مقاله اصیل پژوهشی

اثرات توأم آتورواستاتین و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه

جواد بهارآرا[1]، سعیده ظفر بالانژاد[2]، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی[3]، زهرا حسامی[4]

چکیده

زمینه و هدف: استاتین‌ها باعث تکثیر و تمایز سلول‌های اندوتلیایی 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 آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه بررسی شد.

روش تحقیق: ۹۸ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار در ۷ گروه مساوی توزیع شد. این گروه‌ها شامل گروه شاهد و گروه‌های تجربی ۱) شاهد آزمایشگاهی، ۲) تیمار با آتورواستاتین ۰/۱ µm، ۳) تیمار با آتورواستاتین ۱۰ µm، ۴) تیمار با میدان الکترومغناطیسی، ۵) تیمار توأم آتورواستاتین ۰/۱ µm و میدان الکترومغناطیسی و ۶) تیمار توأم آتورواستاتین ۱۰ µm و میدان الکترومغناطیسی بود. در روز هشتم انکوباسیون یک اسفنج ژلاتینی روی پرده کوریوآلانتوئیک قرار گرفت که در گروه‌های ۲ و ۵ با ۱۰ µL محلول آتورواستاتین ۰/۱ µm و در گروه ۳ و ۶ با ۱۰ µL محلول آتورواستاتین ۱۰ µm آغشته گردید. در روز دهم، تخم‌مرغ‌های گروه ۴، ۵ و ۶ به مدت ۴ ساعت در میدان الکترومغناطیسی قرار گرفتند. در روز دوازدهم انکوباسیون تعداد و طول انشعابات عروقی در تمام نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. اطلاعات بدست آمده به کمک نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۶) توسط آزمون‌های ANOVA و Tukey در سطح ۰/۰۵ > P تحلیل گردید.

یافته‌ها: میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در نمونه‌های شاهد و شاهد آزمایشگاهی اختلاف معنی‌داری نداشت (۰/۰۵ < P). میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی گروه تیمار با آتورواستاتین ۰/۱ µm در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌دار و گروه‌های ۳ و ۶ در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد (۰/۰۰۱ = P). میانگین طول انشعابات عروقی گروه ۴ در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد (۰/۰۰۱ = P).

نتیجه‌گیری: کاربرد توأم آتورواستاتین با غلظت ۱۰ µm و میدان الکترومغناطیسی بر آنژیوژنز دارای اثر مهاری است. همچنین میدان الکترومغناطیسی می‌تواند اثر آنژیوژنیک ناشی از تیمار با آتورواستاتین ۰/۱ µm را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: آنژیوژنز، آتورواستاتین، میدان الکترومغناطیسی، جوجه

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

دریافت: ۱۳۹۰/۰۶/۰۴ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۳/۲۳

[1] 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: ۶۲۲۳۱۳۷– ۰۵۱۱ نمابر: ۶۲۲۱۰۸۳ –۰۵۱۱ پست الکترونیکی: baharara@yahoo.com
[2] مربی، دکترای تخصصی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران
[3] استادیار، دکترای تخصصی ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران
[4] کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی تکوینی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران

مقدمه

آنژیوژنز به فرایند بیولوژیکی جوانه‌زدن رگ‌های جدید از رگ‌های موجود در بافت اطلاق می‌شود (۱). آنژیوژنز فیزیولوژیک، فرایندی به شدت تنظیم شده است که در مواردی مانند ترمیم زخم، سیکل‌های قاعدگی، رشد جفت، لانه‌گزینی جنین و تخمک‌گذاری اتفاق می‌افتد. در حالی که آنژیوژنز پاتوفیزیولوژیک که اشاره به تکثیر غیر قابل کنترل اندوتلیوم مویرگی دارد، در بیماری‌هایی مانند رتینوپاتی دیابتی، آترواسکلروز، رشد و متاستاز تومورها دیده می‌شود (۲). در حالت سلامت آنژیوژنز به وسیله تعادل بین فاکتورهای آنژیوژنیک و آنتی‌آنژیوژنیک تنظیم می‌گردد. زمانی که مقدار فاکتورهای رشد آنژیوژنیک بیشتر از مهارکننده‌های آنژیوژنز باشد، تعادل به سمت رشد رگ‌های جدید جابجا می‌شود (۳). از مهم‌ترین فاکتورهای آنژیوژنیک می‌توان از فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor یا VEGF)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (Fibroblast growth factor یا FGF)، فاکتور رشد مشتق از پلاکت‌ها و آنژیوپوئیتین نام برد. این فاکتورها پروتیئنی هستند و به رسپتورهای اختصاصی در سطح غشای سلولی متصل می‌شوند (۴).

از جمله ترکیبات دارویی که تأثیرات آن‌ها بر فرایند رگ‌زایی مورد بررسی قرار گرفته است، استاتین‌ها می‌باشد. دسته دارویی مهارکننده آنزیم ۳- هیدروکسی ۳- متیل گلوتاریل کوآنزیم A ردوکتاز که به استاتین‌ها معروف هستند، به طور وسیعی جهت درمان افزایش کلسترول خون مورد استفاده قرار می‌گیرند (۵). تحقیق‌ها نشان دادند که استاتین‌ها علاوه بر اثرات کاهش‌دهنده سطح چربی خون دارای تأثیرات وسیعی بر فرایند التهاب و رگ‌زایی می‌باشند (۶). Walter و همکاران بیان کردند که استاتین‌ها باعث حرکت و تمایز سلول‌های اجدادی اندوتلیال مشتق شده از مغز استخوان می‌شوند که رگ‌زایی و ایجاد پوشش اندوتلیالی مجدد را سبب می‌شود (۷). Vincent و همکاران بیان کردند که استاتین‌ها قادر به کاهش تکثیر سلول‌های اندوتلیال و مهاجرت آن‌ها می‌باشد (۸). گزارش‌های مختلفی از اثرات میدان‌های الکترومغناطیسی و بررسی ارتباط آن با وضعیت‌های پاتولوژیک ارایه شده است. در آن‌ها نوع میدان، شدت آن، مدت زمان در معرض قرارگیری و به نظر برخی محققین محتوی ژنی نمونه تیمار شده در نتایج این آزمایش‌ها مؤثر نشان داده شده است (۹).

در همین راستا نتیجه برخی پژوهش‌ها نشان داد که قرار گرفتن در معرض میدان‌های 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 می‌کند، می‌تواند به صورت مهارکننده یا فعال‌کننده عمل کند (۱۰). تغییر در بیان ژن، کنش متقابل و ارتباط‌های سلولی از جمله مواردی هستند که تحت تأثیر میدان‌های الکترومغناطیسی قرار می‌گیرند و باعث اختلال آنژیوژنز می‌شوند (۱۱). گزارشی که از اثر میدان‌های الکترومغناطیسی بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه منتشر شد، بیانگر اثر مهاری میدان‌های الکترومغناطیس با شدت ۰/۲ تسلا بر آنژیوژنز است (۱۲). پژوهش حاضر تلاش برای رسیدن به پاسخ این سؤال می‌باشد که آیا به کارگیری میدان الکترومغناطیسی به صورت توأم با آتورواستاتین با غلظت‌های متفاوت اثر تشدیدی بر آنژیوژنز دارد یا مهارکننده آنژیوژنز می‌باشد؟ در این پژوهش اثر توأم میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم و شدت ۵۰ گاوس با داروی آتورواستاتین با غلظت‌های ۱۰ میکرومول و ۰/۱ میکرومول بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه بررسی شد.

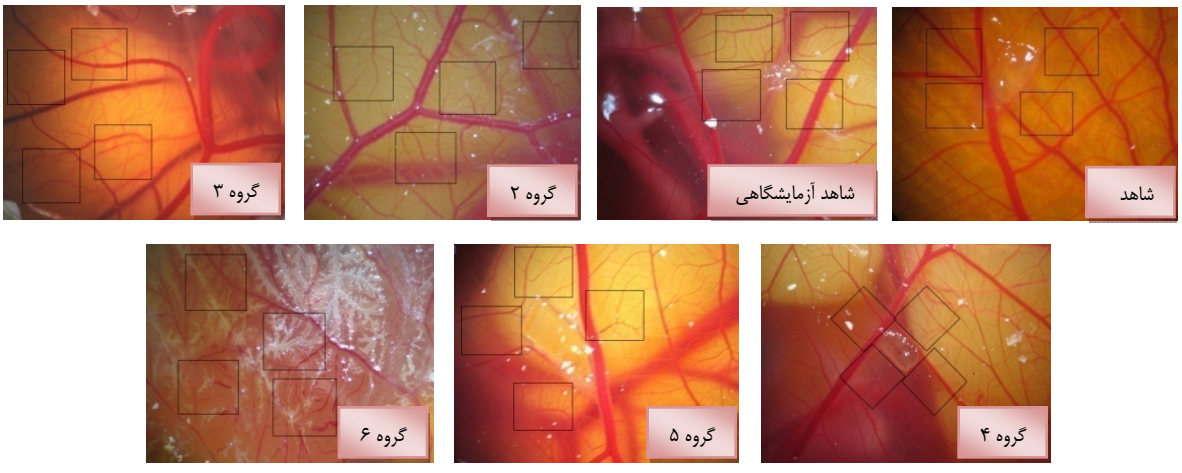
روش تحقیق

این پژوهش تجربی در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌شناسی تکوین جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در سال ۹۰-۱۳۸۹ انجام شد. جهت انجام تحقیق‌ها از تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار نژاد Ross که از شرکت

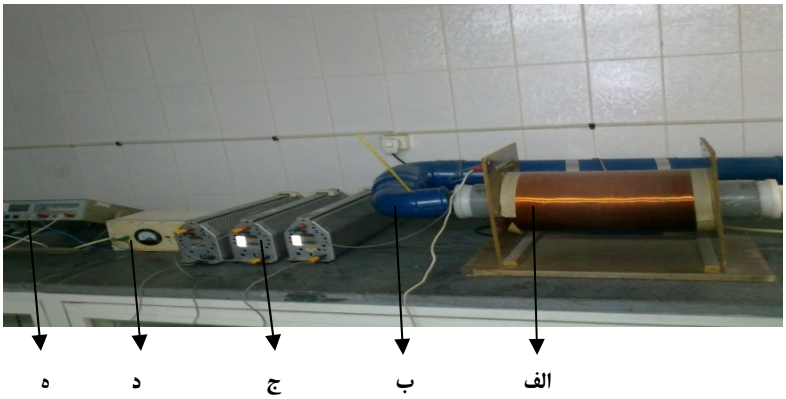
مرغداران طوس مشهد تهیه شده بود، به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده شد. تعداد ۹۸ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار به ۷ گروه مساوی به صورت تصادفی تقسیم شد. این گروه‌ها در گروه شاهد و گروه‌های تجربی ۱. شاهد آزمایشگاهی، ۲. تیمار با آتورواستاتین ۰/۱ µm، ۳. تیمار با آتورواستاتین ۱۰ µm، ۴. تیمار با میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم و شدت ۵۰ گاوس، ۵. تیمار توأم آتورواستاتین ۰/۱ µm و میدان الکترومغناطیس با فرکانس کم (۵۰ گاوس) و ۶. تیمار توأم با آتورواستاتین ۱۰ µm و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس کم (۵۰ گاوس) قرار گرفتند.

تخم‌مرغ‌ها در دستگاه جوجه‌کشی در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۵-۵۵ 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 تخم‌مرغ‌ها برداشته شد و توسط لامل و پارافین استریل پنجره‌ای روی یک طرف تخم‌مرغ‌ها ایجاد گردید. سپس تخم‌مرغ‌ها به انکوباتور برگردانده شد. روز هشتم انکوباسیون، پنجره‌ها در شرایط استریل بر داشته شد. روی پرده کوریوآلانتوئیک جوجه‌ها یک اسفنج ژلاتینی به ابعاد ۱۰ × ۴ × ۴ میلی‌متر قرار داده شد. این اسفنج مرکب از آلبومین سفیده تخم‌مرغ 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 ۱۰ µL آتورواستاتین ۰/۱ µm و در نمونه‌های گروه‌های ۳ و ۶ مقدار ۱۰ µL محلول آتورواستاتین ۱۰ µm به اسفنج ژلاتینی گروه‌های تیمار شده افزوده شد. سپس بار دیگر محل پنجره‌ها پوشانده شد و تخم‌مرغ‌ها به انکوباتور برگردانده شد.

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



شکل ۱- گروه شاهد، گروه‌های تجربی ۱) شاهد آزمایشگاهی، ۲) تیمار با آتورواستاتین با غلظت ۰/۱ µm که افزایش تعداد و طول انشعابات عروقی در اطراف اسفنج ژلاتینی مشاهده می‌شود، ۳) تیمار آتورواستاتین با غلظت ۱۰ µm، ٤) تیمار با میدان الکترو مغناطیسی ۵۰ گاوس، ۵) تیمار توأم آتورواستاتین با غلظت ۰/۱ µm و میدان الکترو مغناطیس ۵۰ گاوس، ٦) تیمار توأم با آتورواستاتین با غلظت ۱۰ µm و میدان الکترومغناطیسی ۵۰ گاوس. در گروه‌های ۳، ٤ و ٦ 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، ه) آمپرمتر

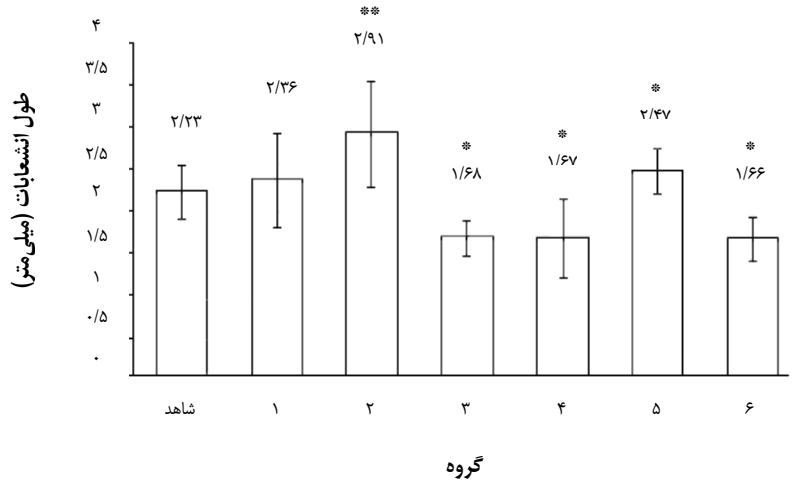
برای تأمین میدان الکترومغناطیسی به همراه شرایط مناسب انکوباسیون از یک سیستم ویژه که در مطالعه قبلی طراحی و ساخته شده بود، استفاده گردید. این سیستم مولد میدان الکترومغناطیسی از یک سیم‌پیچ مسی که توسط جریان برق متناوب شهری تغذیه می‌کند، تشکیل شده است. سیم‌پیچ در مسیر جریان برق شهری با فرکانس ۵۰ هرتز و ولتاژ ۲۲۰ ولت سه رئوستا قرار دارد که شدت جریان برق ورودی به سیم‌پیچ توسط آن‌ها تنظیم می‌گردد. این سیم‌پیچ قادر به تأمین شدت میدان الکترومغناطیسی بین ۱۰ تا ۴۰۰ گاوس می‌باشد. شدت میدان الکترومغناطیس با گاوس‌متر کالیبره و شرایط دما و رطوبت به کمک یک سیستم انکوباسیون مشابه دستگاه جوجه‌کشی معمولی تأمین شد (شکل ۲). روز دوازدهم انکوباسیون از تمام نمونه‌های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تیمارهای پنج‌گانه از محدوده محل قرارگیری اسفنج ژلاتینی به کمک فوتواسترئومیکروسکوپ تحقیقاتی (Ziess ,Germany) تصاویری با درشت‌نمایی ۴ × ۱۰ × ۱/۶ تهیه شد. داده‌های مورد بررسی شامل تعداد و طول انشعابات عروقی بود که در سطح مقطع یکسانی در ۴ طرف اضلاع اسفنج ژلاتینی با نرم‌افزار Image J در یک مونیتور ۱۵ اینچ برای تمام نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۶) و آزمون‌های ANOVA و تعقیبی Tukey در سطح ($P < ۰/۰۵$) تحلیل گردید.

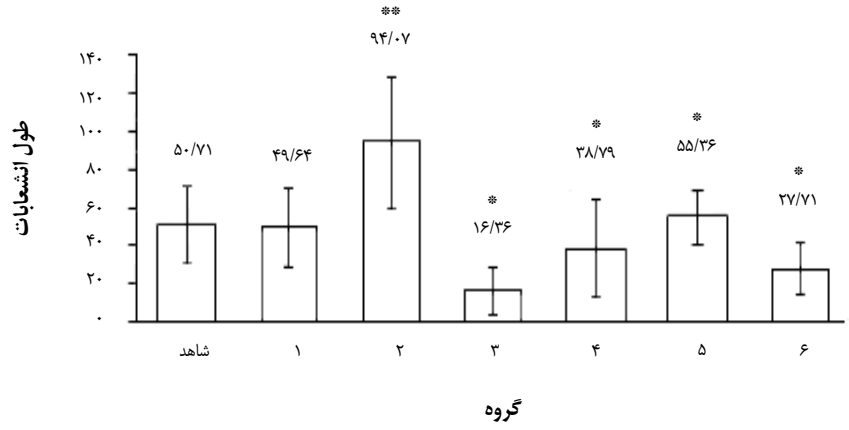
یافته‌ها

میانگین تعداد (۵/۴۹۴ ± ۵۰/۷۱) و طول (۰/۸۴۰ mm ± ۲/۲۳) انشعابات عروقی گروه شاهد نسبت به میانگین تعداد (۵/۵۸ ± ۴۹/۶۴) و طول (۰/۱۴۹ mm ± ۲/۳۶) انشعابات عروقی شاهد آزمایشگاهی اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P > ۰/۰۵$). میانگین تعداد (۹/۲۵۷ ± ۹۴/۰۷) و طول (۰/۱۷۹ mm ± ۲/۹۱) انشعابات عروقی در گروه ۲ نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ($P = ۰/۰۰۱$). میانگین تعداد (۱/۶۳۶ ± ۱۶/۳۶) و طول (۰/۰۵۵ mm ± ۱/۶۸) انشعابات عروقی در گروه ۳ نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($P = ۰/۰۰۱$). میانگین طول (۰/۱۲۴ mm ± ۱/۶۷۶) انشعابات عروقی در گروه ۴ نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($P = ۰/۰۰۱$). میانگین تعداد (۳/۸۳۲ ± ۵۵/۳۶) انشعابات عروقی در گروه ۵ نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P > ۰/۰۵$). میانگین تعداد (۰/۶۷۷ ± ۲۷/۷۱) و طول (۰/۱۷۰ mm ± ۱/۶۶) انشعابات عروقی در گروه ۶ نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($P = ۰/۰۰۱$) (نمودارهای ۱ و ۲).

نتایج مشاهدات بیانگر آن است که بیشترین میانگین برای تعداد انشعابات عروقی در گروه داروی آتورواستاتین با دوز کم و کم‌ترین مورد برای داروی آتورواستاتین با دوز بالا می‌باشد. همچنین نتایج بیانگر آن است که بیشترین میانگین طول رگ‌ها در گروه‌های هفت‌گانه فوق مربوط به گروه تیمار شده با داروی آتورواستاتین با دوز کم است. کم‌ترین میانگین طول رگ‌ها در گروه تیمار شده با داروی آتورواستاتین با دوز بالا توأم با میدان الکترومغناطیس است.



نمودار ۱- مقایسه میانگین طول انشعابات عروقی در گروهای شاهد و تجربی
***(P = ۰/۰۰۱) نسبت به گروه شاهد و *(P = ۰/۰۰۱) نسبت به گروه ٦**



نمودار ۲- مقایسه میانگین تعداد انشعابات عروقی در گروه‌های شاهد و تجربی
***(P = ۰/۰۰۱) نسبت به گروه شاهد و *(P = ۰/۰۰۱) 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 آتورواستاتین با غلظت µm ۰/۱، گروه ۳: تیمار آتورواستاتین با غلظت µm ۱۰، گروه ٤: تیمار با میدان الکترو مغناطیسی (۵۰ گاوس)، گروه ۵: تیمار توأم آتورواستاتین با غلظت µm ۰/۱ و میدان الکترو مغناطیس (۵۰ گاوس) و گروه ٦: تیمار توأم با آتورواستاتین با غلظت µm ۱۰ و میدان الکترومغناطیسی (۵۰ گاوس) نسبت به گروه شاهد

بحث

نتایج به دست آمده از بررسی اثر توأم داروی آتورواستاتین با غلظت‌های ۰/۱ و ۱۰ µm و میدان الکترومغناطیسی ۵۰ گاوس بر آنژیوژنز پرده کوریوالانتوئیک جوجه، مؤید اثر تحریک رگ‌زایی توسط آتورواستاتین ۰/۱ µm و مهار رگ‌زایی توسط آتورواستاتین ۱۰ µm است. همچنین طی این تحقیق نشان داده شد که میدان الکترومغناطیسی (۵۰ گاوس) توأم با آتورواستاتین ۱۰ µm اثر تشدیدکنندگی 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 (۵۰ گاوس) توأم با آتورواستاتین ۰/۱ µm 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 اندوتلیال که منجر به ایجاد عروق می‌گردد، واسکولوژنز خوانده می‌شود و قبل از آن هیچ سیستم عروقی دیگری وجود ندارد (۱۴). آنژیوژنز به رشد و تکامل عروق خونی جدید از طریق جوانه زدن سلول‌های اندوتلیال عروق موجود گفته می‌شود. در مرحله جنینی هر دو فرایند در تشکیل عروق خونی دخالت دارند، اما در بالغین رگ‌های خونی تنها از طریق آنژیوژنز تشکیل می‌شود (۱۵). فاکتور رشد اندوتلیوم عروقی (VEGF یا Vascular endothelial growth factor) یکی از فاکتورهای اصلی در آنژیوژنز 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 آنژیوژنز در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک تشکیل می‌دهد (۱۶).

بر اساس گزارش Weis و همکاران، اثرات وابسته به دوز استاتین‌ها مستقل از تأثیر این ترکیب‌ها بر میزان چربی خون است. آن‌ها بیان کردند که تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های اندوتلیال 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 اندوتلیال 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 فیبرین می‌باشد. این دارو در دوز پایین ۰/۱ µm منجر به افزایش رشد بافت در مقایسه با گروه شاهد می‌شود، اما دوزهای بالاتر آتورواستاتین ۱ µm و ۱۰ 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 آنژیوژنز 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 اندوتلیال 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 فیبرینی و در شرایط In vitro مورد بررسی قرار گرفت، حال آن که پژوهش حاضر اثر آتورواستاتین بر پرده کوریوآلانتوئیک 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 آنژیوژنز 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 تحریک رگ‌زایی می‌شود، در حالی که

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 (کوآنزیم Q۱۰) که در غشای 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 نظیر 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 کوریوآلانتوئیک 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 آتورواستاتین با غلظت μm ۱۰، که در معرض میدان الکترومغناطیسی (۵۰ گاوس) بودند، مشاهده شد. Yokoyama و همکاران نشان داد که اثرات بیولوژیک امواج الکترومغناطیسی به نیتریک اکساید مربوط می‌باشد. نیتریک اکساید به عنوان عامل تغییر قطر رگ‌های خونی معرفی شد (۲۲). در نتیجه استرس هیپوکسی ایجاد می‌شود. سلول‌های سرطانی ترکیباتی رها می‌کنند 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 سرطانی کاهش دهد. این پدیده منجر به کاهش آنژیوژنز می‌شود (۲۳).

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی بیانگر آن است که به کارگیری توأم آتورواستاتین با غلظت μm ۱۰ 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 آتورواستاتین μm ۰/۱ را کاهش دهد. با توجه به یافته‌های این پژوهش می‌توان به کارگیری توأم دوز بالای آتورواستاتین و میدان الکترومغناطیس 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.

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- Otrock 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 affect strengthened when combind with PPAR-gamma ligand putative contribution of Rho GTpase in statin-induced cd36 expression. Bio chempharmacol. 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, Haghighi 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, Kriegisten 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 nicric 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 choriolantoic 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 mesenchy mal 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 aprimary electric field effect. Bioelectrochemistry. 2000; 52(1): 9-16.

Abstract *Original Article*

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

Javad Baharara[1], Saeideh Zafar-Balanezhad[2], Khadijeh Nejad Shahrokh Abadi[3], Zahra Hesami[4]

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 (10μm) group, 4) electromagnetic field group, 5) atorvastatin (0/1μm) and electromagnetic field group,6) atorvastatin (10μm) 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 10^{th} 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 was 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 (10μm) and electromagnetic field cause inhibition of angiogenesis in chorioallantoic membrane. Besides, electromagnetic field has an inhibitory effect on stimulatory effect of atorvastatin 0/1μm 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*