اثر عصاره آبی زعفران و میدان الکترو مغناطیس با فرکانس کم بر آنژیوژنز در حلقه آئورت موش صحرایی نژاد ویستار

صفا مشتاق[۱](M.Sc)، جواد بهارآرا*[1](Ph.D)، سعیده ظفر بالانژاد[۱](Ph.D)، طیبه رمضانی[۲](M.Sc)

۱- *دانشگاه آزاداسلامیواحدمشهد، گروهزیست‌شناسی*

۲- *دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه بیولوژی تکوین جانوری*

چکیده

سابقه و هدف: آنژیوژنز برای تکوین جنین و بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک مثل رشد تومور ضروری است. هم‌چنین اثر میدان‌های الکترومغناطیس بر جنبه‌های مختلف رشد و نمو سلولی مورد بررسی قرار گرفته است. در این پژوهش اثر توام عصاره آبی زعفران و میدان الکترومغناطیس با فرکانس کم برروی آنژیوژنز حلقه آئورت موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی آئورت موش صحرایی نژاد ویستار را به قطعات ۱ میلی‌متری تقسیم گردید و در ماتریکس کلاژن استخراج شده از دم موش صحرایی کشت داده شد. پس از مشاهده اولین جوانه‌های رگ‌زایی از حلقه آئورت در روز سوم نمونه‌ها به۸ گروه طبقه‌بندی شدند. گروه شاهد، شاهد آزمایشگاهی ۱ (تیمار با PBS)، شاهد آزمایشگاهی ۲ (تیمار با میدان الکترومغناطیس در وضعیت خاموش) و شاهد آزمایشگاهی ۳ (تیمار با PBS و میدان در شرایط سیستم خاموش)، گروه‌های تجربی ۱ و۲ (تیمار توام با میدان ۲۰۰ گاؤس به مدت ۲ ساعت و به ترتیب با غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زعفران) و گروه‌های تجربی ۳ و ۴ (تیمار با میدان ۲۰۰ گاؤس به مدت ۳ ساعت و به ترتیب با غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر زعفران). بلافاصله بعد از تیمار و هم‌چنین ۲۴ ساعت بعد از نمونه‌ها با میکروسکوپ اینورت عکس‌برداری شد. تعداد و طول انشعابات رگی توسط نرم‌افزار Image J تعیین گردید.

یافته‌ها: میانگین تعدادو طول انشعابات عروقی در نمونه‌های شاهد با میانگین تعداد وطول انشعابات در نمونه‌های شاهد آزمایشگاهی ۱، ۲ و ۳ اختلاف معنی‌دار نشان نداد (P>۰/۰۵)، اما تعداد انشعابات عروقی در گروه‌های تجربی ۲ و۴ کاهش معنی‌دار را نشان داد(p<۰/۰۰۱). کاهش میانگین طول انشعابات عروقی در گروه‌های تجربی ۲ و ۴ (p<۰/۰۰۱) و در گروه‌های تجربی ۱و ۳ (p<۰/۰۱) معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که زعفران دارای اثر مهاری وابسته به دوز بر رگ‌زایی است و این تاثیر توسط هم‌افزایی با میدان الکترومغناطیس طور معنی‌دار افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: مهارکننده‌های رگ‌سازی، زعفران، آئورت، سلول‌های اندوتلیال، میدان‌های الکترومغناطیس، موش های صحرایی.

مقدمه

آنژیوژنز طبیعی برای تمایز موفق جنین ضروری است. تکثیر ومهاجرت سلولی از اولین وقایع آنژیوژنز است که منجر به بازآرایی مجدد فیبرهای اکتینی می‌شوند [۱]. در بسیاری از بیماری‌های پاتولوژیک نظیر (تومورهای پیش‌رفته، متاستاز، ورم مفاصل و تصلب شرایین) و بسیاری از بیماری‌های

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۱-۸۴۳۷۰۹۲ نمابر ۰۵۱۱-۸۴۳۷۰۹۲ Email: baharara@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۲۴

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-01-31]

دیگرآنژیوژنز به طرز چشم‌گیری افزایش می‌یابد، لذا استفاده از داروهایی که بتواند رگ‌زایی را تحت تاثیر قرار دهد روش شایع برای درمان این بیماری‌ها محسوب می‌شود. در افراد بالغ تشکیل رگ‌های خونی جدید به طور دقیق کنترل می‌شود و فقط در شرایط پاتولوژیکی و فیزیولوژیکی خاص نظیر بارداری، ترمیم زخم، آرتریت روماتریت و تومورها رخ می‌دهد [۲].

امروزه ابداع و استفاده ازروش‌های درمانی موثرتر مورد توجه متخصصین قرار گرفته است، که یکی از این روش‌ها استفاده از میدان‌های الکترومغناطیس با فرکانس کم می‌باشد. برخی از تجربیات بیانگر کاهش آنژیوژنز در سیاه‌رگ‌ها و تومورهای سینه‌ای و یا افزایش آنژیوژنز در ناحیه زیرپوست موش‌های صحرایی و سیاه‌رگ‌های شکمی انسان تحت تاثیر میدان‌های الکترومغناطیس می‌باشد [۳].

تغییر در بیان ژن، کنش متقابل و ارتباطات سلولی از جمله مواردی هستند که تحت اثر میدان‌های الکترومغناطیس قرار گرفته و باعث اختلال در آنژیوژنز می‌شوند [۴].

با توجه به اثرات جانبی برخی داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی با حداقل اثرات جانبی و تداخل دارویی مورد توجه قرار گرفته است [۵]. زعفران با نام علمی Corcus sativus L گیاهی از تیره زنبق چندساله با گل‌های بنفش است که دارای خامه بلند و کلاله سه بخشی به رنگ نارنجیا قرمز است و همین بخش به نام زعفران دارای ارزش تجاری است [۶].

گیاه زعفران از زمان‌های قدیم به عنوان یک چاشنی و رنگ در غذاها و همچنین در درمان طیف وسیعی از اختلالات همچون سرفه، نفخ شکم، اختلالات معده، بی‌خوابی، خون‌ریزی رحم و مشکلات زنانگی و حتی سرطان‌ها بوده است [۷].

نتایج بررسی‌های داشمندان نشان داده است که ترکیبات اصلی زعفران شامل کروسین، کروستین، پیکروکروسین و سافرانال در جلوگیری از تحلیل نورون‌ها و تقویت حافظه نقش دارند [۸]. اثرات ضد سرطانی زعفران همچون مهار تشکیل تومورها، اثر ضد جهش‌زایی و مهار سنتز نوکلئیک اسیدهادر سلول‌های بدخیم انسان به اثبات رسیده است [۹].همچنین اثرات ضد افسردگی عصاره آبی و اتانولی گل‌برگ‌های گل زعفران به اثبات رسیده است [۱۰].با توجه به نتایج مثبت و مفید داروهای گیاهی در درمان بسیاری از اختلالات و نیز این‌که انسان در زندگی روزمره درمعرض امواج الکترومغناطیس است، در این تحقیق اثر توام میدان الکترومغناطیس با فرکانس پایین به همراه عصاره آبی زعفران برآنژیوژنز در مدل حلقه آئورت موش صحرایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری. برای تهیه عصاره ابتدا۳ گرم زعفران تجاری(شرکت نوین زعفران) ساییده و پودر گردید. عصاره‌گیری با استفاده از دستگاه سوکسله و با آب انجام گرفت. عصاره استحصالی سپس جهت تغلیظ به دستگاه روتاری منتقل گردید تا آب مقطر اضافی حذف شود. به منظور خشک کردن عصاره زعفران از روش انجماد و خشک کردن در خلا (lyphilization) با استفاده از دستگاه freeze dryer استفاده و عصاره‌ای با بالاترین درجه کیفیت و کم‌ترین میزان آلودگی تهیه گردد.سپس از پودر برای تهیه محلول زعفران با غلظت‌های مورد نیاز در PBS حل شد و محلول حاصل فیلترگردید [۱۱].

استخراج کلاژن. در پژوهش تجربی حاضر از دم موش صحرایی کلاژن استخراج شد. برای استخراج کلاژن پوست دم موش جدا شده و رشته‌های تاندونی زیر پوست توسط PBS سه بار شستشو داده شد. سپس در الکل ۷۰ درصد به مدت یکساعت قرار گرفت و در مرحله نهایی به مدت ۶۰ دقیقه در دستگاه سانترفیوژ با 16000 rcf گذاشته شد تا کلاژن آماده شود. روش بردفورد برای تعیینغلظت کلاژن استخراجی استفاده شد که غلظت آن حدود ۱.۲ گرم بر میلی‌لیتر بود برای ساخت داربست از محلول کلاژن با غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید [۱۲].

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-01-31]

جدا ساختن حلقه آئورت موش صحرایی. در تحقیق حاضر از موش‌های صحرایی که ۴ تا ۶ هفته سن و ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم وزن داشتند استفاده شد پس از بی‌هوش کردن موش‌های صحرایی و استریل کردن حفره شکمی، قفسه سینه باز شد و قطعه‌ای از آئورت با طول مناسب جدا گردید.آئورت جدا شده پس از انتقال به بافر استریل حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین با استفاده از تیغ جراحی و زیر هود کشت سلولی به قطعات ۱ تا ۲ میلی‌متری قطعه قطعه شد [۱۴].

تهیه داربست کلاژنی. برای تهیه داربست کلاژنی، کلاژن استخراج شده از دم موش صحرایی، بیکربنات سدیم، محیط کشت(DMEM (Sigma, France را به نسبت۸ ،۱،۱مخلوط کرده.پس از تشکیل داربست حلقه‌های آئورت را درون داربست قرارداده ودر انکوباتور به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده تا محلول کلاژن به ژل تبدیل شود. پس از خارج کردن پلیت از انکوباتور، زیر هود محیط کشتDMEM حاوی ۲۰ درصد سرم گوساله(FBS (Gibco, USA و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (Gibco, USA) و استرپتومایسین (Gibco, USA) به سطح روی داربست اضافه گردید[۱۵].

تیمار توام با میدان و زعفران. پس از ۳ روز از زمان کشت و پیدایش اولین جوانه‌های عروقی نمونه‌ها به ۸ گروه آزمون به صورت تصادفی توزیع شدند، که شامل گروه شاهد (نگه‌داری در شرایط طبیعی)، گروه شاهد آزمایشگاهی ۱(تیمار باPBS)، شاهد آزمایشگاهی ۲(تیمار در شرایط خاموش سیستم مولد میدان)، شاهد آزمایشگاهی ۳ (تیمار توام با PBS وقرار گرفتن در وضعیت خاموش سیستم مولد میدان) و گروه‌های تجربی ۱و ۲ تحت اثرمیدان ۲۰۰ گاؤس به مدت ۲ ساعت بودند که ۲۴ ساعت بعد از میدان به آن‌ها به ترتیب عصاره آبی زعفران در غلظت‌های ۲۰۰ و۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیترافزوده گردید و بلافاصله پس از افزودن عصاره زعفران و نیز ۲۴ ساعت بعد از نمونه‌ها با استفاده از دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ اینورت عکس‌برداری شد. گروه‌های تجربی ۳ و ۴ تحت اثر میدان با فرکانس کم و شدت ۲۰۰ گاؤس در زمان ۳ ساعت بودند که ۲۴ ساعت بعد آن‌ها به ترتیب تحت تیمارعصاره آبی زعفران در غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیترافزوده گردید و بلافاصله و بعد از ۲۴ ساعت قرارگیری در انکوباتور از آن‌ها عکس‌برداری شد.طول و تعداد انشعابات عروقی توسط نرم‌افزارImage J شمارش شدند، به این صورت که مربع‌هایی با ابعاد مشخص ۱۰×۱۰ انتخاب شده و تعداد و طول انشعابات درون این مربع‌ها و روی دو تا از اضلاع به طور دقیق شمارش شدند. کلیه تجربیات ۳ بار تکرار گردید و در هر نمونه از تعداد و طول انشعابات به طور جداگانه میانگین گرفته شد. محققین این پژوهش در کلیه مراحل متعهد به رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات بودند.

آنالیز آماری. داده‌های نتایج این تحقیق در نرم‌افزار آماری(SPSS, Version16) و به کمک آزمون آماریANOVA و تست تعقیبیTukey در سطح (P<۰/۰۵) تحلیل گردید.

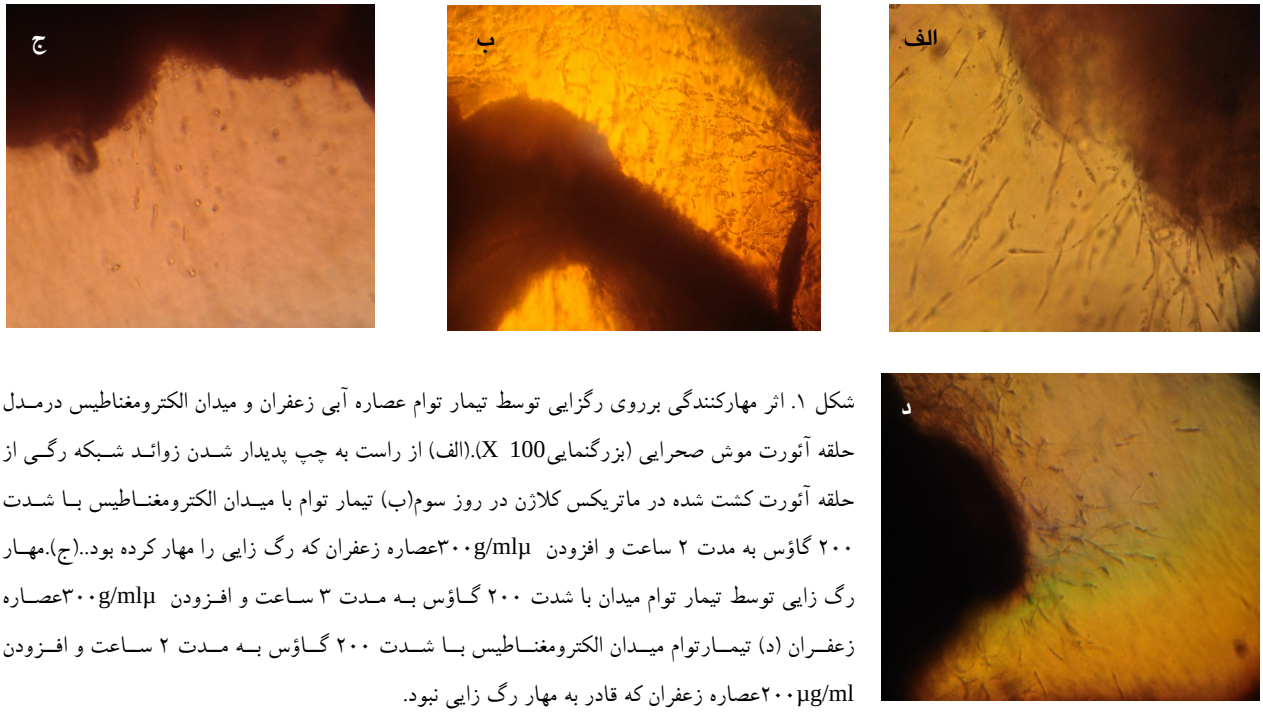
نتایج

نتایج بررسی تعداد و طول انشعابات عروقی در نمونه‌های کنترل با گروه‌های تجربی ۱ و ۲ و ۳ و ۴ (اثر توام میدان و زعفران). مقایسه میانگین تعداد انشعابات عروق خونی گروه شاهد(۱۳/۴±۱/۲۳)با گروه شاهد آزمایشگاهی (۱۳/۸±۱/۲۴) (سیستم مولد میدان در وضعیت خاموش وpbs)کاهش معنی‌دار نشان نداد(P>۰/۰۵)، لذا در نمونه‌های بعدی نمونه‌های تجربی با شاهد مقایسه شدند.مقایسه میانگین تعداد انشعابات عروقی بین گروه شاهد و گروه تجربی۱ (۱۱/۸±۰/۰۴) کاهش معنی‌دار را نشان نداد (P>۰/۰۵). مقایسه تعداد انشعابات عروقی بین گروه تجربی ۲ (۵±۰/۷۰) و گروه تجربی۳(۷/۲±۲/۳۹) و ۴(۴/۴±۲/۱۴)کاهش معنی‌دار را با توجه به شکل ۱ نشان داد(P<۰/۰۰۱).

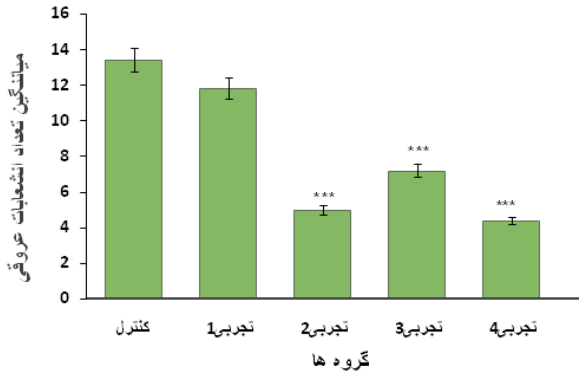
مقایسه طول انشعابات عروقی بین گروه شاهد(۱۲۴/۱±۲۹/۷) و گروه شاهد آزمایشگاهی (۱۲۳/۸±۲۹/۱) اختلاف معنی‌دار نشان نداد (p>۰/۰۵)، لذا در بررسی‌های بعدی نمونه‌های تجربی با شاهد مقایسه

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-01-31]

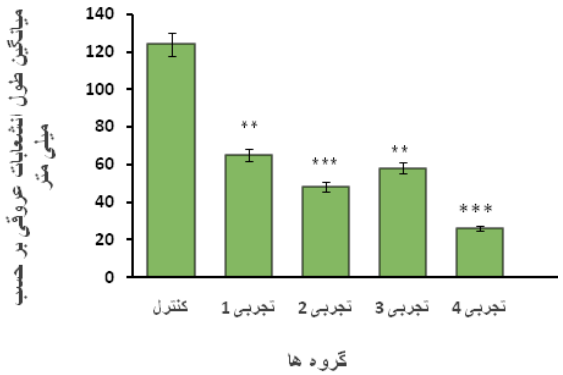
شدند.مقایسه میانگین طول انشعابات عروقی بین گروه شاهد و گروه تجربی ۲(۶/۸±۴۸/۱۳)و۴ (۹/۴۲ mm±۱/۲۶) کاهش معنی‌دار را نشان داد (p<۰/۰۰۱). مقایسه میانگین طول انشعابات عروقی در گروه شاهد با گروه تجربی ۱(۱۰/۱۴±۶۸/۱) و۳ (۹/۲۵±۵۸/۲۷) کاهش معنی‌دار را نشان داد (p<۰/۰۱) (شکل ۱).



شکل ۱. اثر مهارکنندگی برروی رگزایی توسط تیمار توام عصاره آبی زعفران و میدان الکترومغناطیس درمدل حلقه آئورت موش صحرایی (بزرگنمایی100 X).(الف) از راست به چپ پدیدار شدن زوائد شبکه رگی از حلقه آئورت کشت شده در ماتریکس کلاژن در روز سوم(ب) تیمار توام با میدان الکترومغناطیس با شدت ۲۰۰ گاؤس به مدت ۲ ساعت و افزودن ۳۰۰g/mlμعصاره زعفران که رگ زایی را مهار کرده بود..(ج).مهار رگ زایی توسط تیمار توام میدان با شدت ۲۰۰ گاؤس به مدت ۳ ساعت و افزودن ۳۰۰g/mlμعصاره زعفران (د) تیمارتوام میدان الکترومغناطیس با شدت ۲۰۰ گاؤس به مدت ۲ ساعت و افزودن ۲۰۰μg/mlعصاره زعفران که قادر به مهار رگ زایی نبود.



شکل ۲. مقایسه میانگین تعداد انشعابات عروقی گروه کنترل با گروه ه تجربی ۱(تیمار توام میدان الکترومغناطیس با شدت ۲۰۰ گاؤس به مدت ۲ ساعت و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر زعفران) و گروه تجربی۲ (تیمار توام میدان الکترومغناطیس ۲۰۰ گاؤس به مدت ۲ ساعت و غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیترزعفران) و گروه تجربی ۳ (تیمار توام میدان الکترومغناطیس ۲۰۰ گاؤس به مدت ۳ ساعت و غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر زعفران) و گروه تجربی ۴ (تیمار توام میدان الکترومغناطیس ۲۰۰ گاؤس به مدت ۳ ساعت و غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر زعفران)
***اختلاف معنی داری در سطح (p<۰/۰۰۱)



شکل ۳. مقایسهمیانگین طول انشعابات عروقیگروه کنترل با گروه ه تجربی ۱(تیمار توام میدان الکترومغناطیس با شدت ۲۰۰ گاؤس به مدت ۲ ساعت و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر زعفران) و گروه تجربی۲ (تیمار توام میدان الکترومغناطیس ۲۰۰ گاؤس به مدت ۲ ساعت و غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیترزعفران) و گروه تجربی ۳ (تیمار توام میدان الکترومغناطیس ۲۰۰ گاؤس به مدت ۳ ساعت و غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر زعفران) و گروه تجربی ۴ (تیمار توام میدان الکترومغناطیس ۲۰۰ گاؤس به مدت ۳ ساعت و غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر زعفران)
***اختلاف معنی داری در سطح (p<۰/۰۰۱)
**اختلاف معنی داری در سطح (p<۰/۰۱)

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-01-31]

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش اثرگیاه دارویی زعفران با هدف بررسی بر روند آنژیوژنز به منظور تعدیل و کاهش رگ‌زایی جهت مهار رشد سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفت. مطابق نتیجه تحقیق حاضر عصاره آبی زعفران با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعداد و طول انشعابات عروقی را در حلقه آئورت موش صحرایی را در گروه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌دار کاهش داد.

بر طبق تجربیاتArgon در سال ۲۰۰۹ از آن‌جا که روش شیمی‌درمانی مقاومت اکتسابی سلول سرطانی به داروی شیمی‌درمانیرا در پی دارد که مشکل عمده‌ای را در درمان سرطان به‌وجود آورده است و نیز میزان جهش و ناپایداری ژنتیکی در سلول‌های تومور سرطانی بسیار بالاست و تغییراتبه سرعت در آن‌ها انجام می‌گیرد این دسته از سلول‌ها نسبت به داروهای شیمی‌درمانی مقاومت پیدا می‌نمایند در حالی‌که سلول‌های اندوتلیال سلول‌هایی طبیعی‌اند که از نظر ژنتیکی پایدار بوده و میزان جهش در آن‌ها پایین است، بنابراین مهار رگ‌زایی توسط مواد طبیعی مثل گیاهان دارویی که بر پایه سرکوب سلول‌های اندوتلیالی انجام می‌شود باعث ایجاد مقاومت دارویی نشده و یا مقاومت کم‌تری ایجاد می‌کند [۱۶]، لذا در تحقیق تجربی حاضر مهار رگ‌زایی توسط عصاره آبی زعفران و با هدف سرکوب سلول‌های اندوتلیالی صورت پذیرفت.

تحقیقات نشان داده‌اندکه زعفران و زیر واحدهای اصلی آن به ویژه کروسین سرعت رشد تومورها را در رت کاهش می‌هد. کاروتنوئیدهای موجود در زعفران به ویژه کروسین و کروستین و دی‌متیل کروستین مستقیم می‌توانند به شیار کوچک در DNA باند شده و تغییر شکل فضایی را در آن‌ها القا نمایند [۱۷]. از ین رو این احتمال وجود ارد که در این تحقیق کروسین و کروستین موجود در عصاره آبی زعفران با تغییر شکل فضاییDNA در سلول‌های اندوتلیالی در فرایند سیگنال رسانی مسیر رگ‌زایی اختلال ایجاد کرده و روند طبیعی آنژیوژنز را دچار مشکل نمایند و از اینروش برایمهار رگ‌زایی در سلول‌های تومور و در نتیجه مهار تومور و متاستاز می‌توان استفاده کرد.

شاهرخ‌آبادی و همکاران در سال ۱۳۸۸ نشان دادندکه عصاره تام زعفران دارای فعالیت آنتی‌توموری بر علیه سلول‌هایHepG بوده و نیز فعالیت ضدسرطان‌زایی عصاره تام زعفران علیه سرطان‌های القاشده توسط مواد شیمیایی به صورت ماده‌ای است که فعالیت‌های سه فرایند مهم متابولیکی یعنی ساخت RNA, DNA و پروتئین را در سلول‌های سرطان انسانی متوقف و مهار می‌کند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که اثر بازدارندگی زعفران روی سنتز اسید نوکلئیک می‌تواند یک اساس بیوشیمیایی برای اثر بازدارندگی آن روی تکثیر داشته باشد [۱۸]. از آن‌جا که در طرح حاضر عصاره آبی زعفران منجر به کاهش رگ‌زایی شده به نظر می‌رسد نتایج هم‌راستا با نتایج تحقیقات متعدد دانشمندان در خصوص سایتوتوکسیته زعفران بوده و تیمار حلقه آئورت احتمالاً از طریق مهار سنتز RNA و DNA در سلول اندوتلیوم عروق از تکثیر سلولی و رگ‌زایی ممانعت کرده باشد.

بر روی سافرانال که یکی از اجزای اصلی زعفران است نیز تحقیقاتی صورت گرفته است. صادق‌نیا و همکاران وی در سال ۱۳۸۴ نشان دادند که سافرانال اکسیژن‌رسانی بافتی را افزایش می‌دهد و هم‌چنین دارای اثرات جمع‌کنندگی رادیکال‌های آزاد است و می‌تواند استرس اکسیداتیو ناشی از ترکیبات ژنوتوکسیک را مهار نماید [۱۹]. سافرانال دارای اثرات محافظتی بر روی پراکسیداسیون لیپیدها است. از آن‌جا که میزان رگ‌زایی با اکسیژن‌رسانی بافتی مرتبط است و هیپوکسییکی از علل آغاز رگ‌زایی به شمار می‌رود این احتمال وجود دارد ازدیاد اکسیژن‌رسانی حاصل از تیمار با زعفران و ماده موثره آن یعنی سافرانال کاهنده آنژیوژنز باشد [۱۹]. از طرف دیگر با توجه به این‌که زعفران دارای لکتین است و حداقل بخشی از خواص آنتی‌توموری آن می‌تواند وابسته به لکتین باشد بنابراینیکی دیگراز پیشنهادات می‌تواند القای آپوپتوز باشد [۲۰].

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-01-31]

Das و همکارانش در سال ۲۰۰۴ مکانیسم‌های پیشنهادی متنوعی برای اثرات ضد توموری زعفران و اجزای آن شامل مهار رونویسی اسید نوکلئیک، اثر کاروتنوئیدها بر توپوایزومراز ۲ و القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول بیان کردند [۲۱]. تحقیق حاضر نشان داد عصاره آبی زعفران با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر احتمالاً دارای اثر مهاری تکثیر و القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های اندوتلیالی می‌باشد و از آن‌جا که رگ‌زایی در تومور باعث رشد و گسترش آن می‌شود، لذا می‌توان با مهار فرایند آنژیوژنز رشد و گسترش تومور را کاهش داد و یا حتی مهار نمود.

در سال‌های اخیر مشاهده شده است که میدان‌های الکترومغناطیس دارای اثرات متفاوت و گاهی مفید بر سیستم‌های انسانی هستند.از سویی دیگربا توجه به این‌که همراه شیمی‌درمانی، روش‌های تکمیلی نظیر رادیوتراپی از روش‌های معمول در کنترل رشد تومورها می‌باشند [۲۲]، لذا اثرات توام کاربردزعفران و میدان الکترومغناطیس با فرکانس کم و شدت ۲۰۰ گاؤس در مدت زمان ۲ و ۳ ساعت در مهار رگ‌زایی مورد استفاده قرار گرفت.

Ruggirrio و همکارانش مهار آنژیوژنز توسط میدانالکترومغناطیس با شدت ۰/۲ را بیان کردند [۲۳]. در تحقیقی دیگر که در سال ۲۰۰۹ از میدان الکترومغناطیس با شدت ۴۰۰ گاؤس برای مهار آنژیوژنز پرده کوریوالانتوئیک جنین جوجه صورت گرفت علت مهار پدیده رگ‌زایی تغییر در بیان ژنعنوان گردید [۲۴].

بالانژاد و همکاران بیان کردند که شدت میدان الکترومغنلطیسیک فاکتور مهم در مهار رگ‌زایی است که همسو با اثرات سینرژیک عصاره آبی زعفران به همراه میدان الکترومغناطیس در تجربه حاضر است [۲۵]. پارامترهای مختلف در میدان‌های الکترومغناطیسی به کار رفته در پژوهش‌های متفاوت می‌تواند منجر به ایجاد نتایج متفاوت شود. از جمله این پارامترها می‌توان به شدت میدان، فرکانس میدان، تغییر زمان در میدان‌های پالسی و استاتیک موقعیت و زمان در معرض قرارگیری اشاره کرد [۲۶]. تعدادی از آزمایشات اثرات بیولوژیک امواج الکترومغناطیس را به نیتریک‌اکساید مربوط می‌دانند و نیتریک‌اکساید به عنوان عامل تغییر قطررگ‌های خونی معرفی شده است [۲۷].

در پژوهش انجام شده دیگری که بر روی جنین جوجه صورت گرفته بود جنین‌های گروه آزمون که تحت تاثیر امواج قرار داشتند در تمام مراحل جنینی، مشابه جنین‌هایی بودند که فقط توسط عصاره زعفران تیمار شده‌اند، در این گزارشات هیچ تغییر معنی‌دار در میزان مرگ و میریا مراحل تمایز جنینی و مرفولوژی نمونه‌ها به علت قرارگیری جوجه‌های تحت میدان الکترومغناطیسی با شدت بیش‌تر از ۴ تسلا مشاهده نشد، لذا نتیجه این تجربیات نشان داده‌اند که رگ‌زایی جنینی در طی اثرات نامطلوب ناشی از تحریک‌کننده‌های رگ‌زایی مورد توجه قرار گیرد [۲۸]. در تحقیق حاضر میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در نمونه‌های تیمار با میدان الکترومغناطیس و زعفران در مقایسه با گروه‌های شاهد و تیمار با زعفران به تنهایی کاهش چشم‌گیری نشان داد، لذا به نظر می‌رسد که میدان‌های الکترومغناطیس با ویژگی‌های خاص (شدت میدان، زمان تیمار، ژنتیک نمونه و نوع میدان) با اجزای دو قطبی سلول مثل غشای پلاسمایی،DNA و هسته و میکروتوبول‌ها تداخل عمل پیدا کرده و بسته به ویژگی‌های میدانااین تداخل می‌تواند به صورت تحریکیا مهاری عمل کند [۲۹]. این تغییرات احتمالی در مجموع مکانیسم‌های غیرگرماییمیدان‌های الکترومغناطیس در بیان ژن و نیز ایجاد ارتباطات سلول–سلول می‌توانند تعادل موجود در مسیرهای پیام‌دهی آنژیوژنز را تحت اثر قرار دهند [۳۰]. مراحل رشد و نمو جنینی تحت اثر میدان الکترومغناطیسی قرار نمی‌گیرد [۲۸]، اما می‌تواند جهت درمان، افزایش رگ‌زایی پس از تولد در نتیجه کم‌خونی‌های بافتی و نیز مهار اثرات نامطلوب ناشی از تحریک‌کننده‌های رگ‌زایی مورد توجه قرار گیرد [۳۰].

برخی تجربیات قبلی بیانگر این موضوع هستند که شدت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ گاؤس اثری بر فرایند آنژیوژنز ندارد اما شدت ۲۰۰ گاؤس دارای اثر مهاری بر آنژیوژنز است [۳۱]. در ادامه موسوی و همکاران اثر سینرژیک عصاره آبی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-01-31]

زعفران با میدان الکترومغناطیس ۴۰۰ گاؤس را در پرده کوریوالانتوئیک جنین جوجه بررسی کردند که اثر مهاری عصاره زعفران به صورت توام با میدان الکترومغناطیس نشان داده شد [۳۲]. در تحقیق حاضر که بر روی حلقه آئورت موش صحرایی انجام گرفت، حداکثر مهار رگ‌زایی در شدت میدان ۲۰۰ گاؤس به مدت ۳ ساعت همراه با عصاره زعفران با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید، نتایج اشاره شده هم‌سو با اثرات توام زعفران با میدان الکترومغناطیس در تجربه حاضر است.

فاکتورهای متنوعی نظیر 3VEGF4, FGF3, PTGF2, STAT در پدیده رگ‌زایی به عنوان عوامل آنژیوژنیک و آنتی‌آنژیوژنیک زیادی دخالت دارند. برخی از این مولکول‌ها مستقیماً روی سلول آندوتلیال تاثیر می‌گذارد و برخی دیگر باعث فعال کردن سلول‌های دیگر نظیر سلول‌های التهابی منطقه می‌شود که ممکن است فاکتورهای رگ‌زایی را ترشح کرده یا باعث مهار ترشح آن‌ها شود [۳۳]. عواملی مانند (هیپوکسی، کاهش PH، افزایش اسید لاکتیک، پاسخ‌های ایمنی- التهابی و موتاسیون در انکوژن‌ها و سرکوب‌کننده‌های تومور که باعث افزایش غلظت‌های فاکتورهای آنتی‌آنژیوژنیک می‌شوند)، این تعادل را ناپایدار می‌کند. تحت شرایط هیپوکسی بافت اقدام به سنتز و رهاسازی فاکتورهای آنژیوژنیک هم‌چون فاکتور رشد سلول اندوتلیالی می‌کند که این فاکتورها پس از اتصال به گیرنده‌های خود بر روی سلول‌های اندوتلیال منجر به فعال شدن آن‌ها می‌شود و با شروع فعالیت اندوتلیال، انواع خاصی از متالوپروتئازها از سلول‌های فوق ترشح شده و غشای پایه را در منطقه مذکور تجزیه می‌کند و با هضم غشای پایه سلول‌های اندوتلیال اقدام به مهاجرت و تکثیر می‌نماید[۳۴]. سلول‌های آندوتلیال فعال‌شده برای قرارگیری در محیط‌های سه بعدی (ماتریکس) بنا نهاده شده است.این ماتریکس ممکن است ژل کلاژن یا فیبرین، ماتریژلیا 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 ومهاجرت و یا تمایز سه بعدی تحریک کرد [۳۵].

در زمینه استفاده از ماتریکس کلاؤنی به عنوان یکی از انواع مدل‌های کشت کارهای فراوانی شده است. محمدی مطلق و همکاران با استفاده از داربست کلاژنی به عنوان یک مدل مناسب برای کشت حلقه آئورت عصاره گیاه موسیر را بر روند رگ‌زایی آن مورد بررسی قرار دادند [۳۶].

کشت پیوندهای اکسپلانت عروقی(روش مورد استفاده برای جداسازی سلول‌ها از یک قطعه بافت موجود زنده و کشت آن‌ها در شرایط کشت آزمایشگاهی) از قبیل حلقه آئورت در ماتریکس ژله‌ای شده و سپس مشاهده سلول‌های آندوتلیال به عنوان یک مدل سه بعدی محسوب می‌شود. این مدل اولین بار توسط نیکوزیا ارائه گردید و هنوز به طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله مدل‌های in vitro سه بعدی به مدل دانه‌های میکروکریر اشاره کرد، که جهت رشد سلول‌ها در یک سیستم سه بعدی مدل مناسبی محسوب شده است و امروزه به عنوان یک مدل سه بعدی مناسب مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳۷].

آزمایش استاندارد ex vivo آئورت موش صحرایی شکاف بین مدل‌های in vivo و in vitro را پر می‌کند و مزایایی از هر دو سیستم را در بر می‌گیرد و اثرات رگ‌زایی و ضد رگ‌زایی فاکتورهای محلول مختلف و یا فاکتورهای ماتریکسی به آسانی وبا استفاده از این مدل قابل ارزیابی وسنجش خواهد بود، به همین دلیل ما در این مطالعه از این روش استفاده کردیم.

نتیجه‌ی پژوهش بیانگر آن است که عصاره آبی زعفران دارای اثر مهاری در آنژیوژنز حلقه آئورت موش صحرایی است و تشکیل عروق خونی را به طور موضعی و وابسته به دوز در جایگاه تیمار کاهش می‌دهد و این تغییرات توسط میدان الکترومغناطیسی با فرکانس پایین و شدت ۲۰۰ گاؤس در زمان ۳ ساعت تشدید می‌گردد. بنابراین به این نتیجه‌گیری

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-01-31]

خواهیم رسید که کاربرد توام عصاره زعفران همراه با میدان الکترومغناطیس می‌تواند برای تحقیقات بیش‌تر برای درمان سرطان‌ها مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری و سایر همکارانی که در اجرای این طرح صمیمانه همکاری داشتند سپاس‌گزاری می‌شود.

منابع

[1] Ridely AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. Cell 1992; 70: 389-399.

[2] Quesada AR, Munoz-Chapuli R, Medina MA. Antiangiogenic drugs: from bench to clinical trials. Med Res Rev 2006; 26: 483-530.

[3] Balanejad S, Parivar K, Baharara J, Koochesfahani H. [The effect of rapamycin on angiogenesis in chick chorioalantoic membrane]. J Arak Univ Med Sci 2009; 12: 73-80.(Persian).

[4] Williams CD, Markov MS, Hardman WE, Cameron IL. Therapeutic electromagnetic field effects on angiogenesis and tumor growth. Anticancer Res 2001; 21: 3887-3892.

[5] Kaefer CM, Milner JA. The role of herbs and spices in cancer prevention. J Nutr Biochem 2008; 19: 347-361.

[6] Tavakkol-Afshari J, Brook A, Mousavi SH. Studyof cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. Food Chem Toxicol 2008; 46: 3443-3447.

[7] Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (Crocus sativusL.).Exp Biol Med (Maywood) 2002; 227: 20-25.

[8] Abolhasani A, Bathaie SZ, Yavari I, Moosavimovahedi A, Ghaffari M. Separation and Purification of some components of Iranian saffron. Asian J Chem 2005; 17: 727-729.

[9] Ochiai T1, Soeda S, Ohno S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin prevent the death of PC-12 cells through sphingo myelinaseceramide signaling by increasing glutathione synthesis. Neurochem Int 2004; 44: 321-330.

[10] Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Effect of safranal, a constituent of Crocus sativus (saffron), onmethyl methanesulfonate (MMS)-induced DNA damage in mouse organs: An alkaline singlecell gel electrophoresis (comet) assay. DNA Cell Biol 2007; 26: 841-846.

[11] Tavakkol-Afshari J, Brook A, Mousavi SH. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract inhuman cancer cell lines. Food Chem Toxicol 2008; 46: 3443-3447.

[12] Mohammadi R, Roudbari M, Vahidi M, Mohammadhasan Z, Darabi N. Evaluation of antitumor activity of Candida albicans cell wall fraction on human fibrosarcoma cell in vitro. J Army Univ Med Sci 2012; 10: 103-110.

[13] Wu CC, Ding SJ, Wang YH, Tang MJ, Chang HC. Mechanical properties of collagen gels derived from rats of different ages. J Biomater Sci Polym Ed 2005; 16: 1261-1275.

[14] Go RS, Ritman EL, Owen WG. Angiogenesis in rat aortic rings stimulated by very low concentrations of serum and plasma. Angiogenesis 2003; 6:25-29.

[15] Bathaie SZ, Bolhasani A, Hoshyar R, Ranjbar B, Sabouni F, Moosavi-Movahedi AA. Interaction of saffron carotenoids as anticancercompounds with ctDNA, Oligo (dG.dC)15, and Oligo (dA.dT)15. DNA Cell Biol 2007; 26: 533-5340.

[16] Shahrokh Abady Kh.Evalution of cytotoxicity effect of total Saffron s extract on HepG2 cell line.Genet 3rd millennium 2003; 65-33.(Persian).

[17] Salomi MJ, Nair SC, Panikkar KR. Inhibitory effects of Nigella sativa and saffron (Crocus sativus) on chemical carcinogenesis in mice.Nutr Cancer 1991; 16: 67-72.

[18] Melnyk JP, Wang S, Marcone MF. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. Food Res Intern 2010; 43: 1981-1989.

[19] Das I, Chakrabarty RN, Das S. Saffron can prevent chemically induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. Asian PacJ Cancer Prev 2004; 5: 70-76.

[20] Eccles NK.A critical review of randomized controlled trials of static magnetic for pain relief. J Altern Complement Med 2005; 11: 495-509.

[21] 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: 390-396.

[22] Ribatti D.The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo assay to studyantiangiogenesis. Pharmaceuticals 2010; 3: 482-513.

[23] 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. J Shahrekord Univ Med Sci 2009; 3: 70-77.(Persian).

[24] Baharara J, Ashraf A, Balanejad S, Samareh-Mosavi S. The inhibitory effect of low frequency electromagnetic field (50Hz) on angiogenesis in chorioalantoic membrane of chick. Zahedan J Res Med Sci 2010; 12: 12-18.(Persian).

[25] Kavaliers M, Choleris E, Prato FS, Ossenkopp K. Evidence for the involvement of nitric oxide and nitric oxide synthase in the modulation of opioidinduced antinociception and the inhibitory effects of exposure to 60-Hz magneticfields in the land snail. Brain Res 1998; 809: 50-57.

[26] Emura R, Ashida N, Higashi T, Takeuchi T. Orientation of bull sperms in static magnetic fields. Bioelectromagnetics 2001; 22: 60-65.

[27] Callaghan MJ, Chang EI, Seiser N, Aarabi S, Ghali S, Kinnucan ER, et al. Pulsed electromagnetic fields accelerate normal and diabetic wound healing by increasing endogenous FGF-2 release. Plast Reconstr Surg 2008; 121: 130-141.

[28] 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. J ShahrekordUniv Med Sci 2009; 3: 70-77.(Persian).

[29] Baharara J, Ashraf A, Balanejad S, Samareh-Mosavi S. The inhibitory effect of low frequency electromagnetic field (50Hz) on angiogenesis in chorioalantoic membrane of chick. Zahedan J Res Med Sci 2010; 12: 12-18.(Persian).

[30] Mousavi M, Baharara, Zafar-Balannezjad S, Nejadshahrokh abadi KH. The synergic effects of Saffron aqua extract and low frequency electromagnetic field on angiogenesis in chick chorioalantoic membrane.J Shahrekord Univ Med Sci 2013; 15:1-10.(Persian).

[31] Ruhrberg C. Endogenous inhibitors of angiogenesis. J Cell Sci 2001; 114: 3215-3216.

[32] Fan TP, Yeh JC, Leung KW, Yue PY, Wong RN. Angiogenesis: from plants to blood vessels. Trends Pharmacol Sci 2006; 27: 297-309.

[33] Nicosia RF, Tchao R, Leighton J. Histotypic angiogenesis in vitro: Light microscopic, ltrastructural, and radioautographic studies. In Vitro 1982; 18: 538-549.

[34] Mohammadi Motlagh HR, Mansouri K, Shakiba Y, Keshevarz M, Khodarahmi R, Siami A, Mostafaie A. Anti-angiogenic effect of aqueous extract of shallot (Allium ascalonicum) bulbs in rat aorta ring model. Yakhteh Med J 2009; 11: 184-189.

[35] Nicosia RF, Ottinetti A. Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in Matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. In Vitro Cell Dev Biol 1990; 26: 119-128.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-01-31]

Effects of saffron aqueousextract and low frequency electromagnetic field on angiogenesison in a Wistar rat aortic ring model

Safa Moshtagh (M.Sc)[1], Javad Baharara (Ph.D)[*1], Saeedeh Zafar-Balanejad (Ph.D)[1], Tayebeh Ramezani (M.Sc)[2]

1- Dept. of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad Iran

2- Kharazmi University, Tehran, Iran

(Received: 2 Nov 2013; Accepted: 13 Apr 2014)

Introduction: Angiogenesis is required for embryogenesis and many physiological and pathological conditions such as tumor growth. The effects of electromagnetic fields on cell development and growth have been investigated. In this experimental study, the synergic effects of saffron aqueous extract and low-frequency electromagnetic field on angiogenesis were investigated on rat aortic ring.

Materials and Methods: In this experimental study, Wistar rat aorta was divided into pieces 1 mm and cultured in collagen matrices. On day 3, following observed sprouting angiogenesis the samples were classified into 8 groups: Control group, the first sham-exposed group (treated with PBS), the second sham-exposed group (treated with electromagnetic field off), and the third sham-exposed group treated with PBS and electromagnetic field off, the experimental groups 1 and 2 treated with 200 Gauss field for 2 hours and the concentrations of 200 and 300 µg/ml of saffron, respectively and the experimental groups 3 and 4 treated with 200 Gauss field for 3 hours and 200 and 300 µg/ml of saffron, respectively. All samples were photographed by invert microscope immediately and also 24 hours after the treatment. The number and length of vessels was determined by Image J software.

***Results*:** There was no significant differences between the control samples and the laboratory control samples 1, 2 and 3 with regards to average number and length of ($P>0.05$). However, the number of vessels in experimental groups 2 and 4 showed a significant reduction ($P<0.001$). Reducing in the average length of vessels between the experimental groups 2 and 4 ($P<0.001$) and also between the experimental group 1 and 3 ($P<0.01$) was significant.

Conclusion: Results showed that aqueous extract of saffron has dose dependent inhibitory effects on angiogenesis. This inhibitory effect was increased by the electromagnetic field, suggesting a synergistic effect between them.

***Keywords*:** Angiogenesis inhibitors, Crocus, Aorta, Endothelial cells, Electromagnetic field, Rats

* Corresponding author. Fax: +98 21 8437092 Tel: +98 511 8437092

baharara@yahoo.com

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2023-01-31]

How to cite this article:

Moshtagh S, Baharara J, Zafar-balanejad S, Ramezani T. Effects of saffron aqueousextract and low frequency electromagnetic field on angiogenesison in a Wistar rat aortic ring model. koomesh. 2014; 15 (4): 22-529

URL http://koomeshjournal.semums.ac.ir/browse.php?a_code=A-10-2193-1&slc_lang=fa&sid=1