

اثر عصاره آبی زعفران و میدان الکترومغناطیس با فرکانس کم بر آنژیوزنز در حلقه آنورت موش صحرایی نژاد ویستار

صفا مشتاق^۱ (M.Sc.)، جواد بهارآرا^{۱*} (Ph.D.)، سعیده ظفر بالانژاد^۱ (Ph.D.)، طیبه رمضانی^۲ (M.Sc.)

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست‌شناسی

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

چکیده

سابقه و هدف: آنژیوزنز 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 بر روی آنژیوزنز حلقه آنورت موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی آنورت 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 آنورت در روز سوم نمونه‌ها به ۸ 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 و ۲ (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 تعداد و طول انشعابات عروقی در نمونه‌های شاهد با میانگین تعداد و طول انشعابات در نمونه‌های شاهد آزمایشگاهی ۱، ۲ و ۳ اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($P > 0.05$)، اما تعداد انشعابات عروقی در گروه‌های تجربی ۲ و ۴ کاهش معنی‌دار را نشان داد ($p < 0.001$). کاهش میانگین طول انشعابات عروقی در گروه‌های تجربی ۲ و ۴ ($p < 0.001$) و در گروه‌های تجربی ۱ و ۳ ($p < 0.01$) معنی‌دار بود.

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

واژه‌های کلیدی: مهارکننده‌های رگ‌سازی، زعفران، آنورت، سلول‌های اندوتلیال، میدان‌های الکترومغناطیس، موش‌های صحرایی.

مقدمه

آنژیوزنز طبیعی برای تمایز موفق جنین ضروری است. تکثیر و مهاجرت سلولی از اولین وقایع آنژیوزنز 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

تشکیل تومورها، اثر ضد جهش‌زایی و مهار سنتز نوکلئیک اسیدها در 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 در معرض امواج الکترومغناطیس است، در این تحقیق اثر توام میدان الکترومغناطیس با فرکانس پایین به همراه عصاره آبی زعفران بر آنژیوزنز در مدل حلقه آئورت موش صحرایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری. برای تهیه عصاره ابتدا ۳ 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 (lyophilization) با استفاده از دستگاه freeze dryer استفاده و عصاره‌ای با بالاترین درجه کیفیت و کم‌ترین میزان آلودگی تهیه گردید. سپس از پودر برای تهیه محلول زعفران با غلظت‌های مورد نیاز در PBS حل شد و محلول حاصل فیلتر گردید [۱۱].

استخراج کلآزن. در پژوهش تجربی حاضر از دم موش صحرایی کلآزن استخراج شد. برای استخراج کلآزن 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 سانتریفیوژ با ۱۶۰۰۰ rcf گذاشته شد تا کلآزن آماده شود. روش بردفورد برای تعیین غلظت کلآزن استخراجی استفاده شد که غلظت آن حدود ۱.۲ گرم بر میلی‌لیتر بود برای ساخت داربست از محلول کلآزن با غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید [۱۲].

دیگر آنژیوزنز 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 روماتیسم و تومورها رخ می‌دهد [۲].

امروزه ابداع و استفاده از روش‌های 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 آنژیوزنز در سیاه‌رگ‌ها و تومورهای سینه‌ای و یا افزایش آنژیوزنز 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 آنژیوزنز 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 نارنجی 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 دانشمندان نشان داده است که ترکیبات اصلی زعفران شامل کروسین، کروسستین، پیکروکروسین و سافرانال در جلوگیری از تحلیل نوروها و تقویت حافظه نقش دارند [۸]. اثرات ضد سرطانی زعفران هم‌چون مهار

آن‌ها به ترتیب تحت تیمار عصاره آبی زعفران در غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر افزوده گردید و بلافاصله و بعد از ۲۴ ساعت قرارگیری در انکوباتور از آن‌ها عکس برداری شد. طول و تعداد انشعابات عروقی توسط نرم‌افزار Image 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, Version 16) و به کمک آزمون ANOVA و تست تعقیبی Tukey در سطح ($P < 0.05$) 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 ($13/4 \pm 1/23$) با گروه شاهد آزمایشگاهی ($13/8 \pm 1/24$) (سیستم مولد میدان در وضعیت خاموش و PBS) کاهش معنی‌دار نشان نداد ($P > 0.05$)، لذا در نمونه‌های بعدی نمونه‌های تجربی با شاهد مقایسه شدند. مقایسه میانگین تعداد انشعابات عروقی بین گروه شاهد و گروه تجربی ۱ ($11/8 \pm 0/04$) کاهش معنی‌دار را نشان نداد ($P > 0.05$). مقایسه تعداد انشعابات عروقی بین گروه تجربی ۲ ($5 \pm 0/70$) و گروه تجربی ۳ ($7/2 \pm 2/39$) و ۴ ($4/4 \pm 2/14$) کاهش معنی‌دار را با توجه به شکل ۱ نشان داد ($P < 0.001$).

مقایسه طول انشعابات عروقی بین گروه شاهد ($124/1 \pm 29/7$) و گروه شاهد آزمایشگاهی ($123/8 \pm 29/1$) اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($p > 0.05$)، لذا در بررسی‌های بعدی نمونه‌های تجربی با شاهد مقایسه

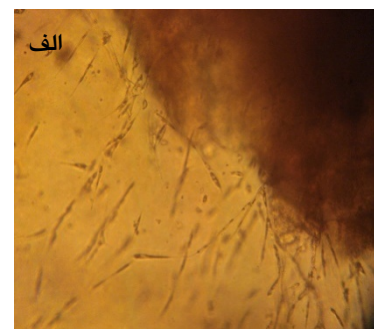
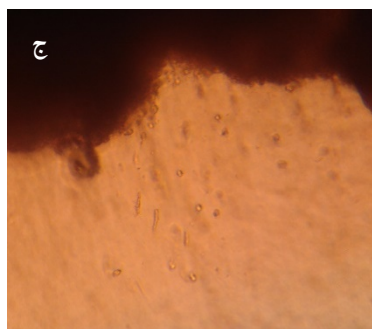
جدا ساختن حلقه آئورت موش صحرایی. در تحقیق حاضر از موش‌های صحرایی که ۴ تا ۶ هفته سن و ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم وزن داشتند استفاده شد پس از بی‌هوش کردن موش‌های صحرایی و استریل کردن حفره شکمی، قفسه سینه باز شد و قطعه‌ای از آئورت با طول مناسب جدا گردید. آئورت جدا شده پس از انتقال به بافر استریل حاوی آنتی‌بیوتیک‌های 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 نسبت ۸، ۱، ۱، ۱ مخلوط کرده. پس از تشکیل داربست حلقه‌های آئورت را درون داربست قرارداداده و در انکوباتور به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده تا محلول کلاژن به ژل تبدیل شود. پس از خارج کردن پلیت از انکوباتور، زیر هود محیط کشت DMEM حاوی ۲۰ درصد سرم گوساله (FBS (Gibco, USA) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (Gibco, USA) و استرپتومایسین (Gibco, USA) به سطح روی داربست اضافه گردید [۱۵].

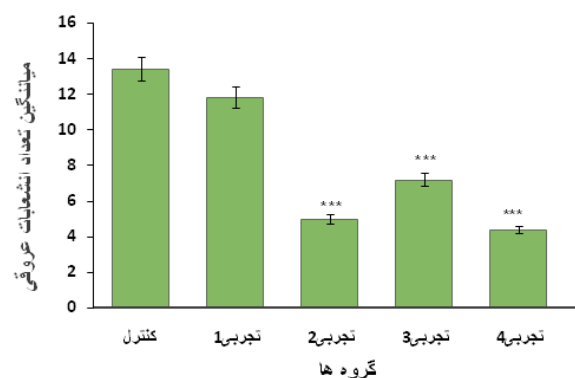
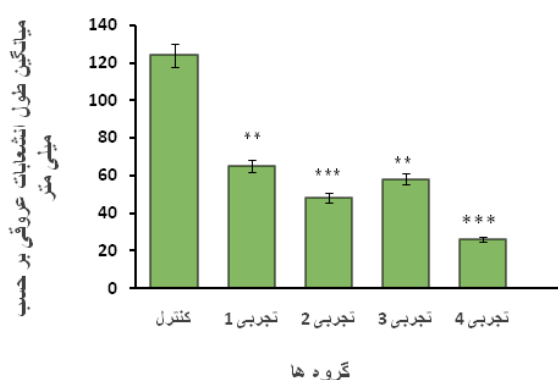
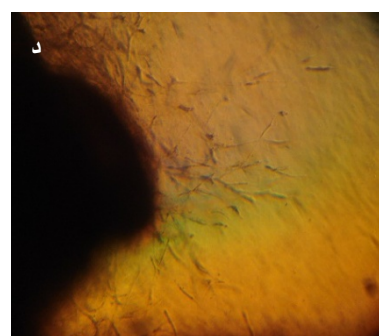
تیمار توام با میدان و زعفران. پس از ۳ روز از زمان کشت و پیدایش اولین جوانه‌های عروقی نمونه‌ها به ۸ گروه آزمون به صورت تصادفی توزیع شدند، که شامل گروه شاهد (نگه‌داری در شرایط طبیعی)، گروه شاهد آزمایشگاهی ۱ (تیمار با PBS)، شاهد آزمایشگاهی ۲ (تیمار در شرایط خاموش سیستم مولد میدان)، شاهد آزمایشگاهی ۳ (تیمار توام با PBS و قرار گرفتن در وضعیت خاموش سیستم مولد میدان) و گروه‌های تجربی ۱ و ۲ تحت اثر میدان ۲۰۰ گاؤس به مدت ۲ ساعت بودند که ۲۴ ساعت بعد از میدان به آن‌ها به ترتیب عصاره آبی زعفران در غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر افزوده گردید و بلافاصله پس از افزودن عصاره زعفران و نیز ۲۴ ساعت بعد از نمونه‌ها با استفاده از دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ اینورت عکس برداری 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

انشعابات عروقی در گروه شاهد با گروه تجربی ۱ (۶۸/۱±۱۰/۱۴) و ۳ (۵۸/۲۷±۹/۲۵) کاهش معنی دار را نشان داد ($p < 0.01$) (شکل ۱).

شدند. مقایسه میانگین طول انشعابات عروقی بین گروه شاهد و گروه تجربی ۲ (۴۸/۱۳±۶/۸) و ۴ (۱/۲۶±۹/۴۲ mm) کاهش معنی دار را نشان داد ($p < 0.01$). مقایسه میانگین طول



شکل ۱. اثر مهارکنندگی بر روی رگ‌زایی توسط تیمار توام عصاره آبی زعفران و میدان الکترومغناطیس در مدل حلقه آئورت موش صحرایی (بزرگنمایی 100 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 ۳۰۰ g/mlµ عصاره زعفران که رگ‌زایی را مهار کرده بود. (ج). مهار رگ‌زایی توسط تیمار توام میدان با شدت ۲۰۰ گاؤس به مدت ۳ ساعت و افزودن ۳۰۰ g/mlµ عصاره زعفران (د) تیمار توام میدان الکترومغناطیس با شدت ۲۰۰ گاؤس به مدت ۲ ساعت و افزودن ۲۰۰ µg/ml عصاره زعفران که قادر به مهار رگ‌زایی نبود.



شکل ۳. مقایسه میانگین طول 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 تجربی ۲ (تیمار توام میدان الکترومغناطیس ۲۰۰ گاؤس به مدت ۲ ساعت و غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر زعفران) 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 ($p < 0.001$)

** اختلاف معنی داری در سطح ($p < 0.01$)

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 تجربی ۲ (تیمار توام میدان الکترومغناطیس ۲۰۰ گاؤس به مدت ۲ ساعت و غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر زعفران) 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 ($p < 0.001$)

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش اثر گیاه 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 تجربیات Argon در سال ۲۰۰۹ از آن‌جا که روش شیمی‌درمانی مقاومت اکتسابی سلول سرطانی به داروی شیمی‌درمانی در پی دارد که مشکل عمده‌ای را در درمان سرطان به وجود آورده است و نیز میزان جهش و ناپایداری ژنتیکی در سلول‌های تومور سرطانی بسیار بالاست و تغییرات به 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 داده‌اند که زعفران و زیر واحدهای اصلی آن به ویژه کروستین سرعت رشد تومورها را در رت کاهش می‌دهد. کاروتنوئیدهای موجود در زعفران به ویژه کروستین 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 این رو این احتمال وجود دارد که در این تحقیق کروستین و کروستین موجود در عصاره آبی زعفران با تغییر شکل فضایی DNA در سلول‌های اندوتلیالی در فرایند سیگنال‌رسانی مسیر رگ‌زایی اختلال ایجاد کرده و روند طبیعی آنژیوژنز را دچار مشکل نمایند و از این‌رو برای مهار

رگ‌زایی در سلول‌های تومور و در نتیجه مهار تومور و متاستاز می‌توان استفاده کرد.

شاهرخ‌آبادی و همکاران در سال ۱۳۸۸ نشان دادند که عصاره تام زعفران دارای فعالیت آنتی‌توموری بر علیه سلول‌های HepG بوده و نیز فعالیت ضدسرطان‌زایی عصاره تام زعفران علیه سرطان‌های القا شده توسط مواد شیمیایی به صورت ماده‌ای است که فعالیت‌های سه فرایند مهم متابولیسم یعنی ساخت DNA, RNA 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 زئوتوکسیک را مهار نماید [۱۹]. سافرانال دارای اثرات محافظتی بر روی پراکسیداسیون لیپیدها است. از آن‌جا که میزان رگ‌زایی با اکسیژن‌رسانی بافتی مرتبط است و هیپوکسیکی از علل آغاز رگ‌زایی به شمار می‌رود این احتمال وجود دارد از دید 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 بنابراین یکی دیگر از پیشنهادات می‌تواند القای آپوپتوز باشد [۲۰].

آزمایشات اثرات بیولوژیک امواج الکترومغناطیس را به نیتریک اکساید مربوط می‌دانند و نیتریک اکساید به عنوان عامل تغییر قطر رگ‌های 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 میر یا مراحل تمایز جنینی و مورفولوژی 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 میدان این تداخل می‌تواند به صورت تحریکی یا مهارتی عمل کند [۲۹]. این تغییرات احتمالی در مجموع مکانیسم‌های غیرگرما میمیدان‌های الکترومغناطیس در بیان ژن و نیز ایجاد ارتباطات سلول-سلول می‌تواند 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 گاوس اثری بر فرایند آنژیوژنز ندارد اما شدت ۲۰۰ گاوس دارای اثر مهارتی بر آنژیوژنز است [۳۱]. در ادامه موسوی و همکاران اثر سینرژیک عصاره آبی

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 مهارتی 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 دیگر با توجه به این‌که هم‌راه شیمی‌درمانی، روش‌های تکمیلی نظیر رادیوتراپی از روش‌های معمول در کنترل رشد تومورها می‌باشند [۲۲]، لذا اثرات توأم کاربرد زعفران و میدان الکترومغناطیس با فرکانس کم و شدت ۲۰۰ گاوس در مدت زمان ۲ و ۳ ساعت در مهار رگ‌زایی مورد استفاده قرار گرفت.

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

بالانژاد و همکاران بیان کردند که شدت میدان الکترومغناطیسی 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

به ترکیب محیط کشت (درصد سرم، اضافه کردن فاکتورهای رشد وسایتوکاین‌ها)، در این نوع مدل‌ها، سلول‌ها را می‌توان برای جوانه زدن یا ایجاد انشعاب، تکثیر و مهاجرت و یا تمایز سه بعدی تحریک کرد [۳۵].

در زمینه استفاده از ماتریکس کلاژنی 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 و سنجش 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 آئورت 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

زعفران با میدان الکترومغناطیسی ۴۰۰ گاؤس را در پرده کوریوالانتوتیک جنین جوجه بررسی کردند که اثر مهاری عصاره زعفران به صورت توام با میدان الکترومغناطیسی 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 الکترومغناطیسی در تجربه حاضر است.

فاکتورهای متنوعی نظیر 3VEGF4, FGF3, PTGF2, STAT در پدیده رگ‌زایی به عنوان عوامل آئریوژنیک و آنتی آئریوژنیک 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 آنتی آئریوژنیک می‌شوند)، این تعادل را ناپایدار می‌کند. تحت شرایط هیپوکسی بافت اقدام به سنتز و رهاسازی فاکتورهای آئریوژنیک هم‌چون فاکتور رشد سلول آندوتلیالی می‌کند که این فاکتورها پس از اتصال به گیرنده‌های خود بر روی سلول‌های آندوتلیال منجر به فعال شدن آن‌ها می‌شود و با شروع فعالیت آندوتلیال، انواع خاصی از متالوپروتئازها از سلول‌های فوق ترشح شده و غشای پایه را در منطقه مذکور تجزیه می‌کند و با هضم غشای پایه سلول‌های آندوتلیال اقدام به مهاجرت و تکثیر می‌نماید [۳۴]. سلول‌های آندوتلیال فعال شده 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

[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 study angiogenesis. *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 chorioallantoic 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 opioid-induced antinociception and the inhibitory effects of exposure to 60-Hz magnetic fields 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 Shahrekord Univ 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 chorioallantoic membrane of chick. *Zahedan J Res Med Sci* 2010; 12: 12-18. (Persian).

[30] Mousavi M, Baharara, Zafar-Balanezhad S, Nejadshahrokh abadi KH. The synergic effects of Saffron aqua extract and low frequency electromagnetic field on angiogenesis in chick chorioallantoic 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, Itrastructural, 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.

خواهیم رسید که کاربرد توام عصاره زعفران همراه با میدان الکترومغناطیس می تواند برای تحقیقات بیش تر برای درمان سرطان ها 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 سپاس گزاری می شود.

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. Study of 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 sativus* L.). *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] Ohchiai 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), on methyl methanesulfonate (MMS)-induced DNA damage in mouse organs: An alkaline single cell 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 in human 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 anticancer compounds with ctDNA, Oligo (dG.dC)15, and Oligo (dA.dT)15. *DNA Cell Biol* 2007; 26: 533-5340.

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

Effects of saffron aqueous extract and low frequency electromagnetic field on angiogenesis 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

How to cite this article:

Moshtagh S, Baharara J, Zafar-balanejad S, Ramezani T. Effects of saffron aqueous extract and low frequency electromagnetic field on angiogenesis 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