

## کاربرد توام پروتئازگیاهی بروملین و میدان الکترومغناطیس با فرکانس پایین (50)

### HZ بر آنژیوزنز در مدل حلقه آئورت موش صحرایی

صفا مشتاق<sup>۱</sup>، کاظم پریور<sup>۱</sup>، جواد بهارارا<sup>۲</sup>، نسیم حیاتی<sup>۱</sup>، محمد امین کراچیان<sup>۳</sup>

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران، ایران.

۲- گروه زیست شناسی، مرکز بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران. baharara78@gmail.com

۳- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۲۰

#### چکیده

زمینه و هدف: رگزایی در بسیاری از فرآیندهای حیاتی نقش دارد و بسیاری از فرآیندهای رشد و نمو تحت تاثیر میدان الکترومغناطیس قرار می گیرند. پروتئاز گیاهی بروملین قادر به مهار تکثیر سلولی می باشد، در این پژوهش تجربی کاربرد توام بروملین و میدان الکترومغناطیس با فرکانس پایین بر آنژیوزنز حلقه آئورت موش صحرایی نژاد ویستار بررسی گردید. روش کار: ابتدا آئورت موش صحرایی به قطعات یک میلی لیتری برش و در ماتریکس کلاژن کشت داده شد. پس از ظاهر شدن نخستین جوانه های رگی نمونه ها به ۸ گروه طبقه بندی گردیدند. گروه شاهد، شاهد آزمایشگاهی (تیمار با PBS)، شاهد آزمایشگاهی ۲ (تیمار با سیستم مولد میدان به حالت خاموش)، شاهد آزمایشگاهی ۳ (تیمار با PBS و میدان الکترومغناطیس در شرایط سیستم خاموش)، گروه های تجربی ۱ و ۲ (تیمار با غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بروملین)، گروه تجربی ۳ (تیمار با میدان الکترومغناطیس به تنهایی با شدت ۱۰۰ گوس به مدت ۲ ساعت)، گروه تجربی ۴ (تیمار توأم با میدان الکترومغناطیس با شدت ۱۰۰ گوس و بروملین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تقسیم بندی شدند. تعداد و طول انشعابات عروقی ۲۴ ساعت بعد از تیمار توسط نرم افزار J. Image تعیین و داده های کمی توسط نرم افزار آماری SPSS و آزمون های آماری ANOVA و TUKEY در سطح  $P < 0.05$  تحلیل گردید.

یافته ها: میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در نمونه های تیمار شده با بروملین و میدان الکترومغناطیس کاهش یافت. کاربرد توام از میدان الکترومغناطیس و بروملین باعث کاهش معنی دار میانگین تعداد و طول عروق نسبت به کاربرد هر یک به تنهایی گردید. نتیجه گیری: نتایج نشان داد که بروملین دارای اثر مهاری وابسته به دوز بر رگزایی است و این تاثیر توسط هم افزایی با میدان الکترومغناطیس به طور معنی داری افزایش می یابد.

واژه های کلیدی: بروملین، رگزایی، حلقه آئورت، میدان الکترومغناطیس.

#### مقدمه

و مهارکننده رگزایی تنظیم می گردد و در صورتی که این تعادل از بین برود، زمینه برای بروز برخی از بیماری ها از جمله رشد و متاستاز تومور فراهم می شود (۲۲). در سال ۱۹۷۵ فولکمن برای اولین بار فرضیه وابسته بودن رشد تومورها به رگزایی را مطرح نمود. تحقیقات بعدی نشان دادند که رشد و متاستاز تومورها به ایجاد رگ های جدید و رفع نیازهای تغذیه ای تومور بستگی دارد (۱۰). یکی از اهداف درمان سرطان مهار آنژیوزنز در سلول های

فرآیند آنژیوزنز در نتیجه تکثیر فعال سلول های آندوتلیال است و تشکیل رگ های خونی فعال مستلزم برهم کنش هماهنگ بین سلول های آندوتلیالی، ماتریکس خارج سلولی و سلول های احاطه کننده آن ها می باشد (۲۰). با این که این سلول ها خاموش هستند اما توانایی فعال شدن در پاسخ به عوامل مناسب را دارند. در واقع می توان رگزایی را فرآیند ضروری در فیزیولوژی بدن دانست که با واسطه تعادل بین فاکتورهای القا کننده

سرطانی است. منشا رگ های تشکیل دهنده در ابتدا نامشخص بوده و علت آن می تواند سلول های تغییر یافته توموری و یا سلول های طبیعی که از بافت های خوش-خیم مجاور منشا گرفته اند باشد. مدتی بعد این تئوری مطرح گردید که عامل محرک رشد سلول های رگ های خونی در تومورها از سلول های بدخیم مجاور منشا می-گیرند، لذا تومورها ابتدا عروق میزبان را برای بقای خود به کار گرفته، که این امر خود منجر به اضمحلال عروق میزبان شده و رشد مداوم سلول های توموری در ادامه منجر به فرآیند آنژیوژنز می شود (۱۷). از آن جا که آنژیوژنز در پدیده های پاتولوژیک نظیر رشد و متاستاز تومورهای سرطانی نقش مهمی ایفا می کند، لذا شناسایی و توسعه درمان های جدید رو به گسترش می باشد. بر طبق تجربیات Argon که در سال ۲۰۰۹ صوت گرفت استفاده از روش شیمی درمانی مقاومت اکتسابی سلول-های سرطانی را به داروهای شیمی درمانی در پی دارد و نیز میزان جهش و ناپایداری ژنتیکی در این سلول ها بسیار بالاست، لذا به سرعت دست خوش تغییرات می-شوند و نسبت به داروهای شیمی درمانی مقاومت پیدا می-کنند، در حالی که سلول های آندوتلیال سلول هایی کاملاً طبیعی هستند که از نظر ژنتیکی پایدار بوده و میزان جهش در آن ها پایین می باشد، لذا مهار رگزایی که بر پایه مواد طبیعی می باشد باعث کاهش بسیار زیاد مقاومت دارویی می گردد. شواهد این طور نشان داده اند که با توجه به مصرف منابع گیاهی به طور گسترده انجام مطالعات با هدف شناسایی ترکیبات ضد توموری و ضد رگزایی با منشا گیاهی اهمیت شایانی پیدا کرده است. از سوی دیگر ترکیبات طبیعی به دست آمده از گیاهان بدون این که سمیت قابل توجه و عوارض جدی بر بافت های طبیعی داشته باشد، به طور اختصاصی می توانند با تشکیل عروق جدید در تومورها مقابله نمایند (۱۷). علاوه بر این مطالعات بسیاری نشان داده اند که عوامل موثر در

این ترکیبات طبیعی قادر به مهار تکثیر و رشد تومور از طریق مسیرهای فیزیولوژیک مثل مسیرهای پیام رسان سلولی هستند. تاکنون اثرات ضد رگزایی ترکیبات متعدد با منشا گیاهی از جمله عصاره پیازچه، موسیر، زعفران، هندوانه ابوجهل، کورکومین و اوژنول مورد بررسی قرار گرفته است (۱۱). در این پژوهش تجربی از آنزیم پروتئولیتیک بروملین موجود در میوه خام و رسیده آناناس به منظور مهار رگزایی استفاده گردید. تحقیقات نشان داده اند که بروملین دارای خواص درمانی متفاوتی است که از طریق فرآیندهای متفاوت بیولوژیکی انجام می گیرد. در مطالعات بالینی متفاوت مکانیسم های متفاوتی از مرگ سلولی توسط بروملین گزارش شده است. تحقیقات نشان داده اند که بروملین موجود در آناناس عملکرد پروتئینی را که در ۳۰ درصد سرطانها دخیل است، متوقف نموده و قادر است سیستم ایمنی بدن را برای هدف قرار دادن و نابود ساختن سلول های سرطانی تحریک کند. این خاصیت آناناس به ویژه در مورد سرطان سینه، ریه، روده بزرگ، تخمدان و سرطان پوست به اثبات رسیده است (۸). از سوی دیگر اثرات آپوپتوزی و ضد توموری بروملین بررسی شده است (۱۵)، ولی تاکنون مطالعات اندکی در زمینه اثرات ضد رگزایی بروملین صورت پذیرفته است. در طی چند دهه گذشته با افزایش استفاده از وسایل الکترونیکی تولیدکننده میدان های الکترومغناطیس در محیط کار و زندگی، توجه محققین به تهدیدات احتمالی این وسایل برای سلامتی بشر جلب گردیده است. گزارش های متعددی از اثرات میدان های الکترومغناطیس با فرکانس پایین و بررسی اثرات آن با وضعیت های پاتولوژیک ارائه شده که نوع میدان، شدت آن، مدت زمان در معرض قرارگیری و محتوای ژنی نمونه تیمار شده در نتایج آزمایشات موثر واقع شده است (۱). مطالعات آزمایشگاهی در شرایط *in vivo* و *in vitro* نشان می دهد

### استخراج کلاژن و تهیه داربست کلاژنی

کلاژنی با غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر از دم موش صحرایی نژاد ویستار تهیه گردید. (برای تعیین غلظت از روش برادفورد استفاده شد)، در ابتدا رشته های تاندونی از دم موش جدا و ۳ بار شستشو با PBS انجام گرفت و سپس در الکل ۷۰ درصد به مدت یک ساعت گذاشته شد. در مرحله نهایی به مدت ۶۰ دقیقه دور ۱۶۰۰۰rpm سانتریفیوژ و کلاژن مورد نظر تهیه گردید (۱۹).

### تهیه داربست کلاژنی

برای تهیه داربست کلاژنی، کلاژن استخراجی از دم موش صحرایی، بی کربنات سدیم، محیط کشت (DMEM (Sigma, France را به ترتیب به نسبت ۸، ۱ و ۱ مخلوط کرده، پس از تشکیل داربست حلقه های آئورت را درون داربست گذاشته و در انکوباتور به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده تا محلول کلاژن به ژل تبدیل شود، سپس پلیت را از انکوباتور خارج کرده و زیر هود محیط کشت DMEM حاوی ۳۰ درصد سرم گوساله (FBS) (Gibco, USA) و آنتی بیوتیک پنی سیلین (Gibco, USA) و استرپتومایسین (Gibco, USA) به آن اضافه شده و روی کلاژن ریخته تا سطح رویی آن را بگیرد (۱۱).

### جدا ساختن حلقه آئورت از موش صحرایی

در تحقیق حاضر از موش های صحرایی که ۴ تا ۶ هفته سن و ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم وزن داشتند استفاده شد. در ابتدا موش ها با کلروفورم بی هوش و بخش شکمی توسط الکل ۷۰ درصد استریل گردید. حفره شکمی با استفاده از لوازم جراحی باز و پس از پیدا کردن آئورت سینه ای، قطعه هایی با طول مناسب از آئورت جدا و بلافاصله به بافر استریل که حاوی آنتی بیوتیک های پنی سیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) منتقل گردید، در شرایط استریل زیر هود لامینار، ابتدا بافت زائد چربی با استفاده از قیچی و پنس جدا شد و آئورت چندین بار با بافر فسفات شستشو داده

که مواجه با میدان های الکترومغناطیس در شدت های بالا با تغییر در عملکرد و یا مراحل عملکردی سلول ها، پاسخ های متنوعی در موجودات زنده القا می کند. که می توان به تاثیر آن بر روی تکثیر و تمایز سلولی، اختلال در چرخه سلولی، القای مرگ برنامه ریزی سلولی، اختلال در ارتباطات بین سلولی، افزایش تخریب RNA، اختلال در بیان ژن ها و تولید رادیکال های آزاد اشاره نمود (۳). به منظور بررسی فرآیند رگزایی چندین مدل آزمایشگاهی نظیر پرده کوریوالانتوئیک جوجه، مدل تشکیل عروق جدید در قرنیه چشم، ماتریژل، مدل آمیون انسانی و حلقه آئورت مورد توجه می باشند، از میان این مدل ها مدل حلقه آئورت به طور گسترده برای بررسی رگزایی و ساز و کارهای وابسته به آن مورد توجه قرار می گیرد (۱۶)، از ویژگی های این مدل می توان به تکرار پذیری بالا، اثربخشی و هزینه کم آن اشاره نمود. هم چنین حلقه آئورت پلی بین اطلاعات آزمایشگاهی و طبیعی می باشد. در این روش جوانه های رگی مشتق از حلقه آئورت در ژل کلاژن به یک شبکه مویرگی تبدیل می شوند که موجب ارائه تصویر کامل تر از فرآیند رگزایی در مقایسه با سنجش های قدیمی تر مبتنی بر سلول می گردد (۲۰). از این رو با توجه به کاستی هایی که در درمان سرطان وجود دارد، مانند نرخ رشد سریع آن و عدم تشخیص به موقع که سبب محدود شدن روش های درمانی می شود، استفاده از روش های ترکیبی می تواند در جبران این کاستی ها تاثیرگذار باشد، لذا با توجه به این که یکی از مکانیسم های جلوگیری از رشد و تکثیر سلول های سرطانی، مهار رگزایی می باشد، پژوهش تجربی حاضر با هدف بررسی کاربرد توام پروتئاز گیاهی بروملین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و میدان الکترومغناطیس با شدت ۱۰۰ گوس و فرکانس ۵۰ هرتز بر پدیده مهار رگزایی حلقه آئورت رت انجام شد.

### مواد و روش ها

۶. گروه تجربی ۲ که نمونه ها توسط پروتئاز گیاهی بروملین با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تیمار شدند.

۷. گروه تجربی ۳ در معرض میدان الکترومغناطیس با شدت ۱۰۰ گوس و فرکانس ۵۰ هرتز به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند.

۸. گروه تجربی ۴ که تحت اثر میدان الکترومغناطیس با شدت ۱۰۰ گوس به مدت ۲ ساعت بودند که بلافاصله بعد میدان به آن ها پروتئاز گیاهی بروملین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر افزوده شد (۱۸).

قبل از تیمار و ۲۴ ساعت بعد از تیمار با میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ثابت بررسی و عکس برداری انجام گردید و تعداد و طول انشعابات رگی در داخل ۴ مربع با اندازه یکسان ۱۰ در ۱۰ که به طور تصادفی روی تصاویر توسط نرم افزار Image J رسم شده بود تعیین گردید. در هر بار آزمایش برای هر دوز ۵ نمونه در نظر گرفته شد و کلیه آزمایش ها ۳ بار تکرار گردید.

#### تحلیل آماری

داده های آماری حاصل در نرم افزار SPSS و به کمک آزمون آماری ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey در سطح معنی داری ( $p < 0.05$ ) تحلیل شد.

#### نتایج

مطالعه با میکروسکوپ معکوس نشان داد که در روز سوم انشعابات سلول های آندوتلیالی به طور بسیار محدودی شروع به تشکیل کرده و در روز پنجم جوانه های عروقی به خوبی گسترش یافته اند، لذا تیمار بر روی نمونه ها در روز پنجم به دلیل اندازه مناسب زوائد شبه برای مطالعه با میکروسکوپ معکوس انجام گردید. بر اساس نتایج به دست آمده و تحلیل آزمون های آماری، میانگین تعدد و طول انشعابات عروقی در گروه های

شد تا درون آن از وجود باقی مانده خون و ترکیبات اضافه پاک شود و در نهایت با استفاده از تیغ جراحی، آنورت به حلقه های ۱ تا ۲ میلی متری قطعه قطعه گردید و درون چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای منتقل گردید. محققان این پروژه در کلیه مراحل متعهد به رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات مطابق آیین نامه های مذکور بودند (۱۹).

#### پوشاندن روی حلقه های آنورت

روی حلقه های آنورت کاشته شده با لایه ای نازک به ضخامت ۳ میلی متر از محلول کلاژن (غلظت ۴ میلی گرم در هر میلی لیتر) پوشانده شد. پلیت به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل گردید تا محلول کلاژن به صورت کامل ژل گردد. پس از تشکیل ژل پایدار کلاژن، از محیط DMEM حاوی ۲۰ درصد سرم گوساله (FBS) و آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین به آن اضافه شد. پس از مشاهده اولین جوانه های عروقی در روز پنجم نمونه ها برای انجام تجربیات در گروه به شرح ذیل به صورت تصادفی قرار داده شدند (۱۱).

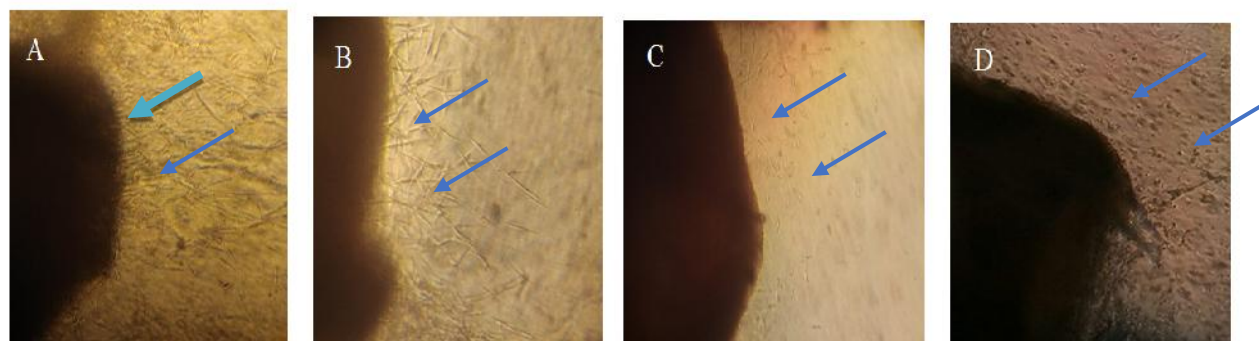
#### گروه بندی نمونه ها

پس از پیدایش اولین جوانه های عروقی نمونه ها به ۸ گروه آزمون به طور تصادفی توزیع شدند که شامل:

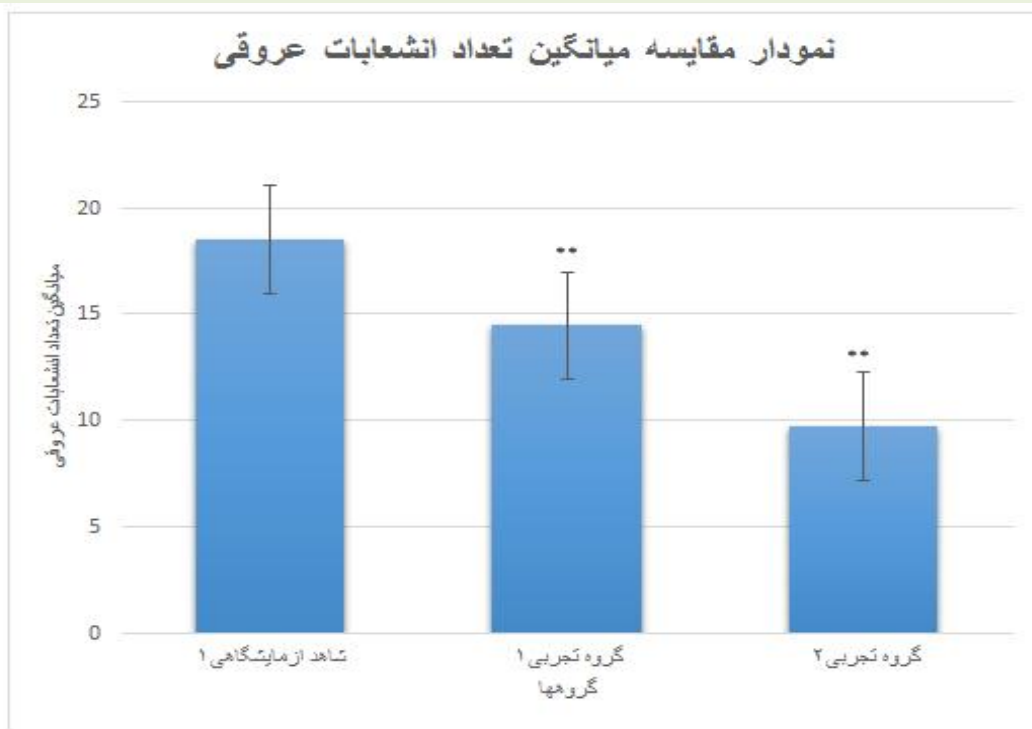
۱. گروه شاهد (نگهداری در شرایط طبیعی)
۲. گروه شاهد آزمایشگاهی ۱ (تیمار با PBS)
۳. شاهد آزمایشگاهی ۲ (تیمار با میدان الکترومغناطیس در وضعیت خاموش)
۴. شاهد آزمایشگاهی ۳ (تیمار توام با PBS و وضعیت خاموش سیستم مولد میدان الکترومغناطیس)
۵. گروه تجربی ۱ که نمونه ها توسط پروتئاز گیاهی بروملین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تیمار شدند.

معنی دار بود ( $p < 0/001$ ) (نمودار ۱ و ۲، شکل ۱). در مرحله بعد بررسی نتایج به دست آمده به منظور بررسی تاثیر کاربرد توأم میدان الکترومغناطیس با فرکانس پایین به همراه بروملین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گروه های تجربی ۱ و ۳ و ۴ با گروه تجربی مقایسه شدند، مقایسه میانگین تعداد انشعابات عروقی بین گروه شاهد آزمایشگاهی ۳ گروه تجربی ۴ (تیمار توأم با بروملین و میدان الکترومغناطیس) کاهش معنی داری را نشان داد ( $p < 0/001$ )، هم چنین میانگین طول انشعابات عروقی بین گروه شاهد آزمایشگاهی ۳ گروه تجربی ۴ (تیمار توأم با بروملین و میدان الکترومغناطیس) نیز دارای کاهش معنی دار بود ( $p < 0/001$ ) (نمودار ۳ و ۴، شکل ۱).

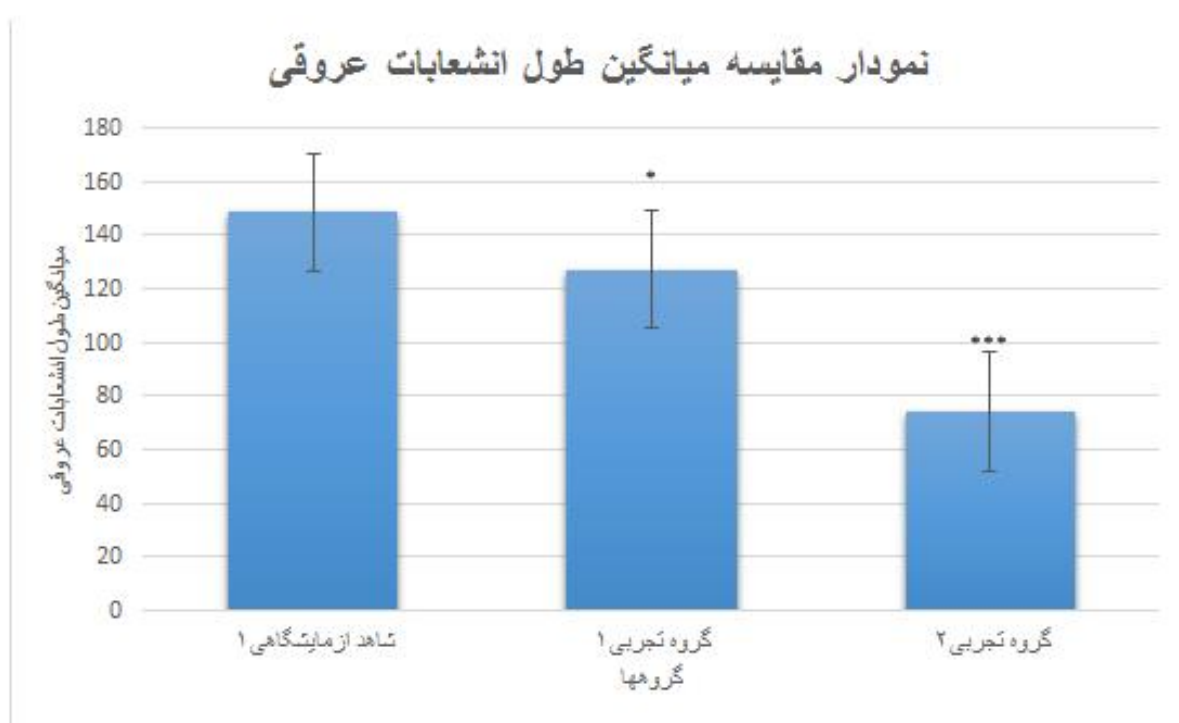
شاهد آزمایشگاهی ۱، شاهد آزمایشگاهی ۲ و شاهد آزمایشگاهی ۳ در مقایسه با گروه های شاهد اختلاف معناداری نداشت ( $p > 0/05$ )، لذا در نمونه های بعدی گروه های تجربی با گروه شاهد مقایسه شدند. به منظور بررسی تاثیر پروتئاز گیاهی بروملین بر مهار رگزایی در مدل حلقه آئورت، نمونه ها با غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تیمار شدند، مقایسه میانگین تعداد انشعابات عروقی بین گروه شاهد و گروه تجربی ۱ (تیمار با دوز ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و گروه تجربی ۲ (تیمار با دوز ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) دارای کاهش معنی دار بود ( $p < 0/01$ )، هم چنین میانگین طول انشعابات عروقی بین گروه شاهد و گروه تجربی ۱ (تیمار با دوز ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و گروه تجربی ۲ (تیمار با دوز ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) دارای کاهش



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ نوری معکوس بزرگنمایی (۱۰۰ X) از راست به چپ دیدار شدن زوائد شبکه رگی از حلقه آئورت کشت شده در ماتریکس کلاژن در روز پنجم، علامت پیکان پدیدار شدن جوانه های عروقی را نمایش می دهد. (A) گسترش شبکه عروقی در روز پنجم، (B) افزودن غلظت ۱۰۰ میکروگرم از بروملین به نمونه ها که اثر مهاری ضعیفی را در رشد و گسترش عروق خونی نمایش می دهد. (C) افزودن غلظت ۲۰۰ میکروگرم از بروملین به نمونه ها که اثر مهاری مناسب را در رشد و گسترش عروق خونی نمایش می دهد. (D) تیمار توأم توسط میدان الکترومغناطیس با شدت ۱۰۰ گوس و غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از بروملین که اثر مهار شکنندگی قوی در رشد و گسترش عروق خونی را نمایش می دهد.

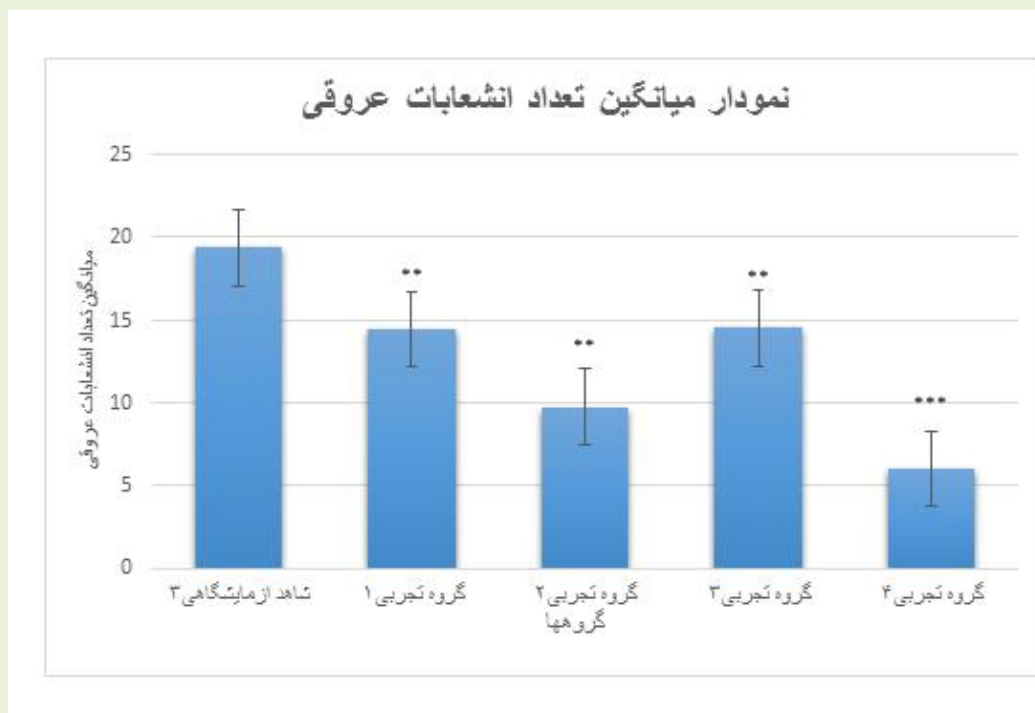


نمودار ۱- مقایسه میانگین تعداد انشعابات عروق خونی در نمونه های تحت تیمار با پروتئاز گیاهی بروملین با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه با نمونه هایی که فقط با PBS تیمار شده اند ( $P < 0.01$  \*\*). (mean  $\pm$  SD)

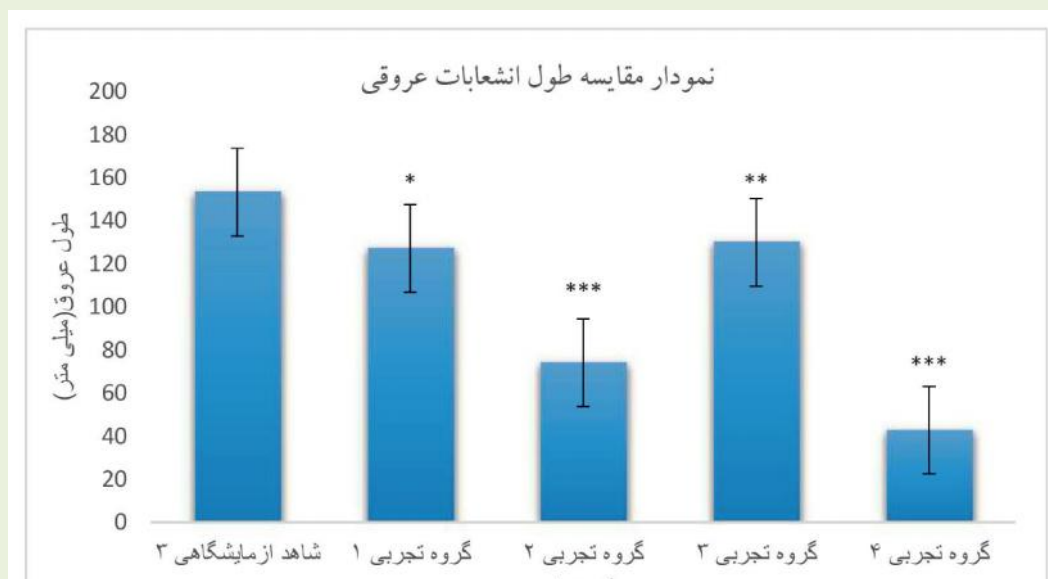


نمودار ۲- مقایسه میانگین طول انشعابات عروق خونی در نمونه های تحت تیمار با بروملین با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه با نمونه های شاهد آزمایشگاهی ۱ که فقط با PBS تیمار شده اند ( $P < 0.05$  \*  $P < 0.001$  \*\*\*)





نمودار ۳- مقایسه میانگین تعداد انشعابات عروق خونی در نمونه های تحت تیمار توأم با بروملین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و میدان الکترومغناطیس با شدت ۱۰۰ گاوس به مدت ۲ ساعت در مقایسه با نمونه هایی که فقط با PBS و گروهی که فقط با بروملین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (تجربی ۱) و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (تجربی ۲) به تنهایی و گروهی که توسط میدان الکترومغناطیس به حالت سیستم مولد خاموش تیمار شده اند (تجربی ۳) (\*\* $P < 0.01$  و \*\*\* $P < 0.001$ )



نمودار ۴- مقایسه میانگین طول انشعابات عروق خونی در نمونه های تحت تیمار با بروملین با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مقایسه با نمونه های شاهد آزمایشگاهی ۱ که فقط با PBS تیمار شده اند (\*\* $P < 0.01$  و \* $P < 0.05$ )

### بحث و نتیجه گیری

منظور مهار رگ‌زایی بر روی مدل حلقه آئورت موش صحرائی مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین در این

در این پژوهش تجربی کاربرد توأم پروتئاز گیاهی بروملین و میدان الکترومغناطیس با فرکانس پایین به

پژوهش تجربی از داربست کلاژنی به عنوان یک مدل مناسب برای کشت حلقه آنورت مورد استفاده قرار گرفت. محمدی مطلق و همکارانش از این مدل کشت برای بررسی مهار رگ‌زایی عصاره گیاه موسیر استفاده کردند. اساس مدل‌های سه بعدی رگ‌زایی بر پایه ظرفیت سلول‌های آندوتلیال فعال شده جهت مهاجم به محیط‌های سه بعدی (ماتریکس) بنا نهاده شده است. این ماتریکس ممکن است ژل کلاژن یا فیبرین، ماتریژل و یا مخلوطی از این پروتئین‌ها به همراه فاکتورهای رشد باشد. به طور کلی مدل‌های سه بعدی نسبت به مدل‌های 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 و سایتوکاین‌ها)، در این نوع مدل‌ها، سلول‌ها را می‌توان برای انشعاب، تکثیر و مهاجرت و یا تمایز سه بعدی استفاده کرد (۱۶). بر اساس نتایج این پژوهش تجربی میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در اطراف محل تیمار در نمونه‌های شاهد آزمایشگاهی یک (تیمار شده با نرمال سالین) و شاهد آزمایشگاهی ۲ (قرار داده شده در مجاورت سیستم مولد میدان الکترومغناطیس به حالت خاموش) و شاهد آزمایشگاهی ۳ (تیمار با نرمال سالین و سیستم مولد میدان به حالت خاموش) در مقایسه با نمونه‌های شاهد ختلاف معناداری نداشت ( $p > 0.05$ )، بنابراین می‌توان این‌طور گفت که حلال بروملین (نرمال سالین) که توسط آن دوزهای مصرفی تهیه شدند، تاثیر معنی‌داری بر طول و تعداد انشعابات عروقی ندارد. هم‌چنین با بررسی نتایج به دست آمده از نمونه‌های شاهد آزمایشگاهی ۲ مشخص گردید که تغییر شرایط انکوباسیون و در معرض قرار دادن نمونه‌ها در سیستم مولد میدان الکترومغناطیس به حالت خاموش موجب اختلاف معنی‌داری در میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی نسبت به نمونه‌های گروه شاهد نمی‌کند، لذا

اثراتی که میدان الکترومغناطیس به حالت روشن بر میزان رگ‌زایی اعمال می‌کند ناشی از تشعشعات میدان الکترومغناطیس است و تغییر شرایط انکوباسیون تاثیری در رگ‌زایی حلقه آنورت رت ندارد ( $p > 0.05$ ). در ادامه نتایج پژوهش نشان داد که میانگین طول انشعابات عروقی در اطراف محل تیمار در نمونه‌های تیمار شده با پروتئاز گیاهی بروملین با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (در مقایسه با نمونه‌های شاهد به طور معنی‌داری کاهش داشت) ( $p > 0.01$ ). در این پژوهش تجربی از آنزیم پروتئولیتیک بروملین موجود در میوه خام و رسیده آناناس به منظور مهار رگ‌زایی استفاده گردید. در تحقیقی در سال ۲۰۱۳ انجام گرفتار یک پروتئاز گیاهی به نام سیستین بر روی سلول‌های آندوتلیالی بند ناف به منظور مهار رگ‌زایی بررسی شد. نتایج این تحقیق این‌طور نشان دادند که فعالیت ضد رگ‌زایی این پروتئاز در مهار رشد و تکثیر سلول‌های آندوتلیالی به دلیل تداخل در مسیر فسفوریلاسیون SAPK/JNK MEK1/2, AKT می‌باشد و در ادامه این‌طور بیان گردید که بروملین نیز دارای اثرات مشابه با سیستین می‌باشد (۸). پژوهشی دیگر در سال ۲۰۱۵ بر روی رده سلولی GI-101A سرطان دستگاه تنفسی صورت گرفت این‌طور نشان داده شد که کاربرد بروملین با غلظت ۱ میکروگرم کاهش قابل توجهی در تعداد سلول‌ها دارد که همراه با القای آپوپتوز می‌باشد (۱۸). در تحقیقی که در سال ۲۰۱۰ به منظور بررسی اثر اتوفاژی و القای آپوپتوز ترکیب بروملین بر روی رده سلولی MCF-7 انجام گردید و فعالیت کاسپاز ۹ در آن بررسی شد مشاهده شد که تراکم زیاد کروماتین و کلیواژ هسته‌ای در این سلول‌ها وجود دارد. نتایج بیان‌گر این موضوع بود بروملین سبب القای کاهش عامل ERK، و از سوی دیگر باعث افزایش بیان JNK و p38 kinase می‌شود (۹). نتایج این پژوهش تجربی نیز این‌طور نشان داد که کاربرد بروملین به تنهایی



پژوهش تجربی حاضر میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در اطراف محل تیمار در نمونه هایی که توسط بروملین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و میدان الکترومغناطیس با شدت ۱۰۰ گوس به مدت ۲ ساعت تیمار توام شدند در مقایسه با گروه هایی که با میدان الکترومغناطیس با شدت ۱۰۰ گوس به مدت ۲ ساعت به تنهایی و نیز بروملین با دوز ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نمونه های شاهد به طور معنی داری کاهش نشان داد (p ۰/۰۰۱)، لذا کاربرد توام این دو عامل باعث تشدید اثر مهاری بر رگ‌زایی در حلقه آئورت موش صحرائی در مقایسه با کاربرد هر کدام به تنهایی گردد. روش درمانی ترکیبی دو یا چند عامل درمانی می تواند سنگ بنای درمان سرطان باشد، تحقیقات ثابت کرده اند که کاربرد درمان های ترکیبی هم زمان کارایی بیشتری نسبت به روش های مونوتراپی دارد، که به طور بالقوه مقاومت دارویی کاهش داده و شاهد کاهش رشد تومور را باعث می شود (۶). بهارآرا و همکارانش با کاربرد توام عصاره آبی زعفران و میدان الکترومغناطیس با ۲۰۰ شدت گوس به مدت ۲ ساعت باعث مهار آنژیوژنز در مدل حلقه آئورت رت شدند (۱۹)، هم چنین تحقیقی دیگر نشان داد که کاربرد میدان الکترومغناطیس با شدت ۵۰ گوس سبب تشدید اثر مهاری ماده گیاهی سیر بر روی آنژیوژنز پرده کوریوالانتوئیک جوجه می شود (۱۳). بالانژاد و همکاران گزارش کردند که تشعشعات میدان الکترومغناطیس با شدت ۴۰۰ گوس می تواند منجر به افزایش اثر مهاری راپامایسین بر رگ‌زایی در پرده کوریوالانتوئیک جوجه می شود (۴). در تحقیقی که توسط مطیع و همکارانش صورت گرفت کاربرد توام نانوذره نقره به همراه میدان الکترومغناطیس با فرکانس پایین بر روی رگ‌زایی پرده کوریوالانتوئیک جوجه بررسی گردید که نتایج این تحقیق نشان دادند که کاربرد

و با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به صورت وابسته به دوز قادر به مهار رگ‌زایی در حلقه آئورت موش صحرائی می باشد، که می توان با فعال کردن مسیرهای آپوپتوزی و القای فرآیند آپوپتوز در سلول‌های آندوتلیال دیواره عروق خونی باشد. در سال های اخیر مشاهده شده است که میدان های الکترومغناطیس دارای اثرات متفاوت و گاهی مفید بر سیستم های انسان اند و همراه روش های شیمی درمانی، رادیوتراپی از روش های کنترل رشد تومور می باشد (۲۵). مقایسه نتایج تعداد و طول انشعابات عروقی در نمونه هایی که به مدت ۲ ساعت در معرض میدان الکترومغناطیس با شدت ۱۰۰ گوس قرار گرفتند در مقایسه با نمونه های گروه شاهد کاهش معنی داری را نشان داد (p ۰/۰۱). بهارآرا و همکارانش با قرار دادن تخم مرغ های نطفه دار از روز دهم انکوباسیون در معرض میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ گوس نشان دادند که این شدت از میدان های الکترومغناطیس دارای اثر مهاری بر رگ‌زایی در پرده کوریوالانتوئیک جنین جوجه است و تعداد و طول انشعابات عروقی را کاهش می دهد (۳). بالانژاد و همکارانش در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند که تشعشعات میدان های الکترومغناطیس با شدت ۴۰۰ گوس می تواند قادر به مهار رگ‌زایی در پرده کوریوالانتوئیک جوجه می باشد (۴). این نتایج به دست آمده از پژوهش های فوق کاملاً هم‌سو با نتیجه پژوهش تجربی حاضر می باشد، لذا می توان عنوان کرد که کاربرد میدان الکترومغناطیس با فرکانس پایین با تغییر در عملکرد و یا مراحل عملکردی سلول ها می تواند پاسخ های متنوعی را در موجودات زنده القا می کنند که از آن جمله القای آپوپتوز در سلول های آندوتلیالی دیواره عروق می باشد. میزان این تغییرات سلولی و مولکولی به مدت زمان تابش، میزان نفوذپذیری آن در بافت ها و تولید گرما بستگی دارد (۳). بر اساس نتایج

قرار داد می تواند یک روش موثر در درمان بسیاری از سرطان ها باشد. این پژوهش با هدف به کار گیری توام پروتئاز گیاهی بروملین با غلظت های ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر با میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۱۰۰ گوس به منظور بررسی آن بر پدیده رگ زایی در حلقه آئورت موش صحرایی نژاد ویستار انجام شد. نتایج بیان گر آن است که بروملین به صورت وابسته به دوز دارای اثر مهارى بر رگ زایی حلقه آئورت موش صحرایی است، از سوى دیگر کاربرد توام بروملین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و میدان الکترومغناطیس (فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۱۰۰ گوس به مدت ۲ ساعت) باعث کاهش معنی داری در رگ زایی حلقه آئورت موش صحرایی نسبت به کاربرد هریک به تنهایی می شود، لذا پیشنهاد می گردد در مطالعات بالینی مرتبط با رگ زایی این موضوع می تواند مورد توجه بیشتری قرار بگیرد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاران محترم مرکز تحقیقاتی بیولوژی کاربردی دانشگاه آزاد اسلامی تشکر می شود.

توام این دو باعث کاهش معنی دار رگ زایی در پرده کوریو الاتئوتیک جوجه نسبت به کاربرد هریک به تنهایی می شود (۱۴). با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش و تحقیقات مشابه انجام شده میدان های الکترومغناطیس با فرکانس پایین می تواند باعث مهار رگ زایی شود که در صورت توام شدن با عامل دوم در تشدید اثر مهارى عامل دوم تاثیر گذار می باشد. با توجه به این که استفاده از میدان های الکترومغناطیس بر تخریب سلول های سرطانی و هم زمان سلول های سالم تاثیر گذار باشد، لذا می توان بیان داشت که میدان های الکترومغناطیس با ویژگی های خاص (شدت میدان، زمان تیمار، ژنتیک نمونه و نوع میدان) با اجزای دوقطبی سلول مثل سلول مثل غشای پلاسمایی، DNA و هسته و میکروتوبول ها تداخل عمل پیدا کرده و بسته به ویژگی های میدان این تداخل می تواند به صورت تحریکی یا مهارى عمل کند (۷). لذا یافتن روشی که به کمک آن بتوان بدون این که سلول های سالم آسیب ببینند، تنها سلول های سرطانی و عروق اطراف آن را مورد هدف

### منابع

1. Baharara, J., Zahedifar, Z. (2012). The effect of low frequency electromagnetic fields on some biological activities of animals. *Arak Medical University Journal (AMUJ)*, 15(66); 80 - 93.
2. Baharara, J., Ramezani, T. (2014). A review on angiogenesis in tumor. *Journal of Cell & Tissue (JCT)*, 5 (1); 89-100.
3. Baharara, J., Ashraf, A., Balanejad, S., SamarehMosavi, S. (2010). The inhibitory effect of low frequency field (50HZ) on angiogenesis in chorioallantoic membrane of chick. *J Zahedan Univ Med Sci*, 12(2); 8-11. [Persian].
4. Balanejad, S., Parivar, K., Baharara, J., MohseniKocheshfahani, H. (2010). Effect of combined rapamycin and of low frequency electromagnetic field on angiogenesis. *J. Shahrekord Univ. Med. Sci*, 11(3); 70 - 6.
5. Baharara, J., Ashraf, A., Balanejad, S., Mosavi, S. (2010). The inhibitory effect of low frequency electromagnetic field (50Hz) on angiogenesis in chorioallantoic membrane of chick. *Zahedan Journal Research in Medical Science*, 12(2); 8-12.
6. Bin, Sh., Li-Fang, W., Wen, Sh., Liang, C. (2017). Carnosic acid and fisetin combination therapy enhances inhibition of lung cancer through apoptosis induction. *International Journal Oncology*. Pages; 2123-2135. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3970>.
7. Calvente, I., Fernandez, M., Villalba, J., Olea, N., Nuñez, M. (2010). Exposure to electromagnetic fields (nonionizing radiation) and its relationship with childhood leukemia: a systematic review. *Science of the Total Environment*, 408(38); 3062 - 9.
8. Chobotova, K., Vernallis, A.B., Majid, F.A. (2010). Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: current evidence and perspectives. *Cancer Letters*, 290(2); 148-156.
9. Dharma, P.T.R., Malueghaa, M., Widodob, A., Pardjianto, B. (2015). The effects of bromelain on angiogenesis, nitric oxide, and matrix metalloproteinase-3 and -9 in rats

exposed to electrical burninjury. *Wound Medici*, 9; 5-9.

**10.**Ernesta, F., Ruben, B., Laura, P., Ivanek, R., Curzio, R., Gerhard, C. (2013). An immature B cell population from peripheral blood serves as surrogate marker for monitoring tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in mouse models., *Medici*, 18(3); 327-345.

**11.**Kouhestanian, K., Baharara, J., Ramezani, T., Mousavi, M. (2015). Antiangiogenic effects of eugenol in chorioallantoic membrane of chick embryo. *Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 23(4); 2109-2117.

**12.**Kouhestanian, K1., Baharara, J., Zafarbalanezhad, S. (2015). *Feyz. Journal of Kashan University of Medical Sciences*, 19(3); 197-203.

**13.**Mansouri, K., Mostafaie, A., MohammadiMotlagh, H. (2010). Angiogenesis and tumor biology. *J Improve, KermanshahUniv Med Sci*, 14(4); 315-05.

**14.**Motie, M., Baharara, J., Iranbakhsh, A., Ramezani, T. (2016). Synergic application effects of silver nanoparticles and low-frequency electromagnetic field on the chick embryo chorioallantoic membrane on angiogenesis. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 24(4); 317-328

**15.**Mohammadi Motlagh, HR., Mansouri, K., Shakiba, Y., Keshevarz, M., Khodarahmi, R., Siami, A., Mostafaie, A. (2009).The effects of aqueous extract on Antiangiogenic. *J Bio electromagnetics*, 35(5); 390-9.

**16.**Mansouri, K., Mostafaie, A., MohammadiMotlagh, H. (2010). Angiogenesis and Tumor Biology. *J Improve Kermanshah Univ Med*, 14(4); 315-05.[in Persian]

**17.**Mortazaei, S., Rafieian, M., AnsarySamani, R., Shahinfard, N. (2013). Comparison of phenolic compounds concentrations and antioxidant activity of eight medicinal plants. *J Rafsanjan Univ Med Sci*, 12(7); 519-30 [Persian].

**18.**Mohr, T., Desser, L.(2011). Plant proteolytic enzyme papain abrogates angiogenic activation of human umbilical vein endothelialcells (HUVEC) in vitro. *Journal of Cell & Tissue (JCT)*, 18(5);396-400.

**19.**Moshtagh, S., Baharara, J., Zafar-Balanejad, S., Ramezani, T. (2014). .Effects of saffron aqueous extract and low frequency electromagnetic field on angiogenesis on in a Wistar rat aortic ring model. *Koomesh Journal*, 15(4); 522–529.

**20.**Nicosia, R. (2009). The aortic ring model of angiogenesis: a quarter century of search and discovery. *Angiogenesis Review Series. Cell Mol Med*, 13(10); 4113-36.

**21.**Paulo, M., Karime, K. (2012). Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. *Cancer Treatment*, 8(7); 825 - 33.

**22.**Ruggiero, M., Bottaro, Dp., Liguri, G., Gulisano, M., Peruzzi, B., Pacini, S. (2004). Magnetic field inhibits angiogenesis in chick embryo chorioallanto icmembrane. *J Bio electromagnetics*, 25(5); 390-9

**23.**Ramezani, R., Baharara, J. (2014). A review on angiogenesis in tumor. *Journal of Cell & Tissue (JCT)*, 5 (1);89-100.

**24.**ShahrokhAbady, Kh. (2003). Evalution of cytotoxicity effect oftotal Saffrons extract on HepG2 cell line.*Genet 3rd millennium, Kermanshah Univ Med*, 14(1); 65-33. (Persian).

**25.**Xinsheng, Xu., Huixia, Lu., Huili, Lin., Xiaolu, Li., Meh, utNi., Chingjiang, Li. (2009). Aortic adventitial angiogenesisand lymphogigenesis promote intimalinflammation and hyperplasia. *Cardio vascular Pathology*, 18(5); 267-78.

**26.**Zafar Balanejad, S., Pariva, K., Baharara, J., Koochesfahani, H. (2009). The effect of kljmk; rapamycinon angiogenesis in chick chorioalantoic membrane. *J Arak Univ Med Sci*, 12(1); 73-80. [Persian].



# Synergic Application Effects of Bromelain and Low-Frequency Electromagnetic Field on the Aortic Ring on Angiogenesis

S. Moshtagh<sup>1</sup>, K. Parivar<sup>1</sup>, **J. Baharara**<sup>2</sup>, N. Hayati<sup>1</sup>, M. A. Kerachian<sup>3</sup>

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran. [baharara78@gmail.com](mailto:baharara78@gmail.com)

3. Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences (MUMS), Mashhad, Iran.

Received: 2017.14. 8

Accepted: 2018.11.11

## Abstract

**Introduction & Objective:** Angiogenesis has a role in many vital processes also many developmental processes are influenced by an electromagnetic field. On the other hand bromelain plant protease can inhibit cell proliferation. In the present study, the synergic effect of bromelain (plant protease) and low-frequency electromagnetic field on angiogenesis on a Wistar rat aortic ring was investigated.

**Material and Method:** In this experimental study, Wistar rat aorta was divided into pieces 1 mm and cultured in collagen matrices. After observation of the first sprouting of angiogenesis 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), the third sham-exposed group (treated with PBS and electromagnetic field off), the experimental groups 1 and 2 (treated with 100 and 200 µg/ml bromelain), the experimental groups 3 (treated with low frequency electromagnetic field (100 G) for 2 h and experimental group 4 treated with synergic effect of bromelain (100 µg/ml) and low frequency electromagnetic field (100 G) for 2 h. Angiogenesis was investigated and photographed by invert microscope immediately and also 24 hours after the treatment. Numbers and lengths of vessels were measured by Image J software. Data were analyzed by SPSS software and ANOVA & TUKEY in significant level ( $p < 0.05$ ).

**Results:** The average number and length of vessels decreased in treated groups with bromelain and electromagnetic fields. Synergic use of bromelain and electromagnetic fields reduced the average number and the length of vessels than using each one alone.

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

**Keywords:** *Angiogenesis; Bromelain; Electromagnetic field, Aortic Ring.*