

اثرات توام راپامایسین و میدان الکترومغناطیسی با فرکانس بسیار پایین بر آنژیوزنز

سعیده ظفر بالاآزاد*، دکتر کاظم پریور**، دکتر جواد بهار آرا***، دکتر هما محسنی کوچهفهمانی†، دکتر علیرضا اشرف††
 *دانشجوی دکتری تخصصی زیست شناسی تکوین جانوری-دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، **استاد گروه زیست شناسی-دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ***استادیار گروه زیست شناسی-دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، †استادیار گروه زیست شناسی-دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ††استادیار گروه فیزیک-دانشگاه آزاد اسلامی مشهد.
 تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۲۱ تاریخ تایید: ۸۸/۶/۷

چکیده:

زمینه و هدف: آنژیوزنز یا تشکیل رگ های خونی جدید، پدیده ای فعال و پیچیده است که برای تکوین جنین و سایر وقایع فیزیولوژیکی مورد نیاز است. در بسیاری شرایط پاتولوژیک نظیر رشد تومورها نیز پیشرفت بیماری با رگ زایی ارتباط دارد. در این پژوهش اثرات توام راپامایسین و میدان های الکترومغناطیسی، با شدت ۴۰۰ گوس بر آنژیوزنز بررسی گردید.

روش بررسی: تعداد ۷۰ عدد تخم مرغ نطفه دار نژاد Ross در این پژوهش تجربی بطور تصادفی در ۵ گروه: گروه شاهد، شاهد آزمایشگاهی، تیمار با راپامایسین، تیمار با میدان مغناطیسی و تیمار با راپامایسین و میدان مغناطیسی بطور توام قرار گرفتند. در روز دوم انکوباسیون، روی تخم مرغ ها پنجره باز شد و در روز هشتم یک اسفنج ژلاتینی روی پرده کوریوآلانتوئیک قرار گرفت که در گروه های تجربی ۳ و ۵ با ۵ مایکرولیتر محلول راپامایسین آغشته گردید. در روز دهم انکوباسیون تخم مرغ های گروه های ۴ و ۵ به مدت ۴ ساعت در میدان مغناطیسی با شدت ۴۰۰ گوس قرار گرفتند و در روز دوازدهم انکوباسیون به کمک فوتواسترئومیکروسکوپ 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 های آماری من ویتنی و ANOVA تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در نمونه های شاهد و شاهد آزمایشگاهی اختلاف معنی داری وجود نداشت. انشعابات در نمونه های تیمار شده با راپامایسین و یا میدان مغناطیسی با شاهد نشان دهنده کاهش معنی دار دو گروه تیمار شده بود ($P < 0/01$). میانگین تعداد و طول انشعابات در نمونه های تیمار شده با راپامایسین و میدان الکترومغناطیسی توام در مقایسه با نمونه های تیمار با راپامایسین، کاهش معنی داری را در تیمار توام نشان داد ($P < 0/01$).

نتیجه گیری: نتایج این بررسی بیانگر اثرات تشدید کننده مهار راپامایسین بوسیله میدان الکترومغناطیسی با شدت ۴۰۰ گوس بر آنژیوزنز جوجه می باشد.

واژه های کلیدی: آنژیوزنز، پرده کوریوآلانتوئیک، راپامایسین، میدان الکترومغناطیسی.

مقدمه:

شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی خاص نظیر بارداری، ترمیم زخم، رتینوپاتی دیابتیک، پزوریازیس، آرتریت روماتوئید و یا تومورها اتفاق می افتد (۲). از آنجا که آنژیوزنز در پدیده های پاتولوژیک نظیر رشد و متاستاز تومورهای سرطانی نقش مهمی ایفا می کند، لذا می تواند هدف درمان های ضد توموری قرار گیرد. یکی

اولین رگ های خونی طی پدیده وسکولوزنز به شکل نوپدید از سلول های پیش ساز آندوتلیال با آرایش خاص بوجود می آیند و بتدریج شروع به انتشار، توسعه و تشکیل شاخه های جدید می کنند، که به آن آنژیوزنز می گویند (۱). در افراد بالغ تشکیل رگ های خونی جدید بطور خیلی دقیق کنترل می شود و فقط در

بررسی اثرات تومورزایی احتمالی میدان های مغناطیسی با فرکانس متوسط (۶/۲۵ میلی تسلا) برای تومورهای پستان، ریه و پوست در موش تفاوت معنی داری در القاء تومور در سه مدل فوق نشان نداده است (۱۱، ۱۲). گزارشی که از اثر میدان های الکترومغناطیسی بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوییک جوجه در سال ۲۰۰۴ منتشر شده است بیان گر اثر مهاري میدان های الکترومغناطیسی با شدت ۰/۲ تسلا بر آنژیوژنز است (۱۳). در این پژوهش اثر توام میدان الکترومغناطیسی با شدت ۴۰۰ گوس و راپامایسین بر آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوییک جوجه بررسی شد، با این فرض که اولاً آیا میدان مغناطیسی ذکر شده (۴۰۰ گوس) دارای اثر مهاري بر آنژیوژنز می باشد و ثانیاً آیا می تواند اثر مهاري راپامایسین را بر آنژیوژنز تشدید کند. چنانچه میدان الکترومغناطیسی بتواند اثر ضد رگ زایی راپامایسین را افزایش دهد، می توان آن را به عنوان یک روش تکمیلی در درمان برای کاهش دوز مصرف دارو و کاهش اثرات جانبی آن پیشنهاد کرد.

روش بررسی:

این پژوهش تجربی در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست شناسی تکوینی جانوری گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در سال ۸۷-۸۶ انجام شد. از تخم مرغ های نطفه دار نژاد Ross به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده شد. نمونه های مورد مطالعه از شرکت مرغداران طوس مشهد تهیه گردید. تعداد ۷۰ عدد تخم مرغ نطفه دار در ۵ گروه آزمایشی بصورت تصادفی توزیع شدند. این گروه ها شامل: گروه ۱ شاهد، گروه ۲ شاهد آزمایشگاهی (Sham-exposed)، گروه ۳ تیمار با راپامایسین، گروه ۴ تیمار با میدان الکترومغناطیسی و گروه ۵ تیمار توأم با راپامایسین و میدان الکترومغناطیسی بود. تخم مرغ ها در دستگاه جوجه کشی در دمای ۳۸ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۷۰-۶۵ درصد (دستگاه جوجه کشی تحقیقاتی ۳۰ خانه ساخت شرکت دامدشت، مشهد، ایران) قرار

از داروهای درمان سرطان، راپامایسین است که بدوآ به عنوان یک داروی ضد قارچ و سپس مهار کننده سیستم ایمنی مورد استفاده قرار گرفت. این دارو با سه ترکیب دارویی مشابه در گروه داروهای مهار کننده هدف راپامایسین در پستانداران (mTOR: Mammalian Target of Rapamycin) قرار دارد. تمام مهار کننده های mTOR به mTOR کیناز متصل می شوند و در نهایت دو اثر مهم دارند: اول اینکه mTOR یک میانجی فرودست مسیر سیگنالینگ فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز / تیروزین کیناز (PI3K/AKT) است و این مسیر در تعداد زیادی از سرطان ها بیش از اندازه فعال می شود. دومین اثر بزرگ و قابل توجه مهار mTOR، آنتی آنژیوژنز است که با کاهش سطوح فاکتور رشد آندوتلیالی - عروقی (VEGF) صورت می گیرد (۳، ۴، ۵). راپامایسین یک فاکتور فرو دست مسیر سیگنالینگ فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز می باشد که در رشد و بقا تکثیر سلولی مداخله می کند (۶). راپامایسین نه تنها موجب توقف سلول در مرحله G1 چرخه سلولی می شود بلکه اثراتی در جهت هدایت سلول به سوی مرگ سلولی دارد (۷). راپامایسین نظیر سایر ترکیبات شیمیایی دارای اثرات جانبی نظیر ضعف عمومی، سردرد، کاهش وزن، درد مفاصل و... می باشد (۸).

گزارش های مختلفی از اثرات میدان های الکترومغناطیسی و بررسی ارتباط آن با وضعیت های پاتولوژیک ارایه شده است که نوع میدان، شدت آن، مدت زمان در معرض قرار گیری و به نظر برخی محققین محتوی ژنی نمونه بیمار شده، در نتایج این آزمایشات موثر نشان داده شده است (۹). همچنین مطالعات نشان داده است که میدان های الکتریکی پالسی و مستقیم با فرکانس پایین می توانند رشد و نمو جنینی را در مراحل ابتدایی در جنین جوجه تحت تاثیر قرار دهند که این تاثیر بصورت ایجاد ناهنجاری های رشد و نمو و کاهش وزن جنین ها ظاهر گردیده است (۱۰). در مطالعات انجام شده بر توان ایجاد تومور توسط میدان های الکترومغناطیسی نتایج متفاوتی بدست آمده است و

و در دو گروه تجربی تیمار با میدان الکترومغناطیسی و تیمار توام با راپامایسین و میدان الکترومغناطیسی، شدت میدان ۴۰۰ گوس برای نمونه ها تنظیم گردید. از آنجا که پرده کوریوآلانتوییک از روز پنجم انکوباسیون شروع به تشکیل کرده و در روز هشتم بیش از نیمی از وسعت درون تخم مرغ را اشغال می کند و همچنین در این روز قلب کاملاً تقسیم شده و جدایی خون سیاهرگی و سرخرگی اتفاق افتاده است، لذا تیمار شبکه عروقی در روز هشتم انکوباسیون می تواند قابل توجه قرار گیرد و با توجه به گزارش ارایه شده توسط Ruggiero و همکارانش روزهای هشتم برای تیمار با راپامایسین، دهم برای تیمار با میدان الکترومغناطیسی و دوازدهم برای عکس و اندازه گیری انتخاب شدند (۱۳). در روز دوازدهم انکوباسیون در تمام نمونه های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و تیمار های ۳ گانه، از محدوده محل قرار گیری اسفنج ژلاتینی به کمک فوتو استرنو میکروسکوپ تحقیقاتی (Ziess, Germany) تصاویری با درشتنمایی $4 \times 10 \times 65$ تهیه شد. تصاویر با برنامه فتوشاپ در یک مونیتور ۱۵ اینچ (BenQ, Iran) 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 (تصویر شماره ۲). داده ها با استفاده از آزمون های من ویتنی و ANOVA تجزیه و تحلیل گردید.

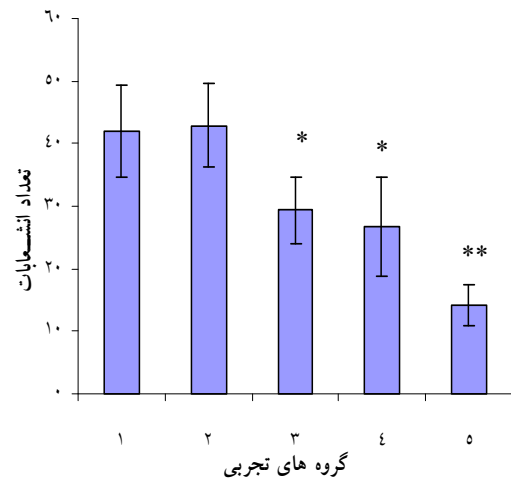
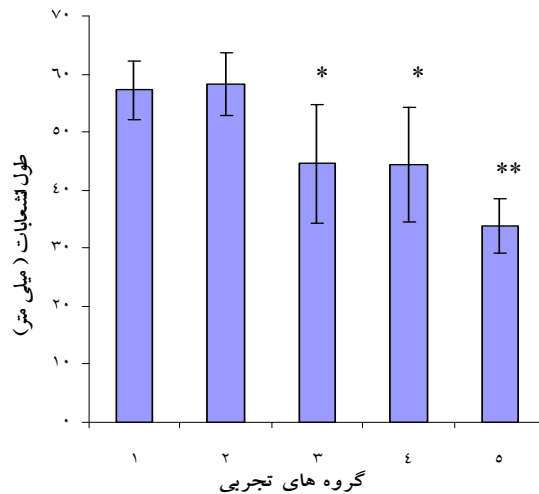
یافته ها:

نتایج حاصل از اندازه گیری میانگین تعداد و طول انشعابات رگ های خونی در اطراف محل تیمار در ۵ گروه شاهد، شاهد آزمایشگاهی، تیمار با راپامایسین، تیمار با میدان الکترومغناطیسی، تیمار با راپامایسین و میدان الکترومغناطیسی نشان داد اختلاف معنی داری بین دو گروه شاهد و شاهد آزمایشگاهی

گرفتند. در روز دوم انکوباسیون، در شرایط کاملاً استریل ایجاد شده توسط هود لامینار (Telstar AV-100, Spain) بخشی از پوسته تخم مرغ ها برداشته شده و توسط لامل و پارافین استریل (پارافین پاتولوژیکی فارا، ایران) 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 کوریوآلانتوییک جوجه ها یک اسفنج ژلاتینی (مرکب از آلومین سفیده تخم مرغ و محلول آگار در نرمال سالین به نسبت مساوی که بصورت تازه در شرایط استریل تهیه می شد) به ابعاد $1 \times 4 \times 4$ میلی متر قرار داده شد. در نمونه های تیمار با راپامایسین و تیمار توام با راپامایسین میدان الکترومغناطیسی به هر اسفنج مقدار ۵ میکرولیتر محلول راپامایسین اضافه شد (قرص های راپامیون ۱ میلی گرمی حل شده در DMSO مرکب آلمان و مقدار راپامایسین با در نظر گرفتن دوز موثر دارو در انسان که ۲ میلی گرم برای ۶۰ کیلوگرم وزن است و وزن متوسط جنین های ۸ روزه که بطور متوسط $2/3$ گرم است، محاسبه شده بود). سپس محل پنجره مجدداً پوشانیده و تخم مرغ ها به انکوباتور برگردانده شدند. در روز دهم انکوباسیون تخم مرغ های ۳ گروه شاهد آزمایشگاهی، تیمار با میدان الکترومغناطیسی و تیمار توام راپامایسین و میدان مغناطیسی به دستگاه جوجه کشی که در داخل یک سیم پیچ مولد میدان الکترومغناطیسی قرار داشت منتقل گردیدند. دستگاه مذکور در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست شناسی تکوینی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد طراحی و ساخته شده و توسط گوس متر، کالبره گردیده است و قادر به ایجاد میدان الکترومغناطیسی با شدت ۲۵ تا ۴۰۰ گوس بود. تخم مرغ ها به مدت ۴ ساعت در این سیم پیچ قرار گرفتند. در گروه شاهد آزمایشگاهی، نمونه ها در محیط آزمایشگاهی و در وضعیت خاموش در دستگاه مولد میدان قرار داده شدند

گوس نیز معنی دار بود ($P < 0.05$). کاهش معنی داری در تعداد و طول انشعابات در نمونه های تیمار شده با راپامایسین و میدان الکترومغناطیسی بطور توأم در مقایسه با تیمار با راپامایسین به تنهایی دیده شد ($P < 0.01$) (نمودارهای شماره ۱ و ۲).

وجود نداشت، لذا میدان الکترومغناطیسی در حالت خاموش بی تاثیر است. کاهش میانگین تعداد و طول انشعابات در گروه تیمار با راپامایسین در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0.01$). کاهش تعداد و طول انشعابات در گروه تیمار با میدان الکترومغناطیسی ۴۰۰



(ب)

(الف)

نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین تعداد و طول انشعابات در نمونه های تجربی

ب: طول انشعابات

الف: تعداد انشعابات

۱- گروه شاهد ۲- شاهد آزمایشگاهی ۳- تیمار شده با راپامایسین ۴- تیمار شده با میدان الکترومغناطیسی ۵- تیمار توأم با راپامایسین و میدان الکترومغناطیسی * $P < 0.01$ نسبت به گروه ۱ ** $P < 0.01$ نسبت به گروه ۳

بحث:

جدید که باید به سلول های آندوتلیال تمایز یابند استقرار پیدا کنند این سلول ها توسط فاکتور رشد آندوتلیالی عروقی (VEGF) و سایر سایتوکین ها تحریک می شوند (۱۴). VEGF یکی از فاکتورهای اصلی در آنژیوزنز بوده، همچنین میتوز و یک فاکتور تمایز سلولی نیز می باشد که همراه با رسپتورهای با تمایل بالای خود (VEGFRs) یک سیستم سیگنالینگ کلیدی را در آنژیوزنز، در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک تشکیل می دهد و در پدیده هماتوپویز و تکوین عصبی نیز دخیل می باشد (۱۵، ۱۶، ۱۷). عوامل دیگری نظیر فاکتور رشد عصبی (NGF)، فاکتور رشد اپیتلیالی (EGF) و عواملی نظیر هیپوکسی و اسیدوز نیز

نتایج بدست آمده از بررسی توأم میدان الکترومغناطیسی با شدت ۴۰۰ گوس و راپامایسین بر آنژیوزنز در پرده کوریوآلاتنویک جوجه موید اثر تشدید کننده میدان الکترومغناطیسی ۴۰۰ گوس بر مهار انجام شده توسط راپامایسین است که این نتیجه بصورت کاهش معنی دار در تعداد و طول انشعابات عروقی اطراف محل تیمار، در تجربیات بکارگیری توأم راپامایسین و میدان در مقایسه با تیمار با راپامایسین به تنهایی مشاهده شد. مطالعات نشان داده است که در افراد بالغ سلول های پیش ساز آندوتلیال در گردش خون وجود دارد که از مغز استخوان منشاء می گیرند، این سلول ها می توانند در محل تشکیل رگ های خونی

می توانند بیان فاکتور رشد آندوتلیالی عروقی را تنظیم کنند (۱۹،۱۸). راپامایسین با مهار فعالیت کینازهای وابسته به سیکلین (CDKs)، مهار فسفریلاسیون پروتئین رتینوبلاستوما (Rb) و توقف چرخه بازیابی سیکلین D1 و در نهایت اختلال در عملکرد کمپلکس CDK - سیکلین D1 باعث توقف گذر سلول از مرحله G1 به S در چرخه سلولی می شود (۲۰). اثر آنتی آنژیوژن راپامایسین در این پژوهش با کاهش میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در نمونه های تیمار شده با راپامایسین تایید شد. برای میدان های الکترومغناطیسی مکانیزم های مختلفی، به هر دو شکل گرمایی و غیر گرمایی، شناسایی شده اند که به این وسیله میدان های الکترومغناطیسی با سیستم های زیستی در تقابل قرار می گیرند. مکانیزم های گرمایی، مربوط به گرم شدن بافت ها هستند که در نتیجه تبدیل انرژی الکتریکی به انرژی گرمایی ایجاد می شود و مکانیزم های غیر گرمایی به ارتباط مستقیم با خود میدان وابسته است به این ترتیب که جریان های الکتریکی با فرکانس پایین با تحریک پذیری غشاء تداخل ایجاد کرده و آستانه تحریک غشاء را کاهش می دهند (۲۱). Shupak و همکارانش نشان دادند که از میدان های الکترومغناطیسی با فرکانس پایین در برخی شرایط پاتولوژیکی خاص، نظیر شکستگی های استخوان، زخم های پوستی، میگرن و تحلیل اعصاب به عنوان درمان استفاده می شود (۲۲). تجربیات انجام شده در مهندسی بافت توسط Tsai و همکارانش نیز که به منظور درمان آسیب های آناتومیکی استخوان انجام شده، موید اثر مثبت میدان های الکترومغناطیسی پالسی (PEMF) در افزایش تکثیر استئوبلاست های جدا شده از رت های تازه متولد شده در محیط *in vitro* می باشد (۲۳). Bare گزارشی با عنوان میدان های پالسی در کمک به شیمی درمانی منتشر کرد که در آن به خلق یک سینرژسم بیوشیمیایی، الکتروشیمیایی در ایجاد روش های درمانی موثرتر اشاره کرده است. اساس گزارش Bare بر این

پایه استوار است که هر سلول در بدن دارای گروهی از پارامترهای الکتریکی است که در نتیجه شارژیون ها و پروتئین در دو سوی غشاء ایجاد می شود. وقتی یک سلول سرطانی می شود غشاء پلاسمایی دپلاریزه و تخریب می شود، در نتیجه نفوذ پذیری سلول به آب و یون های نظیر سدیم افزایش پیدا می کند و همچنین این برهم خوردن تعادل در سلول های سرطانی منجر به تنفس بی هوازی این سلول ها می شود (۲۴). در نتیجه استرس هیپوکسی ایجاد شده، سلول های سرطانی ترکیباتی را می کنند که باعث آنژیوژن می شود و پاسخ های آنژیوژنیک به هیپوکسی می تواند به رشد تومور کمک کند و بر اساس بررسی انجام شده روی جنین های جوجه، میدان های الکترومغناطیسی می تواند این پاسخ به هیپوکسی را در سلول های سرطانی کاهش دهند (۲۵). ما نیز در این پژوهش کاهش معنی دار تعداد و طول رگ های خونی را در پرده کوریوآلانتوییک جوجه زمانی که در معرض میدان الکترومغناطیسی با شدت ۴۰۰ گوس قرار گرفتند مشاهده کردیم. از آنجا که استفاده از میدان های الکترومغناطیسی به دلیل عدم نیاز به جراحی و امکان گرد آوری در یک مکان نه چندان بزرگ آسان است و همچنین شواهدی بر وجود اثرات کارسینوژن و اثرات تخریبی بر DNA توسط این میدان ها وجود ندارد، لذا کاربری توأم میدان های مغناطیسی با روش های شیمی درمانی مطابق با نظریه ارایه شده توسط Bare توصیه می شود (۲۴). در این پژوهش نیز ما نشان دادیم که میدان الکترومغناطیسی با شدت ۴۰۰ گوس قادر است اثر مهاری راپامایسین بر آنژیوژن را در پرده کوریوآلانتوییک جوجه تشدید کند. با توجه به اینکه در این پژوهش از دوز موثر راپامایسین برای درمان در انسان استفاده گردیده است، پیشنهاد می شود که در پژوهش های بعدی با کاهش تدریجی دوز راپامایسین مقدار موثر تغییر در مصرف دارو مورد بررسی قرار گیرد. بدیهی است تغییر در شدت میدان لکترومغناطیسی

نیز می تواند دستمایه پژوهش های بعدی باشد.

معرض راپامایسین قرار گرفته اند، مشاهده شد.

نتیجه گیری:

بر اساس این پژوهش انجام شده می توان نتیجه گرفت که میدان الکترومغناطیسی با شدت ۴۰۰ گوس می تواند اثر مهاری راپامایسین را بر آنژیوزنز در پرده کوریوآلاتوئیک جوجه افزایش دهد. این تاثیر بصورت کاهش معنی دار در میانگین تعداد و طول عروق خونی نمونه هایی که در معرض راپامایسین و میدان بطور توأم قرار گرفته اند در مقایسه با نمونه هایی که تنها در

تشکر و قدردانی:

از کلیه همکاران محترمی که در انجام این پژوهش همکاری نموده اند، بویژه سرکار خانم دکتر آذرنوش جعفری مدیر محترم گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، آقای محمد علی بهمنیار مدیر بازرگانی و آقای محمد مرادیان مسئول بخش فروش شرکت مرغداران طوس و کارشناسان آزمایشگاه تحقیقاتی تکوین جانوری خانم ها زهره میرآخوری و معصومه صبوری تشکر و قدردانی می شود.

منابع:

1. Hendrix M, Seftor E, Seftor R. Vasculogenic mimicry: angiogenesis in disguise. In: Frough R. New frontiers in angiogenesis. Netherlands: Springer Netherlands; 2006. p: 97-109.
2. Breier G. Vasculogenesis. In: Unsicker K, Kriegstein K. Cell signaling and growth factors in development. Weinheim: Willey & Wang; 2006. p: 909-17.
3. Mc Gurl D. From easter island soil to treating sarcoma – rapamycin derivative [monograph on the Internet]. Liddy shriver sarcoma initiative. 2005. Available from: <http://www.sarcomahelp.org>.
4. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev. 2004 Aug; 18(6): 1926-45.
5. Beevers C, Li F, Liu L, Huang S. Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathway in cancer cells. Int J Cancer. 2006 Aug; 119(4): 757-64.
6. Quesada AR, Munoz-Chapuli R, Medina MA. Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials. Med Res Rev. 2006 Jul; 26(4): 483-530.
7. Dutcher JP. Mammalian target of rapamycin inhibition. Clin Cancer Res. 2004 Sep; 10(18 Pt 2): 6382S-7S.
8. American Society of Health System Pharmacists inc. Medline pluses [drugs and supplements on the Internet]. 2003 [last update 19.Dec .2007]. Available from: <http://www.fda.gov/MedWatch/report.htm>
9. Farrell JM, Litovitz TL, Penafiel M, Montrose CJ, Doinov P, Barber M, et al. The effect of pulsed and sinusoidal magnetic fields on the morphology of developing chick embryos. Bioelectromagnetics. 1997; 18(6): 431-8.
10. Ubeda A, Trillo MA, Chacon L, Blanco MJ, Leal J. Chick embryo development can be irreversibly altered by early exposure to weak extremely-low-frequency magnetic fields. Bioelectromagnetics. 1994; 15(5): 385-98.
11. Chung MK, Kim YB, Ha CS, Myung SH. Lack of a co-promotion effect of 60 Hz rotating magnetic fields on N-ethyl-N-nitrosourea induced neurogenic tumors in F344 rats. Bioelectromagnetics. 2008 Oct; 29(7): 539-48.

12. Lee HJ, Choi SY, Jang JJ, Gimm YM, Pack JK, Choi HD, et al. Lack of promotion of mammary, lung and skin tumorigenesis by 20 kHz triangular magnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 2007 Sep; 28(6): 446-53.
13. 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.
14. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2001 May; 193(9): 1005-14.
15. Breier G, Risau W. The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends Cell Biol*. 1996 Dec; 6(12): 454-6.
16. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003 Jun; 9(6): 669-76.
17. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995 Jul; 376(6535): 62-6.
18. Hiromatsu Y, Toda S. Mast cells and angiogenesis. *Microsc Res Tech*. 2003 Jan; 60(1): 64-9.
19. Ishii H, Suematsu M, Tanishita K, Suzuki H. Tumor angiogenesis regulated by gaseous molecules in tumor microenvironment: Oxygen, PH, and Nitric Oxide. In: Ishii H, Suematsu M, Tanishita K, Suzuki H. *Organ microcirculation*. Tokyo: Springer Tokyū Pub; 2005. p: 283-90.
20. Merimsky O. Targeting metastatic leiomyosarcoma by rapamycin plus gemcitabine: an intriguing clinical observation. *Int J Mol Med*. 2004 Nov; 14(5): 931-5.
21. Litvak E, Foster KR, Repacholi MH. Health and safety implications of exposure to electromagnetic fields in the frequency range 300 Hz to 10 MHz. *Bioelectromagnetics*. 2002 Jan; 23(1): 68-82.
22. Shupak NM, Prato FS, Thomas AW. Therapeutic uses of pulsed magnetic-field exposure: a review. *Sci Bull*. 2003 Dec; 307: 9-32.
23. Tsai MT, Chang WH, Chang K, Hou RJ, Wu TW. Pulsed electromagnetic fields affect osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering. *Bioelectromagnetics*. 2007 Oct; 28(7): 519-28.
24. Bare J. Pulsed field assisted chemotherapy. 2004. Available from [http://www. Rifetechnologies. com/pulsedfield.html](http://www.Rifetechnologies.com/pulsedfield.html).
25. Di Carlo AL, Mullins JM, Litovitz TA. Thresholds for electromagnetic field-induced hypoxia protection: evidence for a primary electric field effect. *Bioelectrochemistry*. 2000 Sep; 52(1): 9-16.

Received: 11/Jan/2009

Accepted: 29/Aug/2009

The synergic effects of rapamycin and extremely low frequency electromagnetic field on angiogenesis

Zafar-Balanezhad S (MSc)*¹, Parivar K (PhD)**², Baharara J (PhD)***³, Mohseni-Koochesfahani H (PhD)[†], Ashraf A (PhD)^{††}
*PhD Student, Biology Dept., Islamic Azad University Branch, Sciences & Research Branch, Tehran, Iran, **Professor, Biology Dept., Islamic Azad University Research and Sciences Branch, Tehran, Iran, ***Assistant professor, Biology Dept., Islamic Azad University, Mashhad, Iran, [†]Assistant professor, Biology Dept., Sciences & Research Branch, Tehran, Iran.
^{††}Assistant professor, Physical Dept., Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Background and aim: 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 0.04 T (tesla) electromagnetic field as a synergic treatment with rapamycin on angiogenesis.

Methods: In this experimental study, 70 Ross fertilized eggs were randomly divided into 5 groups as following: 1) control, 2) sham-exposed, 3) a group treated with rapamycin, 4) a group treated with electromagnetic field and 5) a group treated with both rapamycin and electromagnetic field. In day 2, a window was opened on eggs in sterile condition. In day 8 a gelatin sponge was placed on chorioalantoic membrane (CAM) and was soaked with 5 μ l rapamycin in group 3 and group 5. Groups 4 and group 5 were placed in 400 Gauss magnetic field for 4 hours in day 10. In day 12, CAMs were examined and photographed by research photo-stereomicroscope in all cases. Data were analyzed using ANOVA and Mann-Whitney tests.

Results: Comparison between average number and length of vessels in controls and sham-exposed didn't show any significant differences. In group 3 and 4, a significant decrease was shown in the average number and length compared with controls. Finally, comparison between group 3 and group 5 showed a significant decrease in the average number and length of vessels in group 5 which had been treated with both rapamycin and 400 (Gauss) G electromagnetic field.

Conclusion: The results of this study showed that 0.04 T magnetic field has an inhibitory effect on angiogenesis in CAM and can enhance the effect of rapamycin as an anti-angiogenesis drug.

Keywords Angiogenesis, Chorioalantoic membrane, Electro magnetic field,

¹Corresponding author
Sciences and Research
Branch, Islamic Azad
University, Tehran, Iran.
Tel:
09153147569
E-mail:
Mojgan_zafar@yahoo.com