

## اثرات دوزهای مختلف آتورواستاتین بر رگ زایی در پرده کوریوآلاتنویک

### جنین جوجه

دکتر جواد بهارآرا\*، دکتر سعیده ظفربالانزاد، دکتر خدیجه نژاد شاهرخ آبادی، زهرا حسامی

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

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۴ اصلاح نهایی: ۹۰/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۶

### چکیده:

زمینه و هدف: استانین ها ترکیباتی هستند که در تکثیر، مهاجرت، تمایز سلول های اندوتلیال و اشتقاق آنژیوبلاست ها از مغز استخوان نقش مهمی دارند. آنژیوژنز یا تشکیل رگهای خونی جدید، پدیده ای فعال و پیچیده است که برای تکوین جنین و سایر وقایع فیزیولوژیکی مورد نیاز است. در شرایط پاتولوژیک نظیر رشد تومورها نیز پیشرفت بیماری با رگ زایی ارتباط دارد. در پژوهش حاضر شناسایی تاثیر غلظت های مختلف ۰/۱ و ۱۰µm آتورواستاتین بر رگ زایی پرده کوریوآلاتنویک جوجه مورد بررسی قرار گرفت. روش بررسی: در این پژوهش تجربی تعداد ۴۲ عدد تخم مرغ نطفه دار نژاد Ross به طور تصادفی در سه گروه مساوی (شاهد، گروه تجربی ۱ و گروه تجربی ۲) قرار گرفتند. در روز دوم انکوباسیون، روی تخم مرغ ها پنجره باز شد و در روز هشتم یک اسفنج ژلاتینی روی پرده کوریوآلاتنویک قرار گرفت. گروه های تجربی با ۱۰ مایکرولیتر محلول آتورواستاتین ۰/۱ و ۱۰µm تیمار گردیدند. در روز دوازدهم انکوباسیون با کمک فوتواسترئو میکروسکوپ تحقیقاتی عکس تهیه گردید و تعداد و طول انشعابات عروقی در اطراف اسفنج ژلاتینی در تمام نمونه ها اندازه گیری گردید. نتایج به کمک آزمون آماری ANOVA و توکی تجزیه و تحلیل گردید.

یافته ها: میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در نمونه تیمار با آتورواستاتین ۰/۱µm در مقایسه با شاهد افزایش معنی دار نشان داد ( $P < 0/05$ ). همچنین میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در نمونه تیمار با آتورواستاتین ۱۰µm در مقایسه با شاهد کاهش معنی دار نشان داد ( $P < 0/05$ ).

نتیجه گیری: در این پژوهش نشان داده شد که داروی آتورواستاتین دارای تاثیرات وابسته به دوز دوگانه ای بر آنژیوژنز پرده کوریوآلاتنویک جوجه می باشد. لذا پیشنهاد می شود که استفاده از استانین ها به عنوان داروی جدیدی برای تعدیل رگ زایی می تواند جهت درمان بیماری های وابسته به آنژیوژنز مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: آتورواستاتین، پرده کوریوآلاتنویک، جنین جوجه مرغ، عامل آنژیوژنز.

### مقدمه:

تشکیل مویرگ های جدید از عروق اولیه است که در حالات مختلف پاتولوژیک از قبیل رشد تومور، متاستاز، آرتريت روماتوئید و همچنین در فرآیندهای فیزیولوژیک مانند رشد و نمو ارگان، ترمیم زخم و تولید مثل دخالت دارد، می توان آنژیوژنز را یک فرآیند

اولین رگ های خونی طی پدیده واسکولوژنز به شکل نو پدید از سلول های پیش ساز آندوتلیال با آرایش خاص بوجود می آیند و به تدریج شروع به انتشار، توسعه و تشکیل شاخه های جدید می کنند که به آن آنژیوژنز می گویند (۱). آنژیوژنز یا رگ زایی، به معنی

\*نویسنده مسئول: مشهد- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد- گروه زیست شناسی- تلفن: ۰۵۱۱-۲۲۲۳۱۲۷، E-mail: baharara@yahoo.com

۳- متیل گلوکوتاریل کوآنزیم A ردو کتاز که به استاتین‌ها معروف هستند به طور وسیعی جهت درمان افزایش کلسترول خون مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۰). این داروها مسیر تبدیل موالونات را مهار کرده و در نتیجه تولید کلسترول را کاهش می‌دهند (۱۱). استاتین‌ها به طور معمول در بیماران مبتلا به بیماری عروق کرونر استفاده می‌شود و عملکرد اندوتلیال را می‌توانند بهبود بخشند. شواهد آزمایشگاهی نشان می‌دهد استاتین‌ها دارای اثر پیش‌رگ‌زایی بوده که مرتبط با فعال شدن اکسید نیتریک سنتز اندوتلیالی است (۱۲). Walter و Zeiher بیان کردند که استاتین‌ها باعث حرکت و تمایز سلول‌های اجدادی اندوتلیال مشتق شده از مغز استخوان می‌شود که رگ‌زایی و ایجاد پوشش اندوتلیالی مجدد را سبب می‌شود (۱۳). آتورواستاتین از دیگر ترکیبات خانواده استاتین‌ها می‌باشد که نسبت به سایر اعضای این خانواده دارای عوارض جانبی کمتر و اثربخشی بیشتری می‌باشد (۱۴). این دارو از طریق تنظیم VEGF بواسطه  $\alpha$  Transforming growth factor (TGF $\alpha$ ) و  $\beta$  Transforming Growth Factor (TGF $\beta$ ) می‌تواند باعث مهار التهاب عروق در موش‌ها شود (۱۵). AMP-activated protein kinase (AMPK) و افزایش سنتز نیتریک اکساید اندوتلیالی مانع از آسیب سلول‌های بنیادی مزانشیمی و بقا آنها در شرایط بدون سرم و هایپوکسی می‌شود (۱۶). نیتریک اکساید به عنوان عامل تغییر قطر رگ‌های خونی معرفی شده است (۱۷). آتورواستاتین سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیالی Endothelial Progenitor Cells (EPCs) را از آپوپتوز حفظ می‌کند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد آتورواستاتین با مهار عملکرد هوموسیستین مانع از استرس اکسیداتیو و آپوپتوز (EPCs) می‌شود (۱۸). در پژوهش حاضر اثر داروی آتورواستاتین با دوز ۰/۱ و ۱۰  $\mu$ m بر آنژیوژنز پرده‌ی کوریوآلانتوتیک جوجه

ضروری در فیزیولوژی طبیعی دانست که در صورت عدم تعادل بین فاکتورهای القاء‌کننده و مهارکننده آنژیوژنز به هم خورده و شرایط برای بروز برخی بیماری‌ها به وجود می‌آید (۲، ۳). در بافت‌های طبیعی عوامل آنتی‌آنژیوژنیک بیشتر از عوامل آنژیوژنیک می‌باشد بنابراین آنژیوژنز رخ نمی‌دهد، عواملی مانند هیپوکسی و موتاسیون در انکوژن‌ها و سرکوب‌کننده‌های تومور که باعث افزایش غلظت فاکتورهای آنژیوژنیک و یا کاهش آنتی‌آنژیوژنیک شوند در این تعادل اختلال ایجاد نموده و آنژیوژنز انجام می‌گیرد. یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های اختصاصی رگ‌زایی Vascular endothelial growth factor (VEGF) است و VEGF-A فاکتور اصلی در رگ‌زایی است که اثر خود را از طریق فعال کردن دو گیرنده VEGFR-1 و VEGFR-2 به انجام می‌رساند (۴). افزایش برخی شاخص‌های آنژیوژنیک مانند VEGF نه تنها تشکیل عروق خونی جدید بلکه عروق لنفاوی درون تومور را نیز افزایش می‌دهد (۵). VEGF-A برای سلول‌های اندوتلیال عروق مشتق شده از سرخرگ‌ها، سیاه‌رگ‌ها و عروق لنفاوی به عنوان میتوژن عمل کرده و باعث افزایش آنژیوژنز می‌شود (۶). تحقیقات فعلی بیانگر آن است که استاتین‌ها علاوه بر اثرات کاهش‌دهنده سطح چربی خون دارای تاثیرات وسیعی بر فرایند التهاب و رگ‌زایی می‌باشند (۷). Vincent و همکاران بیان کردند استاتین‌ها قادر به کاهش تکثیر سلول‌های اندوتلیال و مهاجرت آن‌ها می‌باشند (۸). استاتین‌ها به صورت مستقیم با مهار بیان ژن‌های التهابی عملکرد ضد التهابی دارند به گونه‌ای که پس از درمان استاتینی بیان ژن‌های التهابی تغییر می‌کند (۹). از جمله ترکیبات دارویی که تاثیرات آن‌ها بر فرآیند رگ‌زایی مورد بررسی قرار گرفته است، استاتین‌ها می‌باشند. دسته دارویی 3-Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzyme--3 (HMG-Co-A) A مهارکننده آنزیم ۳-هیدروکسی

برای پاسخ به این سوال که آیا داروی آتورواستاتین با غلظت پایین ( $0.1\mu\text{m}$ ) و غلظت بالا ( $10\mu\text{m}$ ) دارای کدام نوع اثر (مهارى یا تحریکى) بر رگ زایی در پرده ی کوریوآلانتویک جوجه می باشد بررسی شده است.

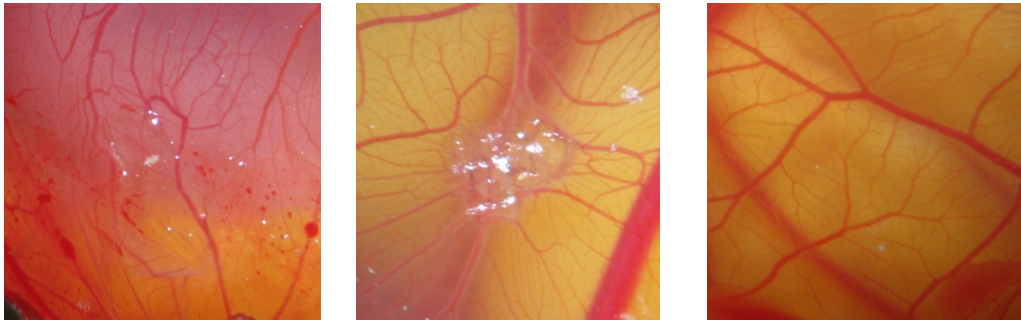
### روش بررسی:

این پژوهش تجربی در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست شناسی تکوین جانوری گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در سال ۹۰-۸۹ انجام شد. جهت انجام پژوهش از تخم مرغ های نطفه دار نژاد Ross که از شرکت مرگذاران طوس مشهد تهیه شده بود به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده شد. تعداد ۴۲ عدد تخم مرغ نطفه دار در ۳ گروه مساوی به صورت تصادفی توزیع شدند. این گروه ها شامل گروه شاهد، گروه تیمار با آتورواستاتین (شرکت تهران-شیمی) با غلظت  $0.1\mu\text{m}$  (گروه تجربی ۱) و گروه تیمار با آتورواستاتین با غلظت  $10\mu\text{m}$  (گروه تجربی ۲) بود. تخم مرغ ها در دستگاه جوجه کشی در دمای  $38.5$  درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۶۵-۵۵ درصد (دستگاه جوجه کشی تحقیقاتی ۵۸ خانه ساخت هلند) قرار گرفتند. در روز دوم انکوباسیون در شرایط کاملاً استریل ایجاد شده توسط هود لامینار (TelstarA v-100, Spain) بخشی از پوسته تخم مرغ ها برداشته شده و توسط لامل و پارافین استریل پنجره ای روی یک طرف تخم مرغ ها ایجاد گردید. سپس تخم مرغ ها به انکوباتور برگردانده شدند و در روز هشتم انکوباسیون پنجره ها در شرایط استریل برداشته شده و روی پرده کوریوآلانتویک جوجه ها یک اسفنج ژلاتینی (مرکب از آلبومین سفیده تخم مرغ و محلول آگار در نرمال سالین به نسبت مساوی که به صورت تازه در شرایط استریل تهیه می شد) به ابعاد  $4 \times 4 \times 1$  میلی متر قرار داده شد. در نمونه های تیمار گروه تجربی ۱، مقدار ۱۰ میکرولیتر آتورواستاتین  $0.1\mu\text{m}$  و نمونه های گروه تجربی ۲ مقدار ۱۰ میکرولیتر محلول آتورواستاتین  $10\mu\text{m}$  به اسفنج ژلاتینی

گروه های تیمار شده افزوده شد. سپس محل پنجره ها مجدداً پوشانیده و تخم مرغ ها به انکوباتور برگردانده شدند. از آن جا که پرده کوریوآلانتویک از روز پنجم انکوباسیون شروع به تشکیل کرده و در روز هشتم بیش از نیمی از وسعت درون تخم مرغ ها را اشغال می کند و هم چنین در این روز قلب کاملاً تشکیل شده و جدایی خون سیاهرگی و سرخرگی اتفاق افتاده است. لذا تیمار شبکه عروقی در روز هشتم انکوباسیون می تواند قابل توجه قرار گیرد. با توجه به گزارش Ruggiero و همکاران روزهای هشتم برای تیمار با آتورواستاتین ( $0.1\mu\text{m}$ ) و ( $10\mu\text{m}$ ) و روز دوازدهم برای تهیه عکس و اندازه گیری انتخاب شدند (۱۹). در روز دوازدهم انکوباسیون در تمام نمونه های شاهد و تیمارهای ۲ گانه از محدوده محل قرارگیری اسفنج ژلاتینی به کمک فوتواسترئومیکروسکوپ تحقیقاتی (Ziess, Germany) تصاویری با درشت نمایی ۶۴ برابر تهیه شد. تصاویر با نرم افزار Image J در یک مونیتر ۱۵ اینچ مورد بررسی قرار گرفتند. داده های مورد بررسی عبارت بودند از تعداد و طول انشعابات عروقی که در سطح مقطع یکسانی در ۴ طرف اضلاع اسفنج ژلاتینی برای تمام نمونه ها اندازه گیری شد. پس از بررسی نرمال بودن (تست نرمالیت) داده ها با استفاده از نرم افزار Spss توسط آزمون آماری ANOVA و توکی در سطح  $P < 0.05$  تجزیه و تحلیل گردید.

### یافته ها:

میانگین تعداد انشعابات عروقی ( $94/07 \pm 9/257$ ) و طول انشعابات عروقی ( $2/91 \pm 0/169 \text{mm}$ ) در گروه تیمار با آتورواستاتین  $0.1\mu\text{m}$  در مقایسه با میانگین تعداد انشعابات عروقی ( $50/71 \pm 5/494$ ) و طول انشعابات عروقی ( $2/23 \pm 0/840 \text{mm}$ ) گروه شاهد افزایش معنی دار نشان داد ( $P < 0.05$ ) در حالی که میانگین تعداد انشعابات عروق ( $16/36 \pm 1/636$ ) و طول انشعابات عروق ( $1/68 \pm 0/555 \text{mm}$ ) در گروه تیمار با آتورواستاتین  $10\mu\text{m}$



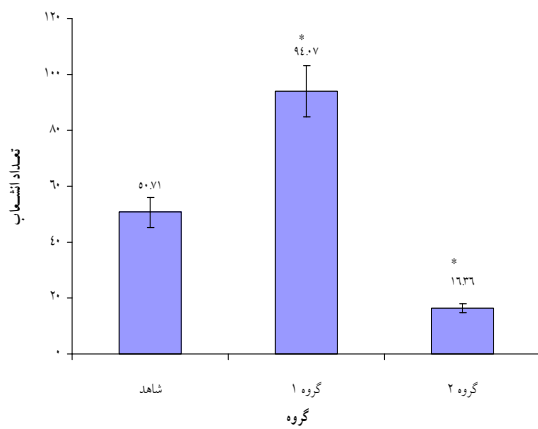
ج

ب

الف

### تصویر شماره ۱: تعداد و طول انشعابات عروقی در اطراف اسفنج ژلاتینی در گروه های مختلف

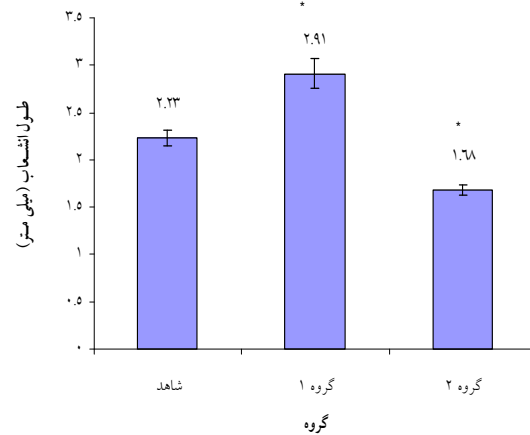
الف: نمونه شاهد. ب: نمونه ی تیمار شده با غلظت  $0.1 \mu\text{m}$  آتورواستاتین (افزایش تعداد و طول انشعابات عروقی) ج: نمونه ی تیمار شده با غلظت  $1.0 \mu\text{m}$  آتورواستاتین (کاهش تعداد و طول انشعابات عروقی)



### نمودار شماره ۱: میانگین تعداد انشعابات عروقی در گروه های مختلف

\* $P < 0.05$  نسبت به گروه شاهد.

گروه تجربی ۱: تیمار شده با غلظت  $0.1 \mu\text{m}$  آتورواستاتین  
گروه تجربی ۲: تیمار شده با غلظت  $1.0 \mu\text{m}$  آتورواستاتین



### نمودار شماره ۱: میانگین طول انشعابات عروقی در گروه های مختلف

\* $P < 0.05$  نسبت به گروه شاهد.

گروه تجربی ۱: تیمار شده با غلظت  $0.1 \mu\text{m}$  آتورواستاتین  
گروه تجربی ۲: تیمار شده با غلظت  $1.0 \mu\text{m}$  آتورواستاتین

رگ زایی در پرده ی کوریوآلانتویئیک جوجه است که این نتیجه به صورت افزایش معنی داری در تعداد و طول انشعابات عروقی اطراف محل تیمار با آتورواستاتین  $0.1 \mu\text{m}$  و کاهش معنی دار در تعداد و طول انشعابات عروقی اطراف محل تیمار با آتورواستاتین  $1.0 \mu\text{m}$  است مشاهده شد. مطالعات نشان داده است که آنژیوژنز در افراد بالغ غیر از مواردی مثل ترمیم زخم و سیکل ماهانه

در مقایسه با شاهد کاهش معنی داری نشان داد ( $P < 0.05$ ) (تصویر شماره ۱) (نمودار شماره ۱ و ۲).

### بحث:

نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که داروی آتورواستاتین با غلظت  $0.1 \mu\text{m}$  تحریک کننده ی رگ زایی و با غلظت  $1.0 \mu\text{m}$  مهار کننده ی

(خانم‌ها) به ندرت رخ می‌دهد. محققان بر این عقیده‌اند که برای القای آنژیوژنز در شرایط فیزیولوژیک یا پاتولوژیک که مشتمل بر مراحل متعددی است کاهش فشار اکسیژن (Hypoxia) در بافت از اهمیت زیادی برخوردار است (۲۰). در چنین شرایطی بافت دچار هایپوکسی، اقدام به سنتز و رهاسازی فاکتورهای آنژیوژنیک همچون فاکتور رشد سلول‌های اندوتلیال (VEGF) می‌کند. این فاکتورها پس از اتصال به گیرنده‌های خود بر روی سلول‌های اندوتلیال منجر به فعال شدن آن‌ها می‌شود. با شروع فعالیت سلول‌های اندوتلیال، انواع خاصی از متالوپروتئینازها از سلول فوق ترشح می‌شود و غشای پایه را در منطقه مذکور تجزیه می‌کند. با هضم غشای پایه، سلول‌های اندوتلیال اقدام به مهاجرت و تکثیر می‌نماید. علاوه بر این سلول‌های اتصال از قبیل اینتگرین  $\alpha 3\beta 7$  و  $\alpha V\beta 5$  نیز به فرایند کشیدن و جلو رفتن جوانه‌های رگ‌های خونی در حال رشد کمک می‌نماید. در مراحل بعدی فرایند آنژیوژنز متالوپروتئینازهای ماتریکس (matrix metalloproteinases= MMP) جهت تجزیه ماتریکس خارج سلولی و آغاز بازسازی مجدد آن تولید می‌شوند. سپس با برهم کنش آنژیوتین  $Tie2$  فرایند تشکیل لوله آغاز می‌گردد و در مرحله ی بعد سیستم (EphB- ephrin B) نیز تنظیم فرایند تشکیل لوله‌ها را بر عهده گرفته و در نهایت پری سیت‌ها و سلول‌های ماهیچه‌ای صاف برای پایدار شدن رگ خونی تازه تشکیل شده به این ساختار اضافه می‌شوند (۲۱). تحقیقات نشان می‌دهد که فاکتورهای موثر بر رشد موجود در سرم جنینی گاو باعث افزایش آنژیوژنز می‌شود که این نتیجه اهمیت فاکتورهای رشد در پیشبرد آنژیوژنز را نشان می‌دهد (۱۷). در گزارشی محققین بیان کردند که اثرات وابسته به دوز استاتین‌ها مستقل از تاثیر این ترکیبات بر میزان چربی خون است این محققین بیان کردند تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های اندوتلیال در غلظت‌های پایین ( $0.1\mu m$  -

۰/۰۰۵) استاتین‌ها افزایش یافته اما به طور مشخصی در غلظت‌های بالا ( $1\mu m$  - ۰/۰۱) کاهش می‌یابد هم چنین این محققین بیان کردند که اثرات ضد رگ‌زایی استاتین‌ها در غلظت‌های بالادر ارتباط با کاهش ترشح VEGF از سلول‌های اندوتلیال و هم‌چنین افزایش آپوپتوز در این سلول‌ها می‌باشد نتیجه به دست آمده از مطالعه ی این محققین با نتیجه ی مطالعه ی ما مشابه است و لازم به ذکر است که در مطالعه ی این پژوهشگران اثرات استاتین‌ها بر سلول‌های اندوتلیال بررسی شده است که احتمالاً همین امر اختلاف دوز دارویی به کار رفته می‌باشد (۲۲). در مطالعه ی دیگری مشاهده شد که استاتین‌ها دارای اثرات پیش‌رگ‌زایی بوده که منجر به تحریک رشد عروق جدید می‌شوند و هم چنین تولید اکسیدنیتریک (No) توسط سلول‌های اندوتلیال را افزایش می‌دهند (۲۳). نتایج پژوهش حاضر مبنی بر دوگانه بودن اثرات آتورواستاتین بر آنژیوژنز با مطالعه ی Montaseri و همکاران سازگار است. بر اساس گزارش Montaseri و همکاران آتورواستاتین دارای اثرات دوگانه ای بر آنژیوژنز و رشد بافت اندومتر می‌باشد طوری که این دارو در دوز پایین  $0.1\mu m$  منجر به افزایش آنژیوژنز و رشد بافت در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. اما دوزهای بالاتر آتورواستاتین ( $1\mu m$  و  $10\mu m$ ) آنژیوژنز و رشد بافت را نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهند که این کاهش رشد شامل کاهش تکثیر سلولی و کاهش میزان رگ‌زایی می‌باشد، لازم به ذکر است که یافته‌های منتصری از تاثیر آتورواستاتین بر بافت آندومتر انسان در زمینه ی سه بعدی فیبرینی و به شکل *in vitro* صورت پذیرفته است در حالی که مطالعه ی ما به صورت *in vivo*، بر پرده ی کوریوآلتوتیک جوجه انجام شده است (۱۰). در پژوهش حاضر مکانیسم احتمالی افزایش و کاهش آنژیوژنز تحت اثر دوز پایین و بالای آتورواستاتین را می‌توان بر اساس پژوهش Laufs پیشنهاد نمود، چنان که Laufs گزارش کرد که

### نتیجه گیری:

در این پژوهش نشان داده شد که داروی آتورواستاتین دارای تاثیرات وابسته به دوز دوگانه‌ای بر آنژیوزنز پرده کوریو آلتونیکک جوجه می‌باشد. لذا پیشنهاد می‌شود که استفاده از استاتین‌ها به عنوان داروی جدیدی برای تعدیل رگ‌زایی می‌تواند جهت درمان بیماری‌های وابسته به آنژیوزنز مورد استفاده قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی:

از کلیه همکاران محترمی که در انجام این پژوهش همکاری نموده‌اند به ویژه مدیر گروه زیست‌شناسی دانشکده‌ی علوم پایه سرکارخانم دکتر خیاط‌زاده، شرکت داروسازی تهران-شیمی، سرکارخانم آزاده منتصری، جناب آقای محمد شورورزی کارشناس ارشد آمار و جناب آقای محمد علی بهمن یار مدیر بازرگانی شرکت مرغداران طوس و همکاران آزمایشگاه تحقیقات تکوین جانوری تشکر و قدردانی می‌شود.

دوزهای پایین استاتین از طریق افزایش تولید اکسید نیتریک (NO) منجر به تحریک رگ‌زایی می‌شوند، در حالی که این ترکیبات در دوزهای بالا پرنیله شدن پروتئین‌ها را کاهش داده و باعث مهار رشد سلول می‌شود (۲۴). پژوهشگران در طی مطالعه‌ی اثر غلظت‌های  $1\mu\text{m}$ ،  $5\mu\text{m}$  و  $10\mu\text{m}$  داروی لوواستاتین را بر کشت بافت اندومتر انسانی نشان دادند. آن‌ها بیان کردند که داروی لوواستاتین در غلظت‌های  $5\mu\text{m}$  و  $10\mu\text{m}$  دارای اثرات مهارکننده‌ی رشد بافت اندومتر می‌باشد و هیچگونه اثر دوگانه‌ای را گزارش نکردند (۲۵). در مطالعه‌ی دیگری مشاهده شد که داروی سیمواستاتین محرک پدیده‌ی رگ‌زایی می‌باشد که احتمالاً از طریق فعال‌سازی فاکتور پروتئین کیناز Akt/PkB سلول‌های اندوتلیال این اثر را اعمال می‌کند (۲۶). بر اساس این پژوهش انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که آتورواستاتین با دوز کم می‌تواند آنژیوزنز را افزایش دهد در حالی که آتورواستاتین با دوز بالا اثر کاهشی بر آنژیوزنز دارد.

### منابع:

1. Zafar-Balanezhad S, Parivar K, Baharara J, Mohseni-Koochesfahani H, Ashraf A. [The synergic effects of rapamycin and extremely lowfrequency electromagnetic field on angiogenesis. J Shahrekord Univ Med Sci. 2009 Aug; 12(2): 7-14.]Persian
2. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*. 2003; 3(7): 51-643.
3. Heidenreich R, Rcken M, Ghoreschi K. Angiogenesis: the new potential target for the therapy of psoriasis? *Drug News Perspect*. 2008; 21(2): 97-105.
4. Otrrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis*. 2007 Sep-Oct; 39(2): 212-20.
5. Marneros AG. Tumor angiogenesis in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Jun; 23(3): 431-46.
6. Mansouri K, Mostafaie A, Mohammadi-Motlagh H. [Angiogenesis and Tumor Biology. J Improve, Kermanshah Univ Med Sci. 2010 Winter; 14(4): 305-15.]Persian
7. Ruiz-Velasco. Statins upregulate CD 36 expressin in human monocytes an affect strengthened when combined with PPAR-gamma ligand putative contribution of Rho GTPase in statin-induced CD36 expression. *Biochem Pharmacol*. 2004; 67(2): 303-13.

8. Vincent L, Chen W, Hong L. Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effect. *FEBS Lett.* 2001 Apr; 495(3): 159-66.
9. Yan-Wang A, HeChang A, JunZou BC, XinJin B, Zhongquan QI. The effect of atorvastatin on m-RNA levels of inflammatory genes expression in human peripheral blood lymphocytes by DNA microarray. *Biomed Pharmacother.* 2011 Mar; 65(2): 118-22.
10. Montaseri A, Khazaei M, Ghorbani R, Rezaei M. Evaluating the effect of Atorvastatin on culture human endometrial tissue in a three-dimensional. *J Reproduct Infertil.* 2007; 7(6): 358-66.
11. Graaf MR. The risk of cancer in users of statins. *J Clin Oncol.* 2004; 22(12): 2388-94.
12. Boodhwani M, Shigetoshi M, Feng J, Neel R, Sodha Richard T, Clements Atorvastatin impairs the myocardial angiogenic response to chronic ischemia in normocholesterolemic. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 Jan; 135(1): 117-22.
13. Walter DH, Zeiher AM, Dimmeler S. Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells. *Coron Artery Dis.* 2004; 15(5): 235-42.
14. Wierzbicki AS. Atorvastatin. *Expert Opin Pharmacother.* 2001; 2(5): 819-30.
15. Araujo FA, Rocha MA, Mendes JB, Andrade SP. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ . *Biomed Pharmacother.* 2010 Jan; 64(1): 29-34.
16. Xiao-Mei B, Chun-Fang W, Guo-Ping L. Atorvastatin inhibits homocysteine-induced oxidative stress and apoptosis in endothelial progenitor cells involving Nox4 and p38 MAPK. *Atherosclerosis.* 2010; 210: 114-21.
17. 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.* 2009; 12(2): 18-27.] Persian
18. Qiuting D, Yuejin Y, Lei S, Haiyan Q, Zhimin X. Atorvastatin prevents mesenchymal stem cells from hypoxia and serum-free injury through activating amp-activated protein kinase. *Int J Cardiol.* 2011 Dec; 153(3): 306-11.
19. 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 Jul; 25(5): 390-6.
20. Martinez A. A new family of angiogenic factors. *Cancer Lett.* 2006 May; 236(2): 157-63.
21. Mostafaie A, Mohammadi Motlagh H, Mansouri K. Angiogenesis and the models to study angiogenesis. *Med J Cell.* 2009 Sep; 11(4): 374-81.
22. Weis M, Heeschen C, Glassford A, Cooke J. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation.* 2002 Feb; 105(6): 739-45.
23. Rorowski A, Walsh K. Statin therapy and angiogenesis. *Curr Opin Lipidol.* 2003; 14(6): 599-603.
24. Laufs U. Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003; 58(11): 719-31.
25. Esfandiari N, Khazaei M, Ai J, Bielecki R, Gotlieb L, Ryan E, Casper R. Effect of statin on an in vitro model of endometriosis. *Fertil Steril.* 2006; 87(2): 257-62.
26. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med.* 2000 Sep; 6(9): 1004-10.

## The effects of different doses of atorvastatin on angiogenesis of chorioallantoic membrane of chick embryo

Baharara J (PhD) \*, Zafar-Balanezhad S (PhD), Nejad-Shahrokhbabadi Kh (PhD),  
Hesami Z (MSc)

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

Received:25/Aug/2011      Revised: 15/Feb/2012      Accepted: 24/Feb/2012

**Background and aims:** Statins promote the proliferation, migration and survival of endothelial cells and bone marrow -derived endothelial progenitor cells (Angioblasts). Angiogenesis, the formation of new blood vessels, is a dynamic and complex activity which is needed for embryogenesis and other physiological processes. However, in many pathological conditions such as solid tumor progression, the disease appears to be associated with persistent up-regulated angiogenesis. In this research we used atorvastatin (0.1 $\mu$ m) and (10  $\mu$ m) on angiogenesis of chick embryo.

**Methods:** In this experimental study 42 Ross fertilized eggs were randomly divided into 3 groups as follows: 1) control group, 2) group treated with atorvastatin (0.1 $\mu$ m), 3) group treated with atorvastatin (10 $\mu$ m). In day 2 a window was opened on eggs in sterile condition and In day 8 gelatin sponge was placed on chorioallantoic membrane (CAM) and was soaked with 10 microliters atorvastatin (0.1 $\mu$ m) and (10  $\mu$ m) in group 2 and group 3. In day12 CAMs were examined and photographed by research photo-stereomicroscope in all cases. Data were analyzed statistically by ANOVA and Tukey tests.

**Results:** The average number and length of vessels in control and the group treated with atorvastatin (0.1 $\mu$ m) showed a significant increase ( $P<0.05$ ) and the average number and length of vessels in the group treated with atorvastatin (10  $\mu$ m) showed a significant decrease compare to control group ( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** The results of this study showed that atorvastatin has a stimulatory effect on angiogenesis in CAM and atorvastatin (10  $\mu$ m) has an inhibitory effect on angiogenesis in CAM. It is suggested that atorvastatin can be used as a new medicine for angiogenesis balancing in treatment of diseases related to angiogenesis.

**Keywords:** Angiogenesis factor, Atorvastatin, Chorioallantoic membrane, Chick embryo.

**Cite this article as:** Baharara J, Zafar-Balanezhad S, Nejad-Shahrokhbabadi Kh, Hesami Z. [The effects of different doses of atorvastatin on angiogenesis of chorioallantoic membrane of chick embryo. J Sharekord Univ Med Sci. 2012 May, June; 14(2): 12-19.]Persian

---

**\*Corresponding author:**

Biology Dept., Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, I.R. Iran. Tel:  
00985116223137, E-mali:baharara@yahoo.com