده گردید. این سیستم مولد میدان الکترومغناطیسی از یک سیم پیچ مسی که توسط جریان برق متناوب شهری تغذیه می کند، تشکیل شده است. سیم پیچ در مسیر جریان برق شهری با فرکانس ۵۰ هرتز و ولتاژ ۲۲۰ ولت سه رئوستا قرار دارد که شدت جریان برق ورودی به سیم پیچ توسط آنها تنظیم می گردد. این سیم پیچ قادر به تأمین شدت میدان الکترومغناطیسی بین ۱۰ تا ۴۰۰ گاوس می باشد. شدت میدان الکترومغناطیس با گاوس متر کالیبره و شرایط دما و رطوبت به کمک یک سیستم انکوباسیون مشابه دستگاه جوجه کشی معمولی تأمین شد (شکل ۲). روز دوازدهم آنکوباسیون از تمام نمونه های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تیمارهای پنج گانه از محدوده محل قرارگیری اسفنج ژلاتینی به کمک فوتواستر ئومیکروسکوپ تحقیقاتی (Ziess, Germany) تصاویری با درشت نمایی $4 \times 10 \times 1/6$ تهیه شد. داده های مورد بررسی شامل تعداد و طول انشعبات عروقی بود که در سطح مقطع یکسانی در ۴ طرف اصلاح اسفنج ژلاتینی با نرم افزار Image J در یک مونیتور ۱۵ اینچ برای تمام نمونه ها اندازه گیری شد.

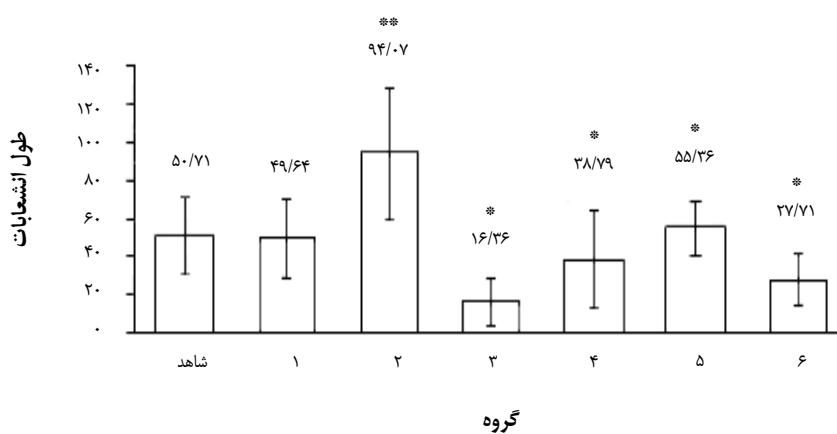
داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۶) و

طول رگ‌ها در گروه‌های هفت‌گانه فوق مربوط به گروه تیمار شده با داروی آنژیوستاتین با دوز کم است. کمترین میانگین طول رگ‌ها در گروه تیمار شده با داروی آنژیوستاتین با دوز بالا توأم با میدان الکترومغناطیس است.

نتایج مشاهدات بیانگر آن است که بیشترین میانگین برای تعداد انشعابات عروقی در گروه داروی آنژیوستاتین با دوز کم و کمترین مورد برای داروی آنژیوستاتین با دوز بالا می‌باشد. همچنین نتایج بیانگر آن است که بیشترین میانگین



نمودار ۱- مقایسه میانگین طول انشعابات عروقی در گروه‌های شاهد و تجربی
نسبت به گروه شاهد و * $(P = 0.001)$ نسبت به گروه ۶



نمودار ۲- مقایسه میانگین تعداد انشعابات عروقی در گروه‌های شاهد و تجربی
نسبت به گروه شاهد و * $(P = 0.001)$ نسبت به گروه ۳

نمودار ۱ و ۲- مقایسه میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در گروه شاهد و گروه‌های تجربی. گروه ۱: شاهد آزمایشگاهی، گروه ۲: تیمار با آنژیوستاتین با غلظت $1\text{ }\mu\text{m}$ ، گروه ۳: تیمار آنژیوستاتین با غلظت $10\text{ }\mu\text{m}$ ، گروه ۴: تیمار با میدان الکترومغناطیسی ($50\text{ }\mu\text{Gauss}$)، گروه ۵: تیمار توأم آنژیوستاتین با غلظت $1\text{ }\mu\text{m}$ و میدان الکترومغناطیسی ($50\text{ }\mu\text{Gauss}$) و گروه ۶: تیمار توأم با آنژیوستاتین با غلظت $10\text{ }\mu\text{m}$ و میدان الکترومغناطیسی ($50\text{ }\mu\text{Gauss}$) نسبت به گروه شاهد

بحث

استاتین‌ها مستقل از تأثیر این ترکیب‌ها بر میزان چربی خون است. آن‌ها بیان کردند که تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های اندوتیال در غلظت‌های پایین استاتین‌ها افزایش می‌یابد، اما به طور مشخصی در غلظت‌های بالا کاهش می‌یابد. این محققین بیان کردند که اثرات ضد رگ‌زایی استاتین‌ها در غلظت‌های بالا در ارتباط با کاهش ترشح VEGF و افزایش آپوپتوز از سلول‌های اندوتیال می‌باشد (۱۷).

منتصری و همکاران نیز گزارش کردند که داروی آتورواستاتین دارای تأثیرات وابسته به دوز دوگانه‌ای بر رشد بافت آندومتر انسانی در محیط کشت سه بعدی فیرین می‌باشد. این دارو در دوز پایین $1\text{ }\mu\text{m}$ منجر به افزایش رشد بافت در مقایسه با گروه شاهد می‌شود، اما دوزهای بالاتر آتورواستاتین $1\text{ }\mu\text{m}$ و $10\text{ }\mu\text{m}$ رشد را نسبت به گروه شاهد کاهش می‌دهد. این کاهش رشد شامل کاهش تکثیر سلولی و کاهش میزان رگ‌زایی می‌باشد (۵).

نتیجه به دست آمده از پژوهش حاضر در زمینه اثرات دوگانه آتورواستاتین بر آنژیوژنر با نتیجه Weis و همکاران (۱۷) و منتصری و همکاران (۵) مشابه است. لازم به ذکر است که در مطالعه Weis و همکاران اثرات استاتین‌ها بر سلول‌های اندوتیال بررسی شد که شاید همین امر علت اختلاف دوز دارویی به کار گرفته است (۱۷). در مطالعه منتصری و همکاران اثرات آتورواستاتین بر رشد بافت آندومتر انسان در زمینه سه بعدی فیرینی و در شرایط *In vitro* مورد بررسی قرار گرفت، حال آن که پژوهش حاضر اثر آتورواستاتین بر پرده کوریوالانتوئیک جوجه و در شرایط *In vivo* انجام پذیرفت.

با توجه به مشاهدات پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که استاتین‌ها به طور بالقوه دارای اثرات دوگانه‌ای بر فرایند آنژیوژنر می‌باشند. مکانیزم پیشنهادی این نتیجه را می‌توان با نتایج تحقیق Laufs سازگار دانست. این پژوهشگر گزارش کرد که دوزهای پایین استاتین از طریق افزایش اکسید نیتریک NO منجر به تحیریک رگ‌زایی می‌شود، در حالی که

نتایج به دست آمده از بررسی اثر توأم داروی آتورواستاتین با غلظت‌های $1\text{ }\mu\text{m}$ و $10\text{ }\mu\text{m}$ و میدان الکترومغناطیسی $50\text{ }\mu\text{tesla}$ بر آنژیوژنر پرده کوریوالانتوئیک جوجه، مؤید اثر تحیریک رگ‌زایی توسط آتورواستاتین $10\text{ }\mu\text{m}$ و مهار رگ‌زایی توسط آتورواستاتین $1\text{ }\mu\text{m}$ است. همچنین طی این تحقیق نشان داده شد که میدان الکترومغناطیسی ($50\text{ }\mu\text{tesla}$) توأم با آتورواستاتین $10\text{ }\mu\text{m}$ اثر تشیدکننده‌گی بر مهار رگ‌زایی دارد. این نتیجه به صورت کاهش معنی‌دار در تعداد و طول انشعابات عروقی اطراف محل تیمار مشاهده شد. همچنین کاربرد میدان الکترومغناطیسی ($50\text{ }\mu\text{tesla}$) توأم با آتورواستاتین $1\text{ }\mu\text{m}$ منجر به عدم افزایش تعداد عروق در محل تیمار شد. این نتیجه به صورت عدم وجود اختلاف معنی‌دار گروه تیمار با گروه شاهد نشان داده شد.

مطالعه‌ای نشان داد که اولین سیستمی که در مرحله گاسترولای جنینی تکامل می‌یابد، شبکه قلبی عروقی است (۱۳) سازمان‌دهی اولیه سلول‌های اندوتیال که منجر به ایجاد عروق می‌گردد، واسکولوژن خوانده می‌شود و قبل از آن هیچ سیستم عروقی دیگری وجود ندارد (۱۴). آنژیوژنر به رشد و تکامل عروق خونی جدید از طریق جوانه زدن سلول‌های اندوتیال عروق موجود گفته می‌شود. در مرحله جنینی هر دو فرایند در تشکیل عروق خونی دخالت دارند، اما در بالغین رگ‌های خونی تنها از طریق آنژیوژنر تشکیل می‌شود (۱۵). فاکتور رشد اندوتیوم عروقی (VEGF) یا Vascular endothelial growth factor فاکتورهای اصلی در آنژیوژنر است. میتوژن و یک فاکتور تمایز سلولی نیز از فاکتورهای اصلی می‌باشند که همراه با رسپتورهای با تمایل بالای خود (VEGFRs) یک سیستم سیگنالینگ کلیدی را در آنژیوژنر در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک تشکیل می‌دهد (۱۶).

بر اساس گزارش Weis و همکاران، اثرات وابسته به دوز

قطر رگ‌های خونی معرفی شد (۲۲). در نتیجه استرس هیپوکسی ایجاد می‌شود. سلول‌های سلطانی ترکیباتی رها می‌کند که پاسخ‌های آنژیوژنیک به هیپوکسی می‌تواند به رشد تومور کمک کند. بر اساس بررسی‌های انجام شده روی جنین‌های جوجه، میدان الکترومغناطیسی می‌تواند این پاسخ به هیپوکسی را در سلول‌های سلطانی کاهش دهد. این پدیده منجر به کاهش آنژیوژنز می‌شود (۲۳).

نتیجه گیری

نتایج این بررسی بیانگر آن است که به کارگیری توأم آنورواستاتین با غلظت $10 \mu\text{m}$ و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم و شدت ۵۰ گاوس بر آنژیوژنز دارای اثر مهاری است. همچنین نتایج نشان داد که میدان الکترومغناطیسی مذکور می‌تواند اثر آنژیوژنیک ناشی از تیمار با آنورواستاتین $10 \mu\text{m}$ را کاهش دهد. با توجه به یافته‌های این پژوهش می‌توان به کارگیری توأم دوز بالای آنورواستاتین و میدان الکترومغناطیسی را برای مهار رگ‌زایی به عنوان یک روش درمانی تکمیلی پیشنهاد نمود.

تقدیر و تشکر

با تشکر از مدیر گروه محترم زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، شرکت داروسازی تهران شیمی و همکاران آزمایشگاه تحقیقات تکوین جانوری که در انجام این پژوهش همکاری نمودند.

این ترکیب‌ها در دوزهای بالا پرنیلاسیون (Prenylation) پروتئین‌ها را کاهش می‌دهد و باعث مهار رشد سلولی می‌شود (۱۸). در حقیقت استاتین‌ها با مهار مسیر موالونات، تولید برخی پروتئین‌های پرنیله‌کننده که در مکانیسم‌های پاتولوژیک دخیل هستند، مهار می‌کند. همچنین از تولید بعضی از عوامل مفید و محافظتی مانند یوبی کینون (کوانزیم Q₁₀) که در غشاء میتوکندری‌ها یافت می‌شود و نقش اصلی در تولید انرژی دارد، جلوگیری می‌کند (۱۹). Shupak و همکاران نشان دادند که از میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس پایین در برخی شرایط پاتولوژیکی خاص نظری شکستگی‌های استخوان، زخم‌های پوستی، میگرن و تحلیل اعصاب به عنوان درمان استفاده می‌شود (۲۰). بر اساس گزارشی، شدت میزان الکترومغناطیسی یک فاکتور بسیار مهم در تأثیرگذاری بر آنژیوژنز می‌باشد؛ به طوری که شدت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ گاوس اثری بر این فرایند ندارد، ولی شدت ۲۰۰ گاوس دارای اثر مهاری بر آنژیوژنز می‌باشد (۲۱). در پژوهشی دیگر، زمانی که پرده کوریوآلتوئیک جوجه در معرض میدان الکترومغناطیسی با شدت ۴۰۰ گاوس قرار گرفت، تعداد و طول رگ‌های خونی کاهش یافت (۹). در این پژوهش نیز کاهش معنی‌دار تعداد و طول رگ‌های خونی نمونه‌های تیمار شده با آنورواستاتین با غلظت $10 \mu\text{m}$ ، که در معرض میدان الکترومغناطیسی (۵۰ گاوس) بودند، مشاهده شد. Yokoyama و همکاران نشان داد که اثرات بیولوژیک امواج الکترومغناطیسی به نتیریک اکساید مربوط می‌باشد. نیتریک اکساید به عنوان عامل تغییر

منابع:

- 1- Carmelite p, Luttun A. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. Thromb Haemost. 2001; 86(1): 289-97.
- 2- Van RN, Piek JJ, Schaper W, Bode C, Buschmann I. Arteriogenesis: mechanisms and modulation of collateral artery development. J Nucl Cardiol. 2001; 8(6): 687-93.
- 3- Salehei E, Sadat Amjadi F, Khazaei M. Angiogenesis in health and disease: Role of vascular endothelial growth factor (VEGF). Journal of Isfahan Medical School. 2011; 29(132): 312-26. [Persian]
- 4- Otrack Zk, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddin AI. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. Blood cells Mol dis. 2007; 39(2): 212-20.

- 5- Montaseri A, Khazaie M, Ghorbani R, Rezaei M. Evaluating the effects of Atorvastatin on cultured human endometrium in a three-dimensional fibrin matrix. *Reproduction and Infertility*. 2007; 7(4): 358-66. [Persian]
- 6- Ruiz-Velasco N, Domínguez A, Vega MA. Statins upregulate CD 36 expressing in human monocytes an effect strengthened when combined with PPAR-gamma ligand putative contribution of Rho GTPase in statin-induced cd36 expression. *Biochempharmacol*. 2004; 67(2): 303-13.
- 7- Walter DH, Zeiher AM, Dimmeler S. Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells. *Coron Artery Dis*. 2004; 15 (5): 235-42.
- 8- Vincent L, Chen W, Hong L, Mirshahi F, Mishal Z, Mirshahi-Khorassani T, et al. Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, and HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effect. *FEBS Lett*. 2001; 495(3): 159-66.
- 9- Zafar-Balanezhad S, Parivar k, Baharara J, Mohseni-koochesfahani H, Ashraf A. The synergic effects of rapamycin and extremely low frequency electromagnetic field on angiogenesis. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*. 2009; 11(3): 70-6. [Persian]
- 10- Monsefi MAZ, Baha Aldini A, Haghghi S. Effect of electromagnetic field on ovary and sex hormones of female rat. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*. 2005; 4(21): 22-5. [Persian]
- 11- McKay JC, Prato FS, Thomas AW. A literature review: the effects of magnetic field exposure on blood flow and blood vessels in the microvasculature. *Bioelectromagnetic*. 2007; 28(2): 81-98.
- 12- Ruggiero M, Bottaro DP, Liguri G, Gulisano M, Peruzzi B, Pacini S. 0/2 T magnetic field inhibits angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane. *Bioelectromagnetics*. 2004; 25 (5): 390-6.
- 13- Breier G. Vasculogenesis. In: Unsicker K, Kriegstein K. (eds). *Cell signaling and growth factor in development*. Weinheim, Willey-Vch verlag GmbH; 2008. pp:909-17.
- 14- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005; 438(7070): 932-6.
- 15- Fox SB, Gasparini G, Harris AL. Angiogenesis: pathological, prognosis, and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol*. 2001; 2(5): 278-89.
- 16- Ferrara N, Geber HP, Lecouter J. The biology of VEGF and its receptor. *Nat Med*. 2003; 9(6): 669-76.
- 17- Weis M, Heeschen C, Glassford A, Cooke JP. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation*. 2002; 105(6): 739-45.
- 18- Laufs U. Beyond lipid-lowering: effects of statin on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin pharmacol*. 2003; 58(11): 719-31.
- 19- Vankerckhoven R, Van veghel R, Saxena PR, Schoemaker RG. Pharmacological therapy can increase capillary density post-infarction remodeled rat hearts. *Cardiovasc Res*. 2004; 61(3): 620-9.
- 20- Shupak NM, Prato FS, Thomas AW. Therapeutic uses of pulsed magnetic field-exposure:A review. *Radio Science Bulletin*. 2003; 307: 9-32.
- 21- Baharara J, Ashraf AR, Balanejad S, Samareh-Mosavi S. The inhibitory effect of low frequency electromagnetic field (50HZ) on angiogenesis in chorioallantoic membrane of chick. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. 2010; 12(2): 8-12. [Persian]
- 22- Yokoyama M, Miwa H, Maeda S, Wakitani S, Takagi M. Influence of fetal calf serum on different ion of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion. *J Biosci Bioeng*. 2008; 106(1): 46-50.
- 23- Di Carlo AL, Mullins JM, Litovitz TA. Thresholds for electromagnetic field-induced hypoxia protection: evidence for a primary electric field effect. *Bioelectrochemistry*. 2000; 52(1): 9-16.

Synergic effects of Atorvastatin and low frequency electromagnetic field on chorioallantoic membrane angiogenesis of chick embryo

Javad Baharara¹, Saeideh Zafar-Balanezhad², Khadijeh Nejad Shahrokh Abadi³, Zahra Hesami⁴

Background and Aim: Statins promote the proliferation and survival of endothelial cells. Electromagnetic field, too, affects angiogenesis.

In the present research, the effect of atorvastatin together with a low frequency electromagnetic field (50 Gauss) on angiogenesis of chick embryo was assessed.

Materials and Methods: 98 fertilized eggs were divided into 7 equal groups in the following manner: control group and experimental ones 1) lab case, 2) atorvastatin (0.1 μm) group, 3) atorvastatin (10 μm) group, 4) electromagnetic field group, 5) atorvastatin (0/1 μm) and electromagnetic field group, 6) atorvastatin (10 μm) and electromagnetic field group. On the eighth day of incubation a gelatin sponge was placed on chorioallantoic membrane (CAM) and was soaked with 10 microliters of atorvastatin (0/1 μm) for groups 2, 5, 3, and 6; and for groups 3 and 6 ten microliter of atorvastatin (10 μm). On the 10th day the eggs of the groups 4, 5, and 6 were put under an electromagnetic field for four hours. On the twelfth day, incubation of angiogenesis and respective length of vessels in all samples was measured. The obtained data was statistically analyzed by means of SPSS software (v.16), ANOVA and Tukey test $P < 0.05$.

Results: Mean number and length of vessels in the control and experimental cases didn't show any significant differences ($p > 0.05$). Comparison between mean number and length of vessels in the control and group 2 showed a significant increase ($p = 0.001$), but groups 3 and 6 showed a significant decrease in the mean number and length of vessels compared with the controls ($p < 0.001$). Comparison between mean length of vessels in the control and group 4 revealed a significant decrease in the average length of vessels ($p = 0.001$).

Conclusion: Synergistic effects of atorvastatin (10 μm) and electromagnetic field cause inhibition of angiogenesis in chorioallantoic membrane. Besides, electromagnetic field has an inhibitory effect on stimulatory effect of atorvastatin 0/1 μm on angiogenesis.

Key Words: Angiogenesis, Atorvastatin, Electromagnetic field

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2012; 19(2): 148-156

Received: August 26, 2011 Accepted: June 12, 2012

¹ Corresponding Author, Associate Professor, Dept. of Biology, Mashhad branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
baharara@yahoo.com

² PhD, Department. of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

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

⁴ Msc in Cell & Developmental Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran