

اثرات توام عصاره آبی زعفران و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس پایین بر آنژیوزنز در پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه

مرضیه موسوی، دکتر جواد بهارآرا*، دکتر سعیده ظفربالا نژاد، دکتر خدیجه نژادشاهرخ آبادی

گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۹ اصلاح نهایی: ۹۱/۸/۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۰

چکیده:

زمینه و هدف: مطالعات *in vivo* و *in vitro* بر اثرات ضد سرطانی زعفران تاکید دارند. آنژیوزنز برای تکوین جنین و بسیاری از وقایع فیزیولوژیکی و پاتولوژیک نظیر رشد تومورها، ضروری است. همچنین بسیاری از فرایندهای رشد و نمو تحت تاثیر میدانهای الکترومغناطیسی قرار می گیرند. این مطالعه با هدف بررسی اثرات توام عصاره زعفران و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس پایین بر آنژیوزنز طراحی شد. روش بررسی: در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی تخم مرغ های نطفه دار در ۹ گروه شامل گروه های شاهد و شاهد آزمایشگاهی ۱ و ۲، گروه های تجربی ۱، ۲ و ۳ (تیمار با عصاره زعفران با غلظت های ۱۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$) و گروه های تجربی ۴، ۵ و ۶ (تیمار توام عصاره زعفران همراه میدان الکترومغناطیسی ۴۰۰ گاؤس) بصورت تصادفی تقسیم شدند. در روز دوم انکوباسیون، در شرایط استریل قسمتی از پوسته تخم مرغ ها برداشته شد و پنجره ای باز ایجاد گردید. در روز هشتم ۱۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره به نمونه ها تیمار گردید. در روز دهم تخم مرغ ها ۴ ساعت در معرض میدان الکترومغناطیسی (فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۴۰۰ گاؤس) قرار گرفتند. در روز دوازدهم از تمامی نمونه ها به کمک فتواسترئومیکروسکوپ عکس تهیه و تعداد و طول انشعابات عروقی محل تیمار روی پرده کوریوآلانتوئیک به کمک نرم افزار Image J بررسی گردید. نتایج با استفاده از آزمون های آماری ANOVA و تست تعقیبی tukey تحلیل شدند. یافته ها: میانگین طول عروق خونی در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری نشان نداد ($P>۰/۰۵$) در حالی که در گروه های تجربی ۲ و ۳ کاهش معنی داری مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$). کاهش میانگین تعداد عروق خونی در گروه های تجربی ۱ ($P<۰/۰۵$)، ۲ و ۳ ($P<۰/۰۰۱$) نسبت به گروه شاهد معنی دار بود. مقایسه طول انشعابات گروه شاهد با شاهد آزمایشگاهی ۲، کاهش چشمگیری نشان داد ($P<۰/۰۰۱$). کاهش طول و تعداد عروق در گروه تجربی ۴ ($P<۰/۰۵$) و در گروه های ۵ و ۶ ($P<۰/۰۰۱$) معنی دار بود. نتیجه گیری: نتایج بیانگر آن است که زعفران دارای اثر مهاري وابسته به دوز بر رگ زایی است و این تاثیر توسط میدان الکترومغناطیسی با فرکانس پایین و شدت ۴۰۰ گاؤس افزایش می یابد.

واژه های کلیدی: آنژیوزنز، پرده کوریوآلانتوئیک جوجه، سرطان، زعفران، میدان الکترومغناطیسی.

مقدمه:

Crocus sativus L) گیاهی از تیره زنبق چند ساله با گل های بنفش رنگ بوده که دارای خامه بلند و کلاله سه قسمتی به رنگ نارنجی یا قرمز است و همین قسمت به عنوان زعفران، ارزش تجاری دارد (۳). گیاه زعفران از زمان های قدیم به عنوان یک چاشنی و رنگ در غذاها و

با توجه به اثرات جانبی برخی داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی با حداقل اثرات جانبی و تداخل دارویی مورد توجه قرار گرفته است (۱). در این میان، زعفران که دارای جایگاه خاصی در الگوی تغذیه مردم است، حائز اهمیت می باشد (۲). زعفران با نام علمی

پوست موش‌های صحرایی و سیاهرگ‌های شکمی انسان تحت تاثیر میدان‌های الکترومغناطیسی می‌باشند (۱۳). با توجه به اینکه انسان در زندگی روزمره در معرض امواج الکترومغناطیسی است. در این پژوهش اثر توام میدان الکترومغناطیسی با فرکانس پایین به همراه عصاره آبی زعفران بر آنژیوزنز در پرده کوریوآلانتوییک جوجه بررسی شد.

روش بررسی:

این پژوهش یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی است که در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌شناسی تکوینی جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در سال ۹۱-۹۰ انجام شد. در میان روش‌های مناسب مطالعه آنژیوزنز روش بررسی پرده کوریوآلانتوییک (Chorioallantoic Membrane=CAM) بعنوان یک مدل بسیار مناسب *in vivo* است که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت (۱۴). برای انجام آزمایشات از تخم مرغ‌های نطفه دار نژاد Ross به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده گردید. نمونه‌های مورد مطالعه از شرکت مرغداران طوس تهیه شدند. از آن جا که پرده کوریوآلانتوییک از روز پنجم انکوباسیون شروع به تشکیل نموده و در روز هشتم بیش از نیمی از وسعت درون تخم مرغ را اشغال می‌کند و همچنین در این روز قلب کاملاً تشکیل و جدایی خون سیاهرگی و سرخرگی اتفاق می‌افتد، لذا بررسی شبکه عروقی در روز هشتم انکوباسیون مورد توجه قرار گرفت، روز دهم انکوباسیون برای تیمار با میدان الکترومغناطیسی و روز دوازدهم برای عکس برداری و اندازه‌گیری انتخاب شدند (۱۵). تعداد ۹۰ عدد تخم مرغ نطفه دار در ۹ گروه آزمون به صورت تصادفی توزیع شدند که شامل گروه شاهد (نگهداری در شرایط طبیعی)، گروه شاهد آزمایشگاهی ۱ (تیمار با حلال فسفات بافر سالین)، گروه‌های تجربی ۱، ۲ و ۳ (تیمار با عصاره آبی زعفران در غلظت‌های ۱۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، گروه‌های تجربی ۴، ۵ و ۶ (تیمار توام با عصاره

همچنین در درمان طیف وسیعی از اختلالات همچون سرفه، نفخ شکم، اختلالات معده، یخوابی، خونریزی مزمن رحم، اختلالات زنانگی، تب سرخ (مخملک) و حتی سرطان‌ها مورد استفاده بوده است (۴). از سوی دیگر نتایج بررسی‌های دانشمندان مشخص نموده است که ترکیبات اصلی زعفران شامل کروستین، پیکروکروسین و سافرانال در جلوگیری از تحلیل نوروها و تقویت حافظه نقش دارند (۵). همچنین اثرات ضد افسردگی عصاره آبی و اتانولی گلبرگ‌های گل زعفران در موش به اثبات رسیده است (۶). زعفران به عنوان محافظ، از وارد شدن آسیب به کروموزوم‌ها جلوگیری کرده و همچنین تعدیل‌کننده پراکسیداسیون چربی‌ها بوده و یک آنتی‌اکسیدان قوی و منبع سرشار از ریوفلاوین است (۷). اثرات ضد سرطانی زعفران همچون مهار تشکیل تومورها، آثار ضد جهش‌زایی و مهار سنتز نوکلئیک اسیدها در سلول‌های بدخیم انسان به اثبات رسیده است (۸).

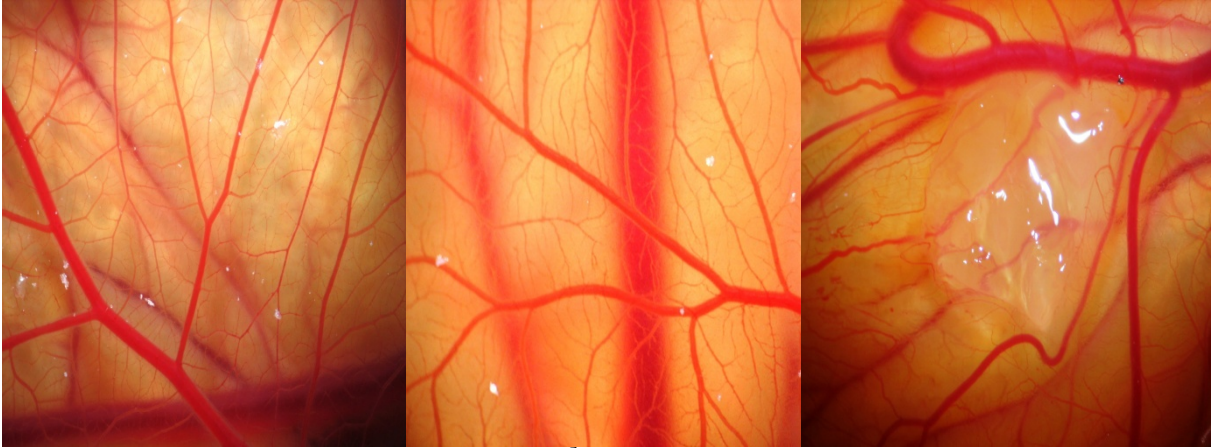
اولین رگ‌های خونی طی پدیده ای موسوم به وسکولوژنز به شکل نوپدید از سلول‌های پیش‌ساز آندوتلیال با آرایش خاص بوجود می‌آیند و بتدریج شروع به انتشار، توسعه و تشکیل شاخه‌های جدید می‌کنند، که به آن آنژیوزنز می‌گویند (۹). در افراد بالغ تشکیل رگ‌های خونی جدید از رگ‌های قبلی بطور دقیقی کنترل می‌شود و رگ‌زایی فقط در شرایط فیزیولوژیکی خاص نظیر بارداری و شرایط پاتولوژیکی ویژه نظیر ترمیم زخم، رتینوپاتی دیابتیک، پزوریازیس، آرتریت روماتوئید و سرطان‌ها اتفاق می‌افتد. از آنجا که آنژیوزنز در پدیده‌های پاتولوژیک نظیر رشد و متاستاز تومورهای سرطانی نقش مهمی ایفا می‌کند، لذا می‌تواند هدف درمان‌های ضدتوموری قرار گیرد (۱۰). از سوی دیگر پژوهش‌های انجام گرفته طی چند سال اخیر مشخص کرده است که استفاده از میدان‌های الکترومغناطیسی با فرکانس کم دارای اثرات عمیقی بر پدیده رگ‌زایی می‌باشد (۱۱، ۱۲). همچنین برخی تجربیات بیانگر کاهش آنژیوزنز در سیاهرگ‌ها و تومورهای سینه‌ای و یا افزایش آنژیوزنز در ناحیه زیر

محل قرار گیری اسفنج ژلاتینی به کمک فوتواسترئو میکروسکوپ تحقیقاتی (Ziess, Germany)، تصاویری با درشتنمایی معین تهیه شد (تصاویر شماره ۲، ۱، ۳). سپس از متغیرهای مورد بررسی شامل تعداد و طول رگ های خونی که برای تمام نمونه ها در اطراف اسفنج ژلاتینی در نظر گرفته شده بودند اندازه گیری به عمل آمد. با توجه به این که پرده کوریوآلانتوئیک یک ساختار آناتومیکی قرص مانند و پهن با ضخامت ۴۰۰ میکرومتر است، تمام عروق موجود در مربع های اطراف اسفنج ژلاتینی قابل شمارش بوده و در اندازه گیری ها منظور گردیدند. داده ها در نرم افزار آماری SPSS ($P < 0/05$) و به کمک آزمون آماری ANOVA و تست تعقیبی tukey تجزیه و تحلیل شدند.

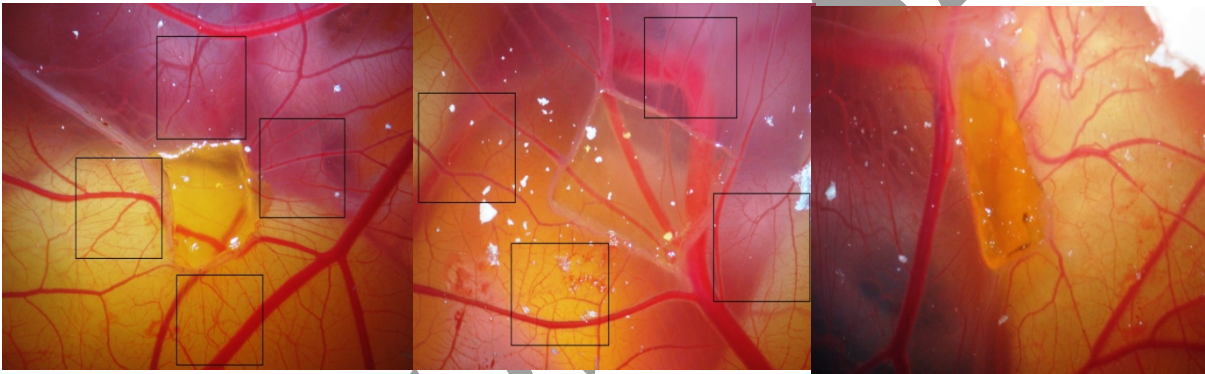
یافته ها:

مقایسه میانگین تعداد ($4/4 \pm 27/46$) و طول ($2/4 \pm 44/5$ mm) انشعابات عروقی در نمونه های شاهد با تعداد ($3/7 \pm 26/6$) و طول انشعابات ($2/6 \pm 42/8$ mm) در نمونه شاهد آزمایشگاهی ۱ هیچ گونه اختلاف معنی دار نشان نداد ($P > 0/05$)، لذا در بررسی های بعدی نمونه های تجربی با شاهد مقایسه شدند. میانگین طول عروق خونی در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه شاهد تغییرات معنی دار نشان نداد ($P < 0/05$) در حالی که در گروه های تجربی ۲ و ۳ کاهش معنی دار مشاهده شد ($P < 0/001$) (نمودار شماره ۱). میانگین تعداد عروق خونی در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری در سطح $P < 0/05$ در دو گروه تجربی ۲ و ۳ در سطح $P < 0/001$ نشان داد (نمودار شماره ۲). مقایسه طول انشعابات گروه شاهد با شاهد آزمایشگاهی ۲ که تنها تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی ۴۰۰ گاؤس بودند ($1/7 \pm 39/5$ mm) کاهش معنی داری نشان داد ($P < 0/001$) که بیانگر اثرات کاهشی رگ زایی توسط این شدت میدان الکترومغناطیسی می باشد. در نمونه های تحت تیمار با عصاره زعفران و میدان الکترومغناطیسی ۴۰۰ گاؤس بطور توأم، در گروه

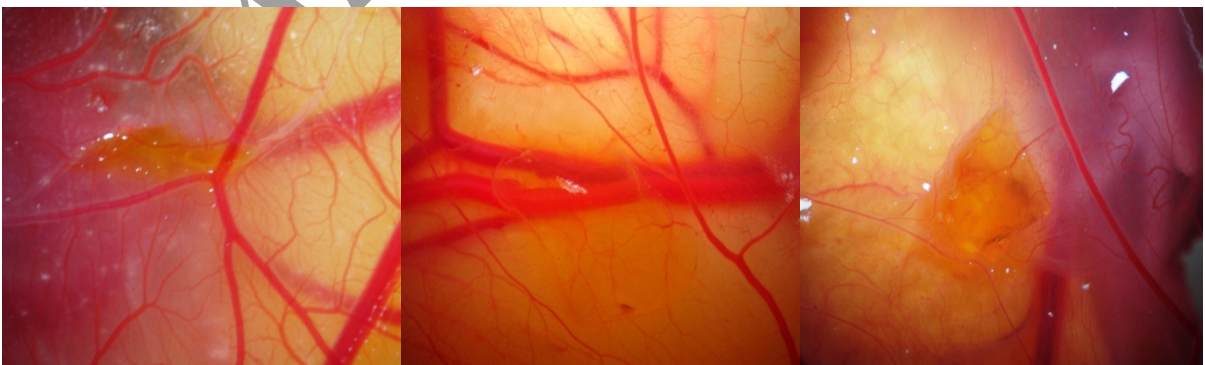
زعفران با دوزهای یاد شده و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس پایین و شدت ۴۰۰ گاؤس) و نیز گروه شاهد آزمایشگاهی ۲ (تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی با فرکانس پایین و شدت ۴۰۰ گاؤس) بود. تخم مرغ های نطفه دار در دمای ۳۸ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۵۵-۶۵ درصد در دستگاه جوجه کشی تحقیقاتی با وضعیت چرخش اتوماتیک قرار گرفتند. در روز دوم انکوباسیون در شرایط کاملاً استریل ایجاد شده توسط هود لامینار بخشی از پوسته تخم مرغ ها برداشته شد و پنجره ای در یک طرف تخم مرغ ها ایجاد گردید که توسط لامل و پارافین استریل بسته شد. سپس تخم مرغ ها به انکوباتور انتقال یافته و چرخش دستی دو بار در روز برای تکوین طبیعی جنین انجام گرفت. در روز هشتم انکوباسیون پنجره ها در شرایط استریل برداشته شده و روی پرده کوریوآلانتوئیک جوجه ها یک اسفنج ژلاتینی که شامل آلبومین سفیده تخم مرغ و محلول آگار در نرمال سالین به نسبت مساوی به همراه ۲۰۰ میکرولیتر پنی سیلین استرپتومایسین که به صورت تازه در شرایط استریل تهیه شده بود در ابعاد ۴×۴ میلی متر قرار داده شد. در نمونه های تحت تیمار با عصاره آبی زعفران، (گروه های تجربی ۱، ۲ و ۳) و نیز نمونه های تیمار توأم (گروه های تجربی ۴، ۵ و ۶) به اسفنج ژلاتینی، مقدار ۱۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره اضافه گردید، سپس محل پنجره مجدداً پوشانیده شد و تخم مرغ ها به انکوباتور برگردانده شدند. در روز دهم انکوباسیون تخم مرغ های گروه های تجربی ۴، ۵ و ۶ به دستگاه جوجه کشی متصل به سیستم مولد میدان الکترومغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز با شدت ۴۰۰ گاؤس منتقل گردیدند (دستگاه مذکور توسط بهارآرا و اشرف در تجربیات قبلی طراحی و ساخته شده و توسط گاؤس متر کالیبره گردیده است). تخم مرغ ها به مدت چهار ساعت در سیستم مذکور قرار داده شدند. در روز دوازدهم انکوباسیون در تمام نمونه های شاهد، شاهد آزمایشگاهی ۱ و ۲ و تیمار با غلظت های مختلف زعفران از محدوده



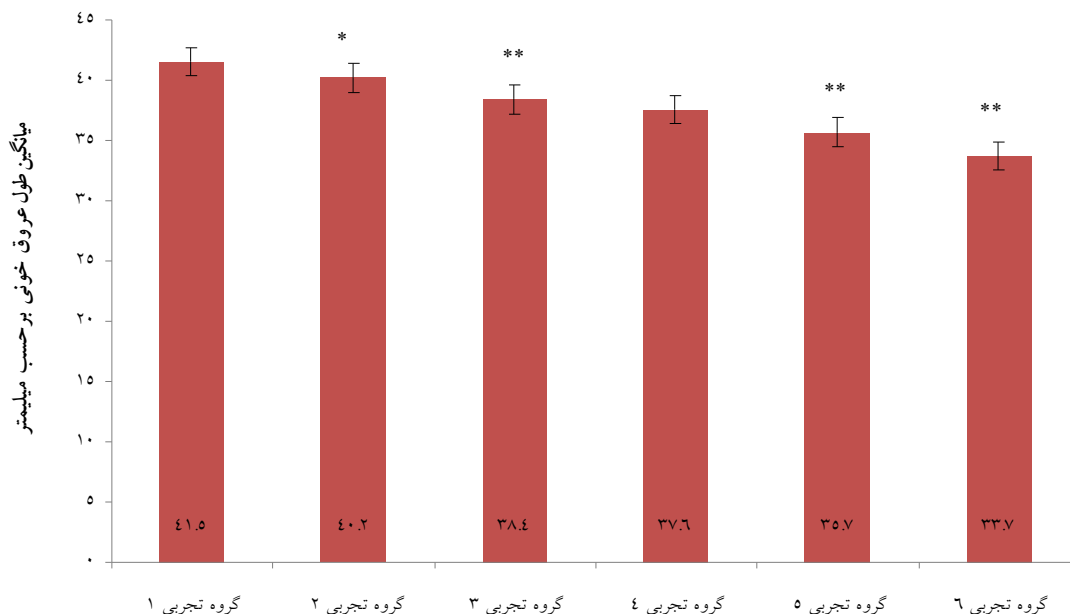
تصویر شماره ۱: تصویر فتواسترئوسکوپ از پرده کوریوآلاتوئیک جنین جوجه در نمونه های شاهد از سمت چپ به راست نمونه های شاهد (شرایط طبیعی نگهداری) شاهد آزمایشگاهی ۱ (تیمار با حلال فسفات بافر سالین) و شاهد آزمایشگاهی ۲ که فقط تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی با شدت ۴۰۰ گاوس قرار گرفته بودند.



تصویر شماره ۲: تصویر فتواسترئوسکوپ از پرده کوریوآلاتوئیک جنین جوجه در نمونه های تحت تیمار با عصاره زعفران به ترتیب از چپ به راست غلظت های ۱۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر، مربع های اطراف اسفنج محل شمارش را نشان می دهند.



تصویر شماره ۳: تصویر فتواسترئوسکوپ از پرده کوریوآلاتوئیک جنین جوجه در نمونه های تحت تیمار توام عصاره زعفران میدان الکترومغناطیسی با شدت ۴۰۰ گاوس به ترتیب از چپ به راست تیمار با غلظت های ۱۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر، کاهش رگزایی اطراف محل اسفنج ژلاتینی به وضوح قابل مشاهده است.



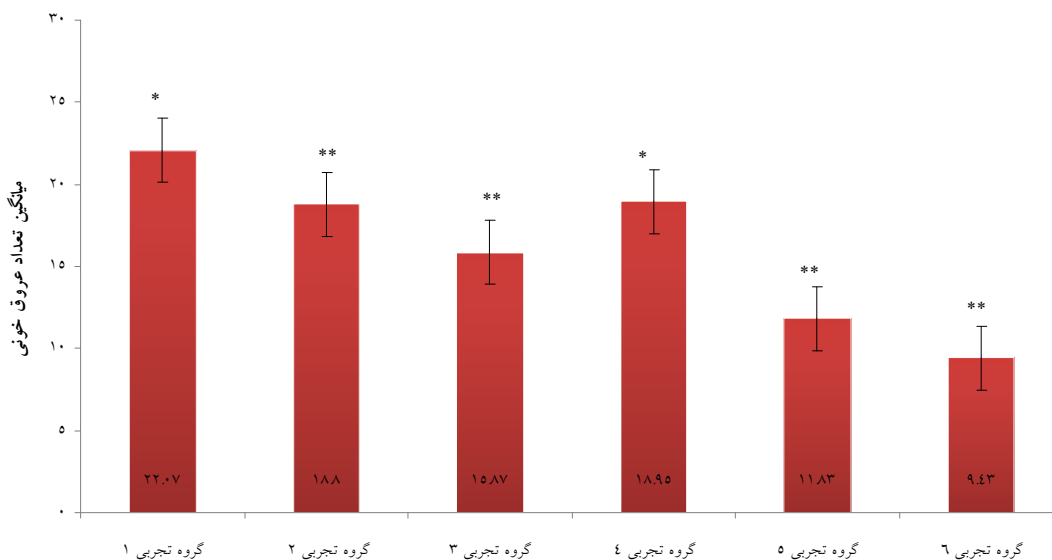
نمودار شماره ۱: میانگین طول انشعابات عروق خونی در نمونه های تحت تیمار توام عصاره زعفران و میدان الکترومغناطیسی با شدت ۴۰۰ گاؤس در مقایسه با نمونه های تیمار شده ای که تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی قرار نگرفتند

* $P < 0/05$

** $P < 0/001$

گروه های تجربی ۱، ۲ و ۳ به ترتیب تیمار زعفران با غلظت های ۱۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گروه های تجربی ۴، ۵ و ۶ به ترتیب تیمار توام عصاره زعفران همراه با میدان الکترومغناطیسی (۵۰ هرتز با شدت ۴۰ گاؤس)

تجربی ۴ کاهش معنی دار در تعداد و طول انشعابات دیدن شد ($P < 0/05$) در حالی که این کاهش طول و تعداد انشعابات عروق خونی در گروه های تجربی ۵ و ۶ در سطح ($P < 0/001$) معنی دار بود (نمودار شماره های ۱ و ۲).



نمودار شماره ۲: میانگین تعداد انشعابات عروق خونی در نمونه های تحت تیمار توام عصاره زعفران و میدان الکترومغناطیسی با شدت ۴۰۰ گاؤس در مقایسه با نمونه های تیمار شده ای که تحت تاثیر میدان الکترومغناطیسی قرار نگرفتند

* $P < 0/05$

** $P < 0/001$

گروه های تجربی ۱، ۲ و ۳ به ترتیب تیمار زعفران با غلظت های ۱۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گروه های تجربی ۴، ۵ و ۶ به ترتیب تیمار توام عصاره زعفران همراه با میدان الکترومغناطیسی (۵۰ هرتز با شدت ۴۰ گاؤس)

بحث:

در این پژوهش گیاه دارویی زعفران که به طور معمول در درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها از افسردگی و تشنج تا بیماری‌های تنفسی و گوارشی مورد استفاده قرار می‌گیرد با هدف بررسی بر روند آنژیوزنز برای تعدیل و کاهش رگ‌زایی جهت مهار رشد سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار گرفت. مطابق نتایج تحقیق حاضر عصاره آبی زعفران، تعداد و طول انشعابات عروقی پرده کوریوآلانتوئیک را در گروه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد و شاهد آزمایشگاهی در محل تیمار به طور معنی‌داری کاهش داد. با این وجود از آن جا که همراه شیمی درمانی روش‌های تکمیلی نظیر رادیوتراپی نیز از روش‌های معمول در کنترل رشد تومورها می‌باشند ما بر آن شدیم با کارگیری یک میدان الکترومغناطیسی با فرکانس پایین و شدت ۴۰۰ گاوس امکان تیمار توام با این گیاه فراهم شد و اثرات بررسی گردید که بیانگر تشدید اثرات عصاره زعفران در مهار رگ‌زایی بود.

اثرات ضد سرطانی زعفران به عنوان یک داروی موثر گیاهی سال‌هاست که شناخته شده است و پژوهش‌های متعددی در سال‌های اخیر به منظور شناسایی مکانیسم‌های دخیل در این اثرات انجام گرفته است، به عنوان مثال اثرات زعفران و متابولیت‌های فعال آن در ممانعت از ایجاد سرطان القا شده با کارسینوژن‌ها و عوامل تراژون القاگر کارسینومای پوستی، اثرات آنتی‌اکسیدانی و نیز اثرات القاکنندگی آپوپتوز و پتانسیل ممانعت‌کنندگی رشد تومورهای مشتق شده از سرطان‌های مختلف بررسی گردیده است. پژوهش‌های متعدد نشان داده‌اند که کروسین واجد پتانسیل سائیتوتوکسیک بر علیه سلول‌های آدنوکارسینومای انسانی و حیوانی و همچنین اثرات ضد تکثیری بر سلول‌های سرطان سینه است (۱۶، ۱۷). از سوی دیگر تحقیقات بیانگر این نکته می‌باشند که هم کروسین و هم دی‌گلیکوزیل کروسین واجد قابلیت مهارکنندگی و بیان آنتی‌ژن توموری بر علیه سلول‌های عفونت

یافته بوسیله آدنووایروس بوده و اثرات محدودی بر سلول‌های نرمال دارند و نشان داده شده است که عصاره زعفران می‌تواند مهار رشد سلول‌های سارکوما را به همراه داشته باشد. تحقیقات همچنین نشان داده است که ترکیبات و زیر واحدهای اصلی زعفران بخصوص کروسین سرعت رشد تومورها را در رت کاهش می‌دهد (۱۸). زعفران و اجزای تشکیل‌دهنده خصوصاً کارتنوئیدهای موجود در آن یعنی کروسین، کروسیتین و دی‌متیل کروسیتین مستقیماً می‌توانند به شیار کوچک در DNA باند شوند و سبب القا و تغییر کنفورماسیونی در آن شوند (۱۹). تیمار با عصاره زعفران بیان پروتئین باکس که فاکتور تعیین‌کننده مهم مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است را در سلول‌های سرطانی افزایش می‌دهد و می‌تواند مسیرهای میتوکندریایی دخیل در آپوپتوز را توجیه کند (۲۰). فرصیه‌های مختلفی برای خواص آنتی‌کارسینومایی و فعالیت آنتی‌توموری زعفران و ترکیبات آن نشان داده شده است که از جمله می‌توان به مهار سنتز DNA و RNA سلولی، جذب رادیکال‌های آزاد اشاره نمود، مکانیسم دیگر مرتبط با خواص عصاره زعفران میانکنش کارتنوئید با نوپوایزومراز ۲ است که آنزیم دخیل در میانکنش پروتئین با DNA است. همچنین با توجه به اینکه زعفران واجد لکتین است حداقل بخشی از خواص آنتی‌توموری آن می‌تواند وابسته به لکتین باشد القای آپوپتوز و نیز درگیر بودن سلول‌ها در این فرایند پس از تیمار با عصاره زعفران از جمله مکانیسم‌های پیشنهادی است (۲۱). از سوی دیگر زعفران، اکسیژن‌رسانی بافتی را افزایش داده و دارای اثرات جذب‌کنندگی رادیکال‌های آزاد بوده و استرس اکسیداتیو ناشی از ترکیبات ژنوتوکسیک را مهار می‌نماید (۸). از آنجا که یکی از ویژگی‌های آغاز رگ‌زایی هیپوکسی در بافت است لذا حداقل بخشی از اثرات آنتی‌آنژیوزنیک زعفران را می‌توان به روند اکسیژن‌رسانی بافتی مربوط دانست.

در سال‌های اخیر دیده شده است که میدان‌های الکترومغناطیس دارای اثرات متفاوت و گاهی مفید بر سیستم‌های انسانی هستند. برخی محققین نشان داده‌اند که قرار گرفتن در معرض میدان‌های الکترومغناطیس می‌تواند منجر به ایجاد بی‌دردی، کاهش زمان ترمیم شکستگی‌ها و افزایش سرعت ترمیم در بافت‌های عصبی شود. علاوه بر این برای پرفیوژن مجدد بافت اسکیمیک مؤثر باشد (۲۲-۳۴). لذا در این تحقیق با فرض به کارگیری میدان‌های الکترومغناطیس به عنوان درمان‌های مکمل، اثر آن‌ها بر رگ زایی به طور مستقیم و همراه با عصاره زعفران بررسی گردید. در برخی مطالعات به اثر امواج الکترومغناطیس بر آنژیوژنز اشاره شده است. Ruggiero و همکاران به مهار آنژیوژنز توسط میدان الکترومغناطیس با شدت ۰/۲ تسلا اشاره نموده‌اند (۲۵). نتایج تحقیق حاضر نشان داد، شدت میدان الکترومغناطیس یک فاکتور بسیار مهم و تاثیرگذار بر آنژیوژنز می‌باشد از سوی دیگر Bernardini و همکاران گزارش کردند که میدان الکترومغناطیس جنین جوجه را در مقابل نتایج هیپوکسی محافظت می‌کند و این عمل را با افزایش سطوح پروتئین شوک حرارتی (hsp7) انجام می‌دهد و بر اساس بررسی‌های انجام شده روی جنین‌های جوجه، میدان‌های الکترومغناطیس می‌توانند این پاسخ به هیپوکسی را در سلول‌های سرطانی کاهش دهند. این پدیده منجر به کاهش آنژیوژنز می‌شود (۲۶).

برخی تجربیات قلبی بیانگر آن است که شدت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ گاوس اثری بر فرایند آنژیوژنز ندارند لیکن شدت ۲۰۰ گاوس دارای اثر مهاری بر آنژیوژنز می‌باشد (۱۵). برخی آزمایشات اثرات بیولوژیک امواج الکترومغناطیس را به نیتریک اکساید (NO) مربوط می‌دانند و نیتریک اکساید به عنوان عامل تغییر قطر رگ‌های خونی معرفی شده است (۲۷). در عین حال DNA هسته‌ای، غشاء سلولی و میکروتوبول‌ها نیز تحت تاثیر میدان الکترومغناطیس قرار می‌گیرند، تغییر بیان ژن، جهت یابی سلولی و واکنش سلول - سلول عواملی هستند که احتمالاً منجر به ایجاد اختلال در توازن سیگنال‌های

مؤثر بر آنژیوژنز می‌شوند بدون آنکه تاثیری بر روند تمایز جنینی داشته باشند (۱۵).

جنین‌های گروه‌های آزمون که تحت تاثیر امواج قرار داشتند در تمامی مراحل تمایز جنینی، مشابه جنین‌هایی بودند که فقط توسط عصاره زعفران تیمار شده بودند و این نتیجه همسو با نتایج حاصل از برخی تحقیقات قبلی است، در این گزارش‌ها هیچگونه تغییر معنی‌داری در میزان مرگ و میر و یا مراحل تمایز جنینی و مورفولوژی نمونه‌ها به علت قرارگیری جنین‌های جوجه تحت میدان‌های الکترومغناطیس با شدت‌های بیشتر از ۴ تسلا مشاهده نشد، نتایج تجربیات قبلی نشان داده‌اند که رگ‌زایی جنینی در طی مراحل رشد و نمو جنینی تحت تاثیر امواج الکترومغناطیس قرار نمی‌گیرد (۲۸). لیکن می‌تواند جهت درمان، افزایش رگ‌زایی پس از تولد (آنژیوژنز) در نتیجه کم‌خونی‌های بافتی و نیز مهار اثرات نامطلوب ناشی از تحریک کننده‌های رگ‌زایی مورد توجه قرار گیرد (۲۹، ۳۰). در تحقیق حاضر میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در نمونه‌های تیمار با میدان‌های الکترومغناطیس نسبت به میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی گروه‌های شاهد و تیمار با زعفران کاهش چشمگیر نشان داد از این رو به نظر می‌رسد که میدان‌های الکترومغناطیس با ویژگی‌های خاص (شدت میدان، زمان تیمار، ژنتیک نمونه، نوع میدان) با اجزاء دو قطبی سلول نظیر غشاء پلاسمایی، DNA، هسته و میکروتوبول‌ها تداخل عمل ایجاد کرده و بسته به ویژگی‌های میدان این تداخل می‌تواند به صورت تحریکی و یا مهاری اعمال شود. این تغییرات احتمالی در مجموعه مکانیزم غیر گرمایی میدان‌های الکترومغناطیس در بیان ژن و نیز ایجاد ارتباطات سلول - سلول (سیتوکین‌ها و ماهیت شیمیایی ECM) می‌توانند تعادل موجود در مسیرهای پیام‌دهی آنژیوژنز را تحت تأثیر قرار دهند. همچنین برخی پژوهش‌ها بیانگر آن است که این شدت میدان الکترومغناطیس (۴۰۰ گاوس) واجد اثر مهاری بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک جوجه است و تعداد و طول انشعابات عروقی را کاهش می‌دهد (۳۱) که همسو با نتایج اثرات سینرژیک عصاره

آبی زعفران به همراه میدان الکترومغناطیسی در تجربه حاضر است.

فرکانس پایین و با شدت ۴۰۰ گاوس تشدید می گردد. لذا کاربرد توام عصاره زعفران همراه با میدان الکترومغناطیسی می تواند برای تحقیقات بیشتر به منظور درمان سرطان ها مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه گیری:

نتیجه این پژوهش بیانگر آن است که عصاره آبی زعفران دارای اثر مهاری بر آنژیوزنز در پرده کوریوآلاتوتئیکک جوجه است و تشکیل رگ های خونی را به طور موضعی و وابسته به دوز در محل تیمار کاهش می دهد و این تغییرات توسط میدان الکترومغناطیسی با

تشکر و قدردانی:

از مدیریت محترم گروه زیست شناسی و همکاران آزمایشگاه تحقیقاتی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد که در اجرای این طرح همکاری داشته اند سپاسگزاری می نمایم.

منابع:

1. Kaefter C, Milner J. The role of herbs and spices in cancer prevention. *J Nutr Biochem*. 2008 Jun; 19(6): 347-61.
2. Abdullaev FI, Espinosa J. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detect Prev*. 2004; 28(6): 426-32.
3. Salehi Surmaghi MH. Medicinal plants and phytotherapy. Tehran: The World of Nutrition Publications; 2006.
4. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp Biol Med* (Maywood). 2002 Jan; 227(1): 20-5.
5. Abolhasani A, Bathaie SZ, Yavari I, Moosavimovahedi A, Ghaffari M. Separation and Purification of some components of Iranian saffron. *Asian J Chemist*. 2005; 17(2): 727-9.
6. Takashi O, Shinji S, Shigekazu, O, Hiroyuki T, Yukihiko S, Hiroshi S. Crocin prevent the death of PC-12 cells through sphingo myelinaseceramide signaling by increasing glutathione synthesis. *Neurochem Int*. 2004 Apr; 44(5): 321-30.
7. Ochiai T, Shimeno H. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury invitro and invivo. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Apr; 1770(4): 578-84.
8. Hosseinzadeh H, Sadeghnia H. 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 and Cell Biol*. 2007; 26(12): 841-6.
9. Fernandez J. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Apr; 1770(4): 578-84.
10. Hendrix M, Seftor E, Seftor R. Vasculogenic mimicry: angiogenesis in disguise. New York: Springer; 2006.
11. Breier G, Weinheim K, Kriegstein K. Vasculogenesis: cell signaling and growth factors in development. Ohio: Willey & Wang; 2006.
12. Quesada AR, Munoz-Chapuli R, Medina. Antiangiogenic drugs: from bench to clinical trials. *Med Res Rev*. 2006; 26(4): 483-530.
13. Williams CD, Markov MS, Hardman WE, Cameron IL. Therapeutic electromagnetic field effects on angiogenesis and tumor growth. *Anticancer Res*. 2001; 21(6): 3887-92.
14. Ribatti Domenico. The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo assay to study antiangiogenesis. *Pharmaceuticals*. 2010; 3: 482-513.

15. 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(2): 12-18.
16. Chryssanthi D, Lamari F, Iatrou G, Pylara A, Karamanos N, Cordopatis P. Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different *Crocus* species. *Anticancer Res.* 2007 Jan-Feb; 27(1A): 357-62.
17. Mousavi H, Tavakkol-Afshari J, Brook A. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. *Food Chem Toxic.* 2008; 46: 3443-7.
18. Zheng S, Qian Z, Tang F, Sheng L. Suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression by crocetin contributes to attenuation of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Biochemical Pharmacology.* 2007; 70(8): 1192-9.
19. Bathaie S, Bolhasani A, Hoshyar R, Ranjbar B, Sabouni F, Moosavi-Movahedi A. Interaction of saffron carotenoids as anticancer compounds with ctDNA, Oligo (dG.dC)₁₅, and Oligo (dA.dT)₁₅. *DNA Cell Biol.* 2007; 26(8): 533-40.
20. Mousavi H, Tavakkol-Afshari J, Brook A, Jafari-Anarkooli I. Role of caspases and Bax protein in saffron-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47(8): 1909-13.
21. Melnyk J, Wang S, Massimo F, Marcone. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food Res Intern.* 2010; 43: 1981-9.
22. Eccles N.A critical review of randomized controlled trials of static magnetic for pain relief. *J Altern Complement Med.* 2005 Jun; 11(3): 495-509.
23. Shupak NM, Prato FS, Thomas AW. Therapeutic uses of pulsed magnetic-field exposure: a review. *Sci Bull.* 2003; 307: 9-32.
24. Rubik B. The biofield hypothesis: Its biophysical basis and role in medicine. *J Altern Complement Med.* 2002 Dec; 8(6): 703-17.
25. 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.
26. Bernardini CH, Zannoni A, Turba ML, Bacci ML, Forni M, Mersircap P, et al. Effect of 50 Hz sinusoidal Magnetic fields on Hsp27, Hsp70, Hsp90, expression in porcine aortic endothelial Cells (PAEC). *Bioelectromagnetics.* 2007 Apr; 28(3): 231-7.
27. Kavaliers M, Choleric E, Prato F, 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(1): 50-7.
28. Emura R, Ashida N, Higashi T, Takeuchi T. Orientation of bull sperms in static magnetic fields. *Bioelectromagnetics.* 2001; 22(1): 60-5.
29. Callaghan MJ, Chang EI, Seiser N. Pulsed electromagnetic fields accelerate normal and diabetic wound healing by increasing endogenous FGF-2 release. *Plast Reconstr Surg.* 2008; 121(1): 130-141.
30. Haddad JB, Obolensky AG, Shinnick P. The biological effects and therapeutic mechanism of action of electric and electromagnetic field stimulation on bone and cartilage: New findings and a review of earlier work. *Altern Complement Med.* 2007; 13(5): 485-90.
31. 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; (11)3: 70-7.

The synergic effects of Saffron aqua extract and low frequency electromagnetic field on angiogenesis in chick chorioalantoic membrane

Mousavi M (PhD), Baharara J (PhD)*, Zafar-Balannezjad S (PhD), Nejadshahrokh abadi KH (PhD)

Biology Dept., Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I.R. Iran

Received: 9/Aug/2012

Revised: 22/Oct/2012

Accepted: 30/Dec/2012

Background and aims: Studies both in vivo and in vitro shows anti-cancer effects of saffron. Angiogenesis is required for many physiological and pathological conditions such as tumor growth. On the other hand, many processes are affected by electromagnetic fields. In this study the synergic effects of saffron aqua extract and low-frequency electromagnetic field on angiogenesis were investigated.

Methods: In this laboratory experimental study, ross fertilized eggs were divided in 9 groups, including: control, first and second sham-exposed groups. 1, 2 and 3 experimental groups (treated by the saffron extract concentrations, 100, 400 and 800 µg/ml) and experimental groups, 4, 5 and 6 (synergic treatment with the saffron with same concentrations which exposed on 400 gauss intensity electromagnetic field). In the second day of incubation, the window was open on eggs in sterile conditions on the eighth day, 10 µl of Saffron extract was injected. In the tenth day in sham- exposed 2 groups and 4, 5 and 6 experimental groups eggs exposed on electromagnetic field for 4 hours. At last in the twelfth day all cases were photographed by photo stereomicroscope and both numbers and lengths of vessels around the sponges were measured by Image J software, data were analyzed with SPSS and by statistic test such as tukey & ANOVA.

Result: Data analysis, shows that average length of blood vessels in the experimental group 1, compared with the control group showed no significant decrease ($P>0.05$), while in experimental group 2 and 3 it was significantly increased ($P<0.001$). The average number of blood vessels in the experimental group 1, 2 and 3 decline noticeably in compare with the control group ($P<0.05$). Comparing of branches in blood vessels in second sham-exposed with the control group shows dramatically reduction ($P<0.001$). Analysis the data reveals that the number of blood vessels and length of branches in the experimental 4 group significantly decreased, $P<0.05$, while this reduction in the fifth and sixth one were significant ($P<0.001$).

Conclusion: The aqueous extract of saffron has dose dependently inhibitory effects on angiogenesis which influenced by low-frequency electromagnetic field with 400 Gauss intensity significantly.

Keywords: Aangiogenesis, Chorioalantoic chicken membrane, Cancer, Electromagnetic field, Saffron.

Cite this article as: Mousavi M, Baharara J, 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 Apr, May; 15(1): 1-10.

***Corresponding author:**

Biology Dept., Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I.R. Iran. Tel: 00985118437092, E- mail: baharara@yahoo.com