

اثر میدان مغناطیسی فوق العاده کم فرکانس به همراه اوستین بر تکثیر سلول های اندوتلیال ورید بند ناف انسانی

وحید زراعتی^۱، پرویز عبدالمالکی^{۲*}، رضا حسن ساجدی^۳، عبدالکریم مؤذنی رودی^۴

- ۱- دانشجوی دکتری بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- استادیار بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: parviz@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۲۹

دریافت: ۱۴۰۰/۸/۰۱

چکیده

بررسی عوامل مؤثر بر تکثیر سلول های اندوتلیال یک بخش اساسی در مطالعه های رگ زایی است. نظر به اهمیت مهار رگ زایی در درمان سرطان ها و به دلیل عوارض جانبی و هزینه سنگین داروهای ضد رگ زایی مثل اوستین، کاربرد عوامل فیزیکی که در درمان کمک کنند و نیاز به دوزهای بالای دارو را کاهش دهند، شایسته توجه است. میدان های مغناطیسی به دلیل اثرگذاری از فاصله دور و غیرتهاجمی بودن، مورد توجه هستند و مطالعه های زیادی در مورد آثار آنها روی پدیده های زیستی از جمله رگ زایی انجام شده است که نتایج آنها ناهمگون بوده است. در مطالعه حاضر اثر میدان مغناطیسی متناوب ۲ میلی تسلا با فرکانس ۲۰۰ هرتز به همراه اوستین روی تکثیر سلول های اندوتلیال ورید بند ناف انسانی (HUVEC) بررسی شده است. سلول ها به مدت ۴۸ ساعت تحت تأثیر مخلوط محلول غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و اوستین در غلظت های (صفر (کنترل دارو)، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و همچنین گروه های تیمار میدان به مدت زمان های ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض میدان مغناطیسی قرار گرفتند. سپس بررسی تکثیر سلول ها با استفاده از تست رنگ سنجی آلاماربلو انجام شد. داده ها با آنالیز واریانس سه عاملی تحلیل شد. براساس یافته ها، زمان های مواجهه ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، کاهش معناداری در تکثیر سلول ها در مقایسه با گروه کنترل ایجاد کردند اما در تیمارهای ۳ و ۶ ساعت این تفاوت معنادار نبود. همچنین میزان آثار تداخلی عوامل مذکور با یکدیگر بر تکثیر HUVEC بررسی شد.

کلیدواژگان: میدان مغناطیسی، رگ زایی، اوستین، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، سلول اندوتلیال ورید بند ناف انسانی (HUVEC).

۱- مقدمه

بعد از تلاش‌های جودا فالكمن^۱ در ارائه شواهد کافی و تأکید بر اهمیت رگ‌زایی^۲ (ایجاد رگ‌های نوین از شبکه عروقی از قبل موجود) در رشد، متاستاز و مرگ‌آوری سرطان‌ها، جلوگیری از رگ‌زایی به رویکردی مهم در درمان بدخیمی‌ها تبدیل شده است [۱؛ ۲]. بعد از تکمیل رشد و رسیدن به بلوغ، به غیر از مواردی از قبیل رگ‌زایی در اندومتریوم^۳ زنان در چرخه تولیدمثلی و ترمیم زخم‌ها، رگ‌زایی متوقف می‌شود. اما در برخی بیماری‌ها از قبیل سرطان‌ها، رتینوپاتی دیابتیک^۴ و روماتیسم مفصلی تعادل مذکور به هم خورده و رگ‌زایی به صورت نابه‌جا رخ می‌دهد که موجب بدتر و وخیم‌تر شدن وضعیت بیمار می‌شود [۳-۵]. تاکنون ترکیب‌های ضد رگ‌زایی متعددی با سازوکارهای اثرگذاری مختلف برای مهار رگ‌زایی تومورها ساخته شده و استفاده می‌شوند [۶]. اوستین^۵ یا بواسیزومب^۶ یک آنتی‌بادی IgG مونوکلونال انسانی است که به صورت اختصاصی به فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)^۷ پیوند پیدا کرده و از راه کاهش میزان VEGF در دسترس برای اتصال به گیرنده‌های تیروزین کینازی^۸ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGFR2)^۹، باعث کاهش فعالیت آن و مهار رگ‌زایی می‌شود. اوستین از سال ۲۰۰۴ پس از گرفتن تأییدیه سازمان نظارت بر غذا و داروی آمریکا (FDA)^{۱۰} در رژیم شیمی‌درمانی انواع مختلفی از سرطان‌های متاستازدهنده استفاده شده است [۷]. اگرچه کاربرد اوستین در مهار رگ‌زایی و کمک به درمان سرطان‌ها موفقیت‌آمیز بوده، اما عوارض جانبی مهم همراه با آن به‌ویژه زمانی که با دوزهای بالا استفاده می‌شود، موجب محدود شدن کاربرد آن

شده است [۸؛ ۹]. از این رو پژوهشگران همواره به دنبال راه‌هایی برای افزایش آثار مفید درمانی اوستین و سایر داروهای ضد رگ‌زایی و در ضمن کاهش عوارض جانبی آنها بوده‌اند و استفاده از عوامل فیزیکی به عنوان درمان کمکی یکی از این راه‌ها بوده است. میدان‌های مغناطیسی از جمله عوامل فیزیکی هستند که قابلیت نفوذ در بافت‌های بیولوژیک را دارند و تصور می‌شود بتوانند به‌طور غیرتهاجمی بر فرایندهای زیستی از جمله رگ‌زایی اثر بگذارند [۱۰-۱۲]. بنابراین کاربرد میدان‌های مغناطیسی به همراه عوامل شیمیایی مهار رگ‌زایی با کاهش نیاز به دوزهای بالای عوامل مذکور و در نتیجه کاهش عوارض جانبی آنها، یکی از راهکارهای امیدوارکننده برای درمان مؤثرتر سرطان‌ها به شمار می‌رود [۱۳].

مطالعه تغییرات رگ‌زایی به سه شیوه برون‌تن^{۱۱}، کنارتن^{۱۲} و درون‌تن^{۱۳} انجام می‌شود. در روش‌های برون‌تن، بررسی‌ها روی سلول‌های مؤثر در رگ‌زایی از قبیل سلول‌های اندوتلیال عروق (معمولاً سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسانی (HUVEC)^{۱۴}) با توجه به آسانی استحصال و در دسترس بودن صورت می‌گیرند و ویژگی‌هایی مثل میزان تکثیر و در مراحل بعد مهاجرت و تمایز سلول‌ها و تشکیل ساختارهای لوله مانند ارزیابی می‌شوند. در روش‌های کنارتن، بخشی از بافت زنده در شرایط آزمایشگاهی در انکوباتور کشت و مطالعه می‌شوند. برای بررسی رگ‌زایی به این روش معمولاً برشی حلقوی از یکی از عروق (مانند آئورت موش معمولی یا موش صحرایی^{۱۵}) در محیط مناسب (معمولاً ماتریژل^{۱۶}) کشت و انشعابات عروقی ایجاد شده در آن بررسی می‌شود. روش‌های درون‌تن در آزمایش رگ‌زایی متنوع هستند و مدل‌های غشای کوریولانتوئیک جنین مرغ

- 1 Judah Folkman
- 2 Angiogenesis
- 3 Endometrium
- 4 Diabetic Retinopathy
- 5 Avastin
- 6 Bevacizumab
- 7 Vascular Endothelial Growth Factor
- 8 Tyrosine kinase
- 9 Vascular Endothelial Growth Factor Receptor2
- 10 US Food and Drug Administration

- 11 *in vitro*
- 12 *ex vivo*
- 13 *in vivo*
- 14 Human Umbilical Vein Endothelial Cells
- 15 rat
- 16 Matrigel

(*in or ex ovo*)، پلاگ^{۱۷} ماتریژل الصاق شده به بدن موش، رگ‌زایی در بافت انسانی پیوندشده به اندام گونه جانوری^{۱۸}، رگ‌زایی جنین ماهی گورخری^{۱۹} و رگ‌زایی در قرنیه خرگوش را شامل می‌شوند [۱۴].

در مطالعه‌های برون‌تن در مرحله اول، ارزیابی میزان تکثیر سلول‌های اندوتلیال اهمیت زیادی دارد، زیرا سلول‌ها نخست برای ایجاد عروق جدید باید تکثیر شوند. میانجی‌های شیمیایی که سلول را از بستر عروقی اولیه آزاد می‌کنند (MMPs^{۲۰})، معمولاً به‌طور غیرمستقیم، تکثیر آن را نیز تحریک می‌کنند [۱۴؛ ۱۵]. در مطالعه‌های متعددی گزارش شده است که میدان‌های مغناطیسی با ویژگی‌های مختلف از نظر نوع، شدت، فرکانس و مدت زمان مواجهه می‌توانند به صورت‌های مختلفی تکثیر سلول‌های اندوتلیال را متأثر سازند. در بسیاری از مطالعه‌ها، میدان مغناطیسی ایستا با شدت‌ها و زمان‌های مختلف استفاده شده است، مانند مطالعه بالیاسنیکووا^{۲۱} و همکاران وی (۱۹۹۴) که اثر میدان مغناطیسی ثابت ۱۴۰ میلی‌تسلا بر تکثیر و تمایز HUVEC را بررسی کرده‌اند و پوتنزا^{۲۲} و گروه او (۲۰۱۰) که اثر مواجهه ۴، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با میدان مغناطیسی ۳۰۰ میلی‌تسلا را روی رشد، زنده‌مانی و تمامیت DNA هسته و میتوکندری HUVEC بررسی کرده‌اند. یافته‌های هر دو گروه دلالت بر آن داشت که میدان‌های مذکور بر تکثیر HUVEC تأثیر از نظر آماری معناداری نگذاشته است، اگرچه برخی فرایندهای بین‌سلولی و درون‌سلولی تحت تأثیر قرار گرفته بودند [۱۶؛ ۱۷]. در مطالعه دیگری، لی^{۲۳} و همکاران (۲۰۰۷) میدان‌های مغناطیسی ایستا با شدت‌های مختلف ۰/۱ میلی‌تسلا، ۱ میلی‌تسلا و ۱۰ میلی‌تسلا روی تکثیر را آزمایش کرده و گزارش کردند که میدان مغناطیسی با چگالی شار ۰/۱

میلی‌تسلا روی تکثیر و رشد HUVEC اثر معناداری نمی‌گذارد، اما میدان‌های ۱ و ۱۰ میلی‌تسلا باعث کاهش تکثیر HUVEC شده و میدان ۱۰ میلی‌تسلا موجب القای آپوپتوز و نکروز نیز می‌شود [۱۸]. وانگ^{۲۴} و همکاران (۲۰۰۹) اثر میدان مغناطیسی ایستای دارای تغییرات مکانی با چگالی شار حداکثر ۴۰۰ و حداقل ۲۰۰ میلی‌تسلا، با شیب مکانی ۲ تسلا بر متر را روی تکثیر سلول‌های HUVEC بررسی کرده و مشاهده کردند که بعد از ۲۴ ساعت مواجهه، تکثیر آنها مهار می‌شود [۱۹]. مارتینو^{۲۵} و گروه وی (۲۰۱۰) اثر میدان‌های الکترومغناطیسی ایستای ۶۰ و ۱۲۰ میکروتسلائی تولیدشده با جفت کوئل هلمهولتز در داخل انکوباتور، روی تکثیر و برخی شاخص‌های زیست‌شناختی دیگر در سلول‌های HUVEC را بررسی کردند و دریافتند که اعمال میدان مغناطیسی ۶۰ میکروتسلا به‌صورت روزانه ۱ ساعت بعد از ۳ روز، تغییری در میزان تکثیر HUVEC ایجاد نمی‌کند درحالی‌که تیمار ۲۴ ساعته بعد از ۳ روز تکثیر HUVEC را به میزان ۴۰ درصد افزایش می‌دهد [۲۰]. Martino (۲۰۱۱) دوباره در مطالعه‌ای دیگر آثار میدان مغناطیسی ضعیف‌تر از میدان مغناطیسی زمین (۰-۱/۲ میکروتسلا)، ۳۰ و ۱۲۰ میکروتسلا (بعد از خشی کردن میدان مغناطیسی طبیعی زمین (۵۰ میکروتسلا)، روی تکثیر سلول‌های HUVEC را بررسی کرد و گزارش داد که میدان‌های ضعیف (کمتر از ۱ میکروتسلا) به گونه معناداری تکثیر را مهار می‌کند درحالی‌که میدان‌های ۳۰ و ۱۲۰ میکروتسلا تنها به میزان اندکی روی تکثیر اثرگذار هستند [۲۱]. این ناهمگونی نتایج را می‌توان به چیدمان (داخل یا خارج از انکوباتور بودن میدان مغناطیسی)، منبع میدان، شدت میدان، مدت زمان تیمار و نحوه ارزیابی نسبت داد. در مورد میدان‌های مغناطیسی متغیر با زمان، متغیرهای دیگری از قبیل فرکانس تغییرات و شکل و نحوه تغییرات (شکل موج میدان) نیز اضافه می‌شوند و می‌توان

17 Matrigel Plug
18 Xenograft
19 Zebrafish
20 Matrix Metallo-Proteinases
21 Balyasnikova
22 Potenza
23 Li

24 Wang
25 Martino

ترکیب‌های بسیار متنوعی از عوامل مذکور را برای یک آزمایش انتخاب و برای تیمار نمونه‌ها به کار برد. در این میان، میدان‌های پالسی شکل بیشتر مورد توجه بوده و استفاده شده است. در یکی از مطالعه‌ها، ین-پاتن^{۲۶} و همکارانش (۱۹۸۸) اثر میدان متغیر پالسی با چگالی شار میانگین ۱ گاوس (۱۰۰ میکروتسلا) و فرکانس ۱۵ هرتز و پهنای پالس ۲۰۰ میکروثانیه بر سلول‌های HUVEC و سلول‌های اندوتلیال آئورت گاو را بررسی کردند. نتایج نشان از افزایش نرخ رشد سلول‌ها و نیز افزایش جوانه‌های رگی، تحت تأثیر میدان مذکور بود [۲۲]. لی و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای دیگر گزارش دادند که میدان مغناطیسی پالسی ۱/۸ میلی تسلا با فرکانس ۱۵ هرتز به‌طور معناداری هم به‌طور مستقیم و هم غیرمستقیم اثر افزایش روی تکثیر سلول‌های اندوتلیال ریزرگ‌های قلبی موش صحرایی دارد. آنها همچنین دریافتند که سلول‌های تیمار شده با میدان مذکور تا ۱/۵ برابر، VEGF بیشتر و تا ۲ برابر، FGF-2 بیشتر در مقایسه با گروه کنترل تولید می‌کنند [۲۳]. هوپر^{۲۷} و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه دیگر اثر میدان‌های الکترومغناطیسی پالسی کم‌فرکانس روی ترمیم استخوان را بررسی کردند و دریافتند که میدان الکترومغناطیسی بسیار کم فرکانس ۱/۸ میلی تسلا، ۱۵ هرتز برای ۸ ساعت اثر غیرمستقیم روی نرخ تکثیر هم در سلول‌های اندوتلیال و هم در سلول‌های استئوبلاست رت از راه تغییر محیط پاراکرین^{۲۸} دارد و اینکه محیط کشت ثانوی حاصل از سلول‌های استئوبلاست که در معرض میدان مغناطیسی پالسی کم‌فرکانس بوده‌اند، تکثیر سلول‌های اندوتلیال را ۵۴ برابر افزایش می‌دهد و این افزایش به‌صورتی مستقل از VEGF رخ می‌دهد. با این حال محیط کشت ثانوی حاصل از سلول‌های اندوتلیال تیمار شده با همان میدان مغناطیسی، در تکثیر سلول‌های استئوبلاست

تغییری ایجاد نمی‌کند [۲۴]. دله‌موناچه^{۲۹} و همکاران (۲۰۰۸)، اثر تیمار ۱، ۶ و ۱۲ ساعته میدان مغناطیسی یک میلی‌تسلا با فرکانس ۵۰ هرتز و شکل موج سینوسی روی HUVEC را بررسی کرده و نشان دادند میدان مذکور باعث افزایش تکثیر و مهاجرت HUVEC و ایجاد ساختارهای لوله‌مانند از راه افزایش بیان و فسفریلاسیون VEGFR2 می‌شود [۲۵]. همین گروه در مطالعه بعدی سلول‌های HUVEC را در مدت زمان‌های ۱، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۲۴ ساعت در معرض میدان مغناطیسی ۲ میلی تسلا با فرکانس ۵۰ هرتز و همان شکل موج سینوسی قرار دادند و در همه مدت زمان‌های مواجهه، کاهش معناداری در تکثیر سلول‌ها مشاهده کردند. آنها همچنین رگ‌زایی روی پلاگ ماتریژل^{۳۰} حاوی سلول‌های سرطانی پیوند شده به موش را آزمایش کردند و گزارش دادند که میدان به‌کاررفته باعث مهار رگ‌زایی شده است [۱۳]. الگوهای مواجهه ترکیبی نیز در برخی پژوهش‌ها استفاده شدند، برای مثال در یک مطالعه سلول‌های HUVEC به‌طور همزمان در معرض یک میدان مغناطیسی ایستا و یک میدان مغناطیسی متغیر بسیار کم‌فرکانس قرار گرفتند و تغییرات در تکثیر آنها در مقایسه با سلول‌های HUVEC گروه کنترل مقایسه شد. در این مطالعه نشان داده شد که وقتی میدان مغناطیسی ایستای ۶۰ و یا ۱۲۰ میکروتسلاپی همزمان با یک میدان مغناطیسی بسیار کم‌فرکانس با شدت ۳۰ میکروتسلا و فرکانس ۱۸ هرتز همراه باشد، تکثیر به‌وسیله یک میدان کم‌فرکانس افقی و نه عمودی مهار می‌شود. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کرد که میدان مغناطیسی بسیار کم‌فرکانس ممکن است برای ایجاد آثار بیولوژیک نیاز به همراهی و تداخل با یک میدان ایستا داشته باشد و اینکه این آثار به جهت نسبی دو میدان نسبت به یکدیگر هم وابستگی خواهد داشت [۲۶]. در جدول ۱ تعدادی از مطالعه‌های انجام شده روی تکثیر اندوتلیالی به‌طور خلاصه آورده شده‌اند.

29 Delle Monache
30 Matrigel plug

26 Yen-Patton
27 Hopper
28 paracrine

جدول ۱ خلاصه مطالعه‌های انجام شده مورد استناد در مورد اثر میدان‌های مغناطیسی بر تکثیر سلول‌های اندوتلیال

رفرنس	نمونه آزمایش شده	پارامترهای میدان مغناطیسی و زمان مواجهه	نحوه بررسی	آثار گزارش شده
[۱۶]	HUVEC	میدان ایستا (آهنربای نئودیمیوم ^{۳۱} درون انکوباتور) ۱۴۰ میلی‌تسلا در زمان‌های ۵، ۶، ۷ و ۱۳ روز	شمارش سلول‌ها با لام هموسایومتر	فاقد اثر روی تکثیر، کاهش تشکیل سازه‌های لوله‌ای
[۱۷]	HUVEC	میدان ایستا (آهنربای نئودیمیوم درون انکوباتور) ۳۰۰ میلی‌تسلا ۴، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته	شمارش سلول‌ها با لام هموسایومتر	فاقد اثر روی تکثیر
[۱۸]	HUVEC	میدان ایستا میدان ایستا (آهنربای نئودیمیوم درون انکوباتور) ۰/۱ میلی‌تسلا، ۱ میلی‌تسلا و ۱۰ میلی‌تسلا مدت ۵۶ ساعت	بررسی تکثیر با MTT ^{۳۲} بررسی آپوپتوز با Annexin V /PI فلوسیتومتری و بکروسکوپ الکترونی	میدان ۰/۱ میلی‌تسلا فاقد اثر بر تکثیر، میدان‌های ۱ و ۱۰ میلی‌تسلا اثر مهاري روی تکثیر القای آپوپتوز ^{۳۳} و نکروز به وسیله میدان ۱۰ میلی‌تسلا
[۱۹]	HUVEC	میدان ایستای گرادانی حاصل از آهنربای ابرسانا با چگالی شار حداکثر ۴۰۰ و حداقل ۲۰۰ میلی‌تسلا، با شیب مکانی ۲ تسلا بر متر ^۰ ، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت	بررسی تکثیر با MTT	کاهش تکثیر متعاقب تیمار ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعته، تفاوت معنادار بین تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعته از نظر آماری
[۲۰]	HUVEC	میدان‌های ایستای ۶۰ و ۱۲۰ میکروتسلا تولید شده با جفت پیچه هلمهولتز داخل انکوباتور روزانه ۱ ساعت تا از ۳ روز ۲۴ ساعت تا ۳ روز	بررسی تکثیر با شمارش سلول‌ها با شمارشگر اتومات بررسی بیان ژن‌ها با RT-qPCR	فاقد اثر بر تکثیر با میدان ۶۰ میکروتسلا در رژیم روزانه ۱ ساعت بعد از ۳ روز، افزایش تکثیر به میزان ۴۰ درصد با تیمار ۲۴ ساعته مداوم بعد از ۳ روز، افزایش تکثیر تحت میدان ۱۲۰ میلی‌تسلا با ۲۴ ساعت در روز بعد از ۳ روز میزان به میزان ۴۰ درصد نبود تأثیر معنادار بر میزان بیان ژن VEGF در HUVEC
[۲۱]	HUVEC	میدان ۱۲۰ میکروتسلا (جفت پیچه هلمهولتز) استوانه میومنتال برای میدان بسیار ضعیف (LLF) (۰-۱/۲) میکروتسلا میدان مغناطیسی زمینه داخل انکوباتور ۳۰ میکروتسلا. زمان تیمار ۲ روز	بررسی تکثیر با شمارشگر اتومات	کاهش تکثیر در میدان‌های ضعیف LLF (کمتر از ۱ میکروتسلا)، افزایش تکثیر به میزان ۴۰ درصد برای میدان ۱۲۰ تسلا در مقایسه با گروه LLF، افزایش تکثیر در اثر میدان ۳۰ میکروتسلا داخل میدان انکوباتور در مقایسه با LLF
[۲۲]	HUVEC و سلول‌های اندوتلیال آنورت گاو	میدان‌های متغیر (جفت پیچه هلمهولتز) پالسی با چگالی شار ۱ گاوس و فرکانس ۱۵ هرتز و پهنای پالس ۲۰۰ میکروثانیه، ۵، ۱۲، ۲۴ ساعت ۱۰ روز	بررسی تکثیر با الحاق تیمیدین رادیواکتیو	افزایش (۲۰ تا ۴۰ درصد) تکثیر سلول‌ها افزایش جوانه‌های رگی
منبع	نمونه آزمایش شده	پارامترهای میدان مغناطیسی و زمان مواجهه	نحوه بررسی	آثار گزارش شده

31 Neodymium magnet

32 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenylTetrazolium bromide

33 Apoptosis

افزایش تکثیر هم HUVEC و هم در سلول‌های استئوبلاست، افزایش ۵۴ برابری تکثیر HUVEC با محیط کشت ثانوی سلول‌های استئوبلاست تیمارشده با میدان مغناطیسی تکثیر سلول‌های اندوتلیال (مستقل از VEGF) عدم تغییر در تکثیر استئوبلاست در اثر محیط کشت ثانوی حاصل از HUVEC تیمارشده با میدان مغناطیسی	بررسی تکثیر با الحاق تیمیدین رادیواکتیو	میدان (EBI Bone Healing Device) پالسی کم‌فرکانس ۱/۸ میلی تسلا، ۱۵ فرکانس هرتز برای ۸ ساعت	Fetal و HUVEC rat calvarial (FRC) cells (استئوبلاست رت)	[۲۴]
افزایش تکثیر HUVEC، افزایش مهاجرت سلول اندوتلیال، افزایش ایجاد ساختارهای لوله‌مانند افزایش بیان و فسفریلاسیون VEGFR2	بررسی تکثیر با MTT، بررسی مهاجرت سلول‌ها و تشکیل سازه لوله‌مانند به‌ترتیب با تست اتافک بویدن ^{۳۴} و کشت روی ماتریژل، بررسی بیان VEGF با الیزا	میدان (جفت پیچه هلمهولتز) ۱ میلی تسلا با فرکانس ۵۰ هرتز و شکل موج سینوسی به مدت ۱، ۶ و ۱۲ ساعت	HUVEC	[۲۵]
کاهش تکثیر سلول‌ها در تمام مدت زمان‌های تیمار، کاهش رگ‌زایی در درون‌تن	بررسی تکثیر با تست کریستال ویوله، آنالیز تصویر میکروسکوپی و تست‌های ایمنووهیستوشیمی پلاگ ماتریژل پیوندشده به موش	میدان (جفت پیچه هلمهولتز داخل انکوباتور) ۲ میلی تسلا با فرکانس ۵۰ هرتز و شکل موج سینوسی مدت زمان‌های ۱، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۲۴ ساعت	HUVEC پلاگ ماتریژل محتوی سلول‌های تومورال پیوندشده به موش در مدل درون‌تن	[۱۳]

برخلاف پژوهش‌های زیادی که در مورد کاربرد همراه با هم پرتوهای یونیزان و داروهای ضد رگ‌زایی مختلف به‌ویژه اواستین انجام شده است [۲۷-۳۳]، مطالعه‌ها در مورد آثار استفاده توأم میدان‌های مغناطیسی به همراه عوامل شیمیایی اثرگذار بر رگ‌زایی به نسبت کم تعداد بوده و از این میان پژوهش‌هایی که میدان مغناطیسی به کاررفته از نوع بسیار کم‌فرکانس است، انگشت‌شمار هستند [۳۴-۳۶]. از این رو می‌توان به مطالعه مشتاق و همکاران (۲۰۱۴) اشاره کرد که اثر محلول آبی عصاره زعفران و میدان مغناطیسی ۲۰۰ گاوسی با فرکانس ۵۰ هرتز را روی رگ‌زایی در مدل کنارتن با حلقه آئورت موش بررسی کردند و گزارش دادند که تیمار سه‌ساعته میدان مغناطیسی به کاررفته، اثر مهاری عصاره زعفران را افزایش می‌دهد [۳۴]. در مطالعه ذکر شده، اطلاعات کافی از دستگاه منبع میدان مغناطیسی - که یک سلنئید بود - ارائه نشده بود. همچنین چگونگی کنترل دما با توجه به شدت میدان به کاررفته، ذکر نشده بود. علاوه بر این مواجهه گروه تیمار با میدان مغناطیسی در خارج از انکوباتور انجام شده بود که متغیرهای محیطی دیگری را نیز دخالت می‌دهد. در مطالعه دیگری بالانژاد و همکاران (۲۰۰۹)، اثر کاربرد همزمان میدان مغناطیسی و راپامایسین را روی رگ‌زایی در مدل CAM آزمایش کرده و آنها نیز افزایش اثر مهاری راپامایسین بر رگ‌زایی را با کاربرد میدان مغناطیسی گزارش کردند. در مطالعه یاد شده نیز ویژگی‌های دستگاه تولید میدان مغناطیسی نامشخص بود و از آنجا که کل دستگاه انکوباتور جوجه کشی در داخل محدوده میدان قرار داشت، در مورد برهم‌کنش میدان مغناطیسی با فلز به کاررفته در بدنه دستگاه جوجه‌کشی و میدان مغناطیسی برآیند در داخل آن توضیحی ارائه نشده بود [۳۵].

مطالعه پیش رو با توجه به اینکه تاکنون اثر کاربرد همزمان میدان مغناطیسی بسیار کم‌فرکانس به همراه

داروی پر کاربرد اواستین بررسی نشده است، طراحی و انجام شد. میدان مغناطیسی درون انکوباتور قرار گرفت و اعمال تیمار داخل انکوباتور انجام شد گ. بنابراین شرایط دما و رطوبت در زمان آزمایش برای گروه‌های کنترل و تیمار مشابه بود. در این پژوهش اثر هر کدام از عوامل فیزیکی (میدان مغناطیسی پالسی) و دارویی (اواستین با غلظت‌های مختلف) و زمان‌های مواجهه مختلف با میدان مغناطیسی و همچنین آثار تداخلی عوامل بیان شده بر میزان تکثیر HUVEC بررسی شد. مطالعه حاضر همچنین می‌تواند در تکمیل بخشی از پروفایل آثار میدان مغناطیسی بر رگ‌زایی کمک‌کننده باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ کشت سلول

سلول HUVEC از بانک سلولی انستیتو پاستور و در پاساژ ۱۲ به صورت ویال فریز شده خریداری شد و در آزمایشگاه سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ايرانشهر سلول‌ها ذوب و در محیط DMEM/Hams F12 (Gibco; آمریکا)، محتوی ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco; آمریکا)، با پنی‌سیلین به غلظت ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر و استرپتومایسین به غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، محتوی VEGF (پژوهشگاه رویان، ایران) به غلظت ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر و FGF^{۳۵} (پژوهشگاه رویان، ایران) به غلظت ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، زیر هود بیولوژیک استریل در فلاسک کشت سلول T-25 کشت داده شد و به انکوباتور CO2 مارک VS-2180C7 (Vision Scientific; کره جنوبی) در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتیگراد و با غلظت دی‌اکسید کربن ۵ درصد منتقل شد. هر ۴۸ ساعت محیط کشت تعویض شد. بعد از رسیدن به تراکم سلولی ۸۰ درصد، سلول‌ها با استفاده

از تریپسین^{۳۶} (BioIdea; ایران) پاساژ داده شد و برای فراهم کردن تعداد سلول بیشتر بازکشت شد. بنابراین در همه تست‌ها از پاساژ ۱۳ و ۱۴ سلول‌های HUVEC استفاده شد. از لام نئوبوئر هموسایتومتری^{۳۷} برای شمارش سلول‌ها استفاده شد [۳۷؛ ۳۸].

۲-۲ دستگاه تولید میدان مغناطیسی و شیوه تیمار سلول‌ها

برای ایجاد میدان مغناطیسی یکنواخت مورد نیاز از جفت پیچه هلمهولتز که آرایه‌ای است مرکب از دو پیچه کاملاً یکسان (در حالت ایدئال) از نظر شعاع و تعداد دور سیم به صورت هم‌محور و موازی (به گونه‌ای که فاصله بین آنها برابر شعاع پیچه‌ها است) استفاده شد. ژنراتور میدان و پیچه‌ها به وسیله شرکت فناوری گستر هنگام (HENGAMCO; ایران) ساخته شد که قادر به تولید میدان‌های مغناطیسی متناوب با فرکانس از پانزده هرتز تا یک کیلوهرتز و شدت‌های از ۱۰ میکروتسلا تا ۱۲/۵ میلی‌تسلا و همچنین ایجاد چهار شکل موج سینوسی، پالس مربعی، مثلثی و دندان اره‌ای است. تغییرات شدت و فرکانس میدان از راه تغییرات در مقدار و فرکانس جریان ورودی به پیچه‌ها به وسیله تنظیم ژنراتور میدان ایجاد می‌شد. جفت پیچه هلمهولتز به فاصله میانگین ۵ سانتیمتر از یکدیگر واقع شد. شعاع متوسط هر پیچه نیز ۵ سانتیمتر است. پیچه‌ها درون انکوباتور قرار گرفت و جریان از ژنراتور میدان از راه کابل ویژه به پیچه‌ها منتقل شد. تست فرکانس و شکل موج با استفاده از اسیلوسکوپ دیجیتال GPS-1202B (GPS LTD; انگلستان) و تست چگالی شار مغناطیسی توسط گوس متر Tenmars مدل TM-192 (TENMARS; ELECTRONICS تایوان) با قابلیت سنجش میدان‌های مغناطیسی تا محدوده ۲۰۰ میکروتسلا به طور همزمان در

سه محور که فرکانس‌های از ۳۰ تا ۲۰۰۰ هرتز را پوشش می‌دهد و همچنین گوس متر PCE مدل PCE-EMF-823 (PCE Instruments; انگلستان) با قابلیت سنجش در یک محور (که محدوده فرکانسی ۳۰ تا ۳۰۰ هرتز را پوشش می‌دهد) انجام شد. با توجه به ایجاد گرما به وسیله دستگاه به علت امپدانس پیچه‌ها برای کاهش دمای محفظه بین پیچه‌های هلمهولتز، یک فن رایانه در فاصله ۱۰ سانتیمتری از محفظه قرار داده شد. برای بررسی دمای محفظه، علاوه بر دماسنج تعبیه شده در محفظه به وسیله شرکت سازنده، یک دماسنج دیجیتال با پروب حساس مارک HTC-2A (BESTONE; چین) و با دقت ۰/۱ درجه سانتیگراد استفاده شد. در این مطالعه میدان مغناطیسی با چگالی شار ۲ میلی‌تسلا و فرکانس ۲۰۰ هرتز و در شکل موج پالسی مربعی با پهنای ۲/۵ میلی‌ثانیه استفاده شد.

۲-۳ داروی اوستین (بواسیزومب) و شیوه اعمال غلظت‌های اوستین

ویال ۴ میلی‌لیتری اوستین (Roche; آلمان) با غلظت ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از شرکت داروپخش خریداری شد. برای استفاده در آزمایش‌ها نخست محلول‌های اوستین در محیط کشت محتوی FBS ۲ درصد با محلول VEGF در محیط کشت با سرم ۲ درصد به نحوی که در آخر کار محلول‌هایی با غلظت نهایی VEGF به میزان ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و غلظت‌های اوستین به میزان صفر (کنترل دارو)، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حاصل می‌شد، مخلوط و مدت ۲ ساعت در انکوباتور انکوبه شد. سپس پلیت‌های حاوی سلول‌های کشت شده به زیر هود بیولوژیک برده شد و پس از خروج محیط کشت قبلی و افزودن محیط حاوی دارو به میزان ۲۰۰ میکرولیتر دوباره به انکوباتور منتقل شد.

36 Trypsin
37 Neubauer hemocytometer counting chamber

۴-۲ شیوه مواجهه میدان مغناطیسی

بعد از برداشت سلول‌ها از فلاسک‌ها و شمارش با لام هموسایتمتری، تعداد ۳ هزار سلول به هر چاهک، به ۱۵ چاهک (سه تکرار برای هر غلظت) در پلیت‌های ۹۶ چاهک منتقل شد. برای هر محدوده زمانی مواجهه دو پلیت که یکی در معرض میدان قرار می‌گرفت و دیگری دور از میدان (کنترل)، در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۱۲ ساعت برای جایگیری و تثبیت سلول‌ها، محیط کشت کم سرم (FBS1%) جایگزین محیط غنی قبلی شد و سلول‌ها به مدت ۱۲ ساعت در این محیط باقی گذاشته شدند تا در شرایط فقر سرمی قرار گرفته و از نظر سیکل سلولی هم‌فاز شوند. سپس مخلوط غلظت‌های اوستین و VEGF انکوبه‌شده، جایگزین محیط قبلی شد. درواقع سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در معرض غلظت‌های اوستین قرار گرفته و میدان مغناطیسی هم در پنج محدوده زمانی ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت روی سلول‌ها اعمال شد. نحوه تیماردهی میدان مغناطیسی برای زمان‌های مختلف اینگونه بود که پلیت انتخاب‌شده به‌طور تصادفی جهت تیمار میدان به مدت ۳ ساعت، از ساعت ۴۵ام بعد از ارائه غلظت‌ها، میدان ۶ ساعته از ساعت ۴۲ام و میدان ۱۲ ساعته از ساعت ۳۶ام و به‌همین ترتیب میدان ۴۸ ساعته بلافاصله بعد از ارائه غلظت‌ها در محفظه دستگاه قرار گرفتند. بعد از تیمار میدان، دستگاه خاموش شد و پلیت‌ها بعد از ۲۴ ساعت مورد ارزیابی رنگ‌سنجی آلامار بلو قرار گرفتند. آزمایش ۲ بار و با یک فاصله زمانی تقریباً ۷ ماهه انجام شد.

۵-۲ ارزیابی تکثیر سلولی با آلاماربلو

برای بررسی تکثیر HUVECs از تست رنگ‌سنجی آلاماربلو^{۳۸} استفاده شد. پودر آلاماربلو R7017-1G، محصول سیگما (MilliporeSigma; آمریکا) تهیه شد. استفاده از

آلاماربلو در عوض MTT^{۳۹}، کریستال ویوله^{۴۰} و یا تریپان‌بلو^{۴۱} به دلیل مزایایی مانند آسانی کاربرد، ارزان و غیرسمی بودن، قابلیت تعیین اختلاف تا کمتر از ۱۰۰ سلول بین دو چاهک (حساسیت بیشتر در تعیین اختلاف بین نمونه‌ها) و ایجاد مداخله نکردن تهاجمی در فرایندهای عادی سلولی، ترجیح داده شد [۳۹؛ ۴۰]. غلظت ۴۴۰ میکرومولار آلاماربلو استفاده شد. برای انجام تست، پلیت‌های تیمار و کنترل به زیر هود برده و محیط کشت برداشته و با ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد آلاماربلو در محیط کشت بدون سرم، رسانده شده به دمای ۳۷ درجه، جایگزین شد و پس از ۶ ساعت جذب چاهک‌های دو پلیت به‌وسیله دستگاه میکروپلیت‌ریدر^{۴۲} BioTek ELX۸۰۰ (BioTek) BIO-TEK INSTRUMENTS; آمریکا) در دو طول موج ۵۷۰ نانومتر و ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و در رابطه:

39 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenylTetrazolium bromide
40 Crystal violet
41 Trypan Blue
42 Microplate Reader

38 Alamar Blue

$$(۱) \quad \text{درصد اختلاف نسبت به کنترل} = \left(\frac{O_2 \times A_1 - O_1 \times A_2}{O_2 \times N_1 - O_1 \times N_2} \right) \times 100$$

، با استفاده از روش رنگ‌سنجی آلاماربلو HUVEC تکثیر آزمایش شد. اندازه‌گیری انجام‌شده در هر گروه پس از (برای ارزیابی همگنی Leven نرمال‌سازی و انجام تست خطاهای واریانس گروه‌ها) به‌وسیله آنالیز واریانس سه عاملی در سطح معناداری مقایسه شدند و اثر هرکدام از عوامل یادشده در تغییرات کلی تکثیر سلول‌ها تعیین شد. نتیجه آزمون لون^{۴۳} در

که 01 ضریب خاموشی آلاماربلو در حالت اکسید در طول موج ۵۷۰ نانومتر، که برابر ۸۰۵۸۶ لیتر بر مول سانتیمتر، 02 ضریب خاموشی آلاماربلو در حالت اکسید برای طول موج ۶۰۰ نانومتر (با ضریب خاموشی آلاماربلو برای طول موج ۵۹۵ نانومتر تفاوت ناچیز و قابل چشم‌پوشی دارد) که برابر ۱۱۷۲۱۶ لیتر بر مول سانتیمتر، A1 جذب خوانده‌شده نمونه تیمار در طول موج ۵۷۰ نانومتر، A2 جذب خوانده‌شده نمونه تیمار در طول موج ۶۰۰ نانومتر (با ضریب خاموشی آلاماربلو برای طول موج ۵۹۵ نانومتر تفاوت ناچیز و قابل چشم‌پوشی دارد)، N1 جذب خوانده‌شده کنترل در طول موج ۵۷۰ نانومتر و N2 جذب خوانده‌شده کنترل در طول موج ۶۰۰ نانومتر است [۴۱]، به منظور تعیین میزان اختلاف جذب تیمار نسبت به کنترل، قرار داده شد و داده‌های حاصل نسبت به میانگین کنترل نرمال گردید.

۶-۲ بررسی و تست‌های آماری

داده‌های درصد اختلاف نسبت به کنترل، نرمال‌شده و به‌صورت ($\pm SD$ میانگین) بیان شدند و برای تعیین معناداربودن اختلاف میانگین گروه‌ها با یکدیگر از آنالیز واریانس سه عاملی با استفاده از بسته نرم‌افزاری SPSS ورژن ۲۳ استفاده شد و مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شدند.

۳- نتایج

در این مطالعه، اثر سه عامل شامل مواجهه یا عدم مواجهه با میدان مغناطیسی، غلظت‌های مختلف اوستین (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و مدت زمان مواجهه (۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) روی میزان

جدول آمده است. با توجه به اینکه مقدار معناداری مقدار محاسبه شده شاخص لون (۰/۳۲۳) از ۰/۰۵ بزرگتر است، ($F(49/250)=1/094$, $p=0/323$)، فرض همسانی خطای واریانس‌ها رد نشده و بر این اساس، استفاده از

جدول ۲ نتیجه آزمون Leven برای بررسی همسانی خطاهای واریانس به عنوان پیش فرض لازم برای انجام آنالیز واریانس چندعاملی ($F(49,250)=1/094$), $p= 0/323$)

F	df1	df2	Sig.
۱/۰۹۴	۴۹	۲۵۰	۰/۳۲۳

Dependent Variable: Proliferation(% of Control)

تحلیل واریانس سه طرفه برای مقایسه آثار تیمار مواجهه با میدان مغناطیسی، غلظت‌های مختلف اوستین و مدت زمان مواجهه و همچنین آثار تداخلی و هم‌افزایی آنها روی تکثیر انجام شد (HUVCE سلول‌های

میزان $Pvalue= ۰/۳۲۳$ برای $df1$ (درجه آزادی خطاهای واریانس بین گروه‌ها) و $df2$ (درجه آزادی کل خطاهای واریانس درون گروه‌ها) دلالت بر نبود دلیل کافی برای رد فرض صفر دارد. از این رو خطاهای واریانس پذیرفته شده و انجام آنالیز واریانس موجه است.

درصد از واریانس مشاهده شده در میزان تکثیر نمونه‌های سلولی از نظر آماری می‌تواند ناشی از اوستین باشد. ($F(4,250)=2359/205$, $P<0/001$) شاخص η^2 برای اثر زمان مواجهه با میدان مغناطیسی هم ۰/۸۱۳ به دست آمد که حکایت از آن دارد که زمان مواجهه می‌تواند از نظر آماری مسئول ۸۱/۳ درصد از واریانس مشهود در تکثیر گروه‌های سلولی محسوب شود ($F(4,250)=271/201$, $P<0/001$).

جدول ۲). آثار هر سه عامل از لحاظ آماری قابل توجه بود ($p<۰/۰۰۱$). میزان اثر اصلی میدان مغناطیسی (η^2)، $\eta^2 = ۰/۹۲$ به دست آمد که نشان می‌دهد ۹۲ درصد از تغییرات در واریانس مشاهده شده، در تکثیر نمونه‌های سلولی می‌تواند به اثر میدان مغناطیسی نسبت داده شود. ($F(1,250)=2884/526$, $P<0/001$) میزان η^2 اثر غلظت‌های اوستین $\eta^2 = ۰/۹۷$ به دست آمد که دلالت می‌کند ۹۷/۴

جدول ۲ خلاصه آنالیز واریانس سه عاملی برای تعیین اثر اصلی میدان مغناطیسی (EMF)، غلظت‌های اوستین (Avs) و زمان مواجهه (T) و آثار تداخلی آنها روی تکثیر HUVCE

Dependent Variable: Proliferation(% of Control)								
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared(η^2)	Noncent. Parameter	Observed Power ^b
Corrected Model	144096/012 ^a	49	2940/735	304/849	/000	0/984	14937/582	1/000
Intercept	2161542/590	1	2161542/590	224074/353	/000	0/999	224074/353	1/000
EMF	27825/704	1	27825/704	2884/526	/000	0/920	2884/526	1/000
Treatment(EMF)								
Avastin	91032/672	4	22758/168	2359/205	/000	0/974	9436/819	1/000
Concentrations(Avs)	10464/601	4	2616/150	271/201	/000	0/813	1084/803	1/000
Exposure Time(T)	1712/915	4	428/229	44/392	/000	0/415	177/568	1/000
EMF×Avs								
EMF×T	11777/080	4	2944/270	305/215	/000	0/830	1220/860	1/000
Avs×T	569/401	16	35/588	3/689	/000	0/191	59/026	1/000
EMF×Avs×T	713/641	16	44/603	4/624	/000	0/228	73/979	1/000

Error	2411/635	250	9/647
Total	2308050/238	300	
Corrected Total	146507/648	299	

a. R Squared = 0/984 (Adjusted R Squared = 0/980), b. Computed using alpha = 0/05

آنالیز واریانس سه‌عاملی روی داده‌های تفاوت جذب نسبت به کنترل در هر زمان تیمار میدان مغناطیسی و مقایسه گروه‌ها، تعیین pValue، تعیین میزان اثر اصلی هریک از

متغیرهای تیمار میدان مغناطیسی، غلظت‌های اوستین و مدت زمان مواجهه (η^2 برای هر عامل) و همچنین بررسی اثر تداخلی دوعاملی و سه‌عاملی. اثر

میدان ($F(1,250)=2884/526, p<0/001$) و اوستین ($F(4,250)=2359/205, p<0/001$) و زمان مواجهه ($F(4,250)=271/201, p<0/001$) معنی‌دار و میزان اثر

هرکدام به ترتیب: 0/920، 0/970 و 0/813 است

مقایسه‌های جداگانه زمان‌های مواجهه با یکدیگر با

تست Tukey HSD نشان داد که میانگین تکثیر سلول‌ها

در زمان‌های مواجهه ۳ ساعت ($M=83.133, SD=3.022, p < 0/05$)، ۲۴ ساعت

در زمان‌های مواجهه ۳ ساعت ($M=97.27, SD=0/189$) و

۴۸ ساعت ($M=80.925, SD=2.646, p < 0/05$) و

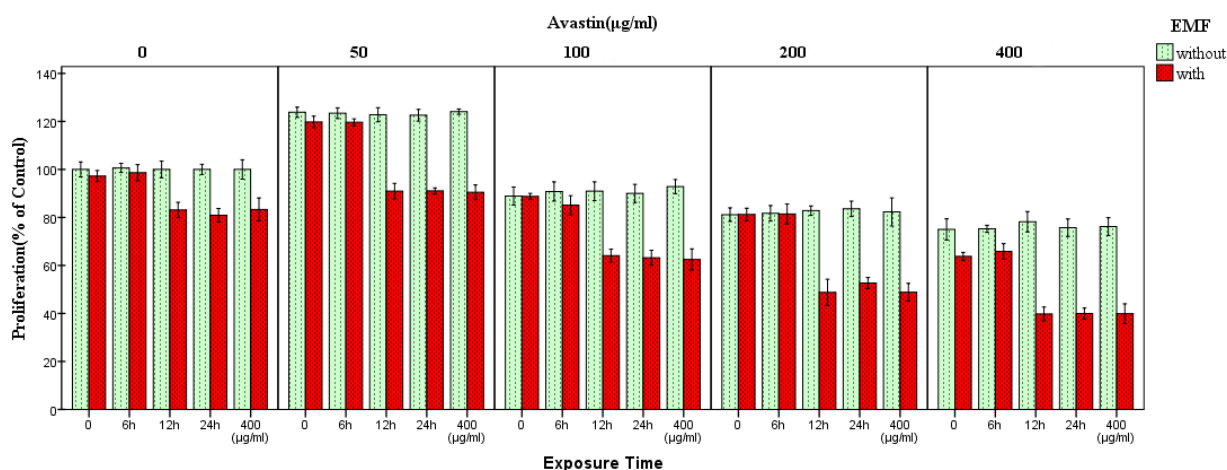
۶ ساعت ($M=98/635, SD=3/324, p=0/988$) تفاوت

ضمن تفاوت تکثیر بین زمان‌های مواجهه ۱۲، ۲۴ و ۴۸

چندانی ندارند، درحالی‌که تفاوت تکثیر زمان‌های مواجهه

ساعت قابل توجه نبود ($p=1.00$) (شکل ۱ (جدول ۳)).

۳ و ۶ ساعت با زمان‌های مواجهه ۱۲ ساعت



شکل ۱ نمودار ستونی تفاوت تکثیر HUVEC در غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در زمان‌های مواجهه ۳، ۶، ۱۲، ۲۴

و ۴۸ ساعت با میدان مغناطیسی ۲ میلی‌تسلا، فرکانس ۲۰۰ هرتز و شکل موج پالس مربعی. محور عمودی درصد تکثیر نسبت به کنترل و محور افقی

نشان‌دهنده مدت زمان‌های مواجهه با میدان است. برای هر محدوده غلظت، نمودار تکثیر بر زمان مواجهه برای گروه‌های کنترل (رنگ سبز) و تیمار

(رنگ قرمز) جداگانه رسم شده است. داده‌های جذب در هر زمان تیمار نسبت به جذب غلظت صفر غیرمواجهه با میدان نرمال شده و به صورت

$\pm SD$ میانگین برای ۹۵ درصد نشان داده شده‌اند. مقدار p با استفاده از آنالیز واریانس سه‌طرفه و در سطح اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شده است. با

توجه به نمودار ($p<0/05$)

جدول ۳ خلاصه مقایسه‌های جفتی تکثیر UHVEC بین زمان‌های مختلف مواجهه با تست Tukey HSD

proliferation (% of control)						
Tukey HSD						
(I) Exposure Time	(J) Exposure Time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
3h	6h	-0/277	0/567	0/988	-1/835	1/280

	12h	11/819*	0/567	0/000	10/261	13/377
	24h	12/001*	0/567	0/000	10/442	13/558
	48h	11/925*	0/567	0/000	10/366	13/483
6h	3h	0/277	0/567	0/988	-1/280	1/835
	12h	12/097*	0/567	0/000	10/539	13/655
	24h	12/278*	0/567	0/000	10/720	13/836
	48h	12/202*	0/567	0/000	10/644	13/760
12h	3h	-11/819*	0/567	0/000	-13/377	-10/261
	6h	-12/097*	0/567	0/000	-13/655	-10/539
	24h	0/181	0/567	0/988	-1/377	1/739
	48h	0/105	0/567	1/000	-1/452	1/663
24h	3h	-12/001*	0/567	0/000	-13/558	-10/442
	6h	-12/278*	0/567	0/000	-13/836	-10/720
	12h	-0/181	0/567	0/988	-1/739	1/377
	48h	-0/076	0/567	1/000	-1/633	1/482
48h	3h	-11/925*	0/567	0/000	-13/483	-10/366
	6h	-12/202*	0/567	0/000	-13/760	-10/644
	12h	-0/105	0/567	1/000	-1/663	1/452
	24h	0/076	0/567	1/000	-1/482	1/633

Based on observed means. The error term is Mean Square(Error) = 9/647

*, The mean difference is significant at the 0/05 level.

مقایسه دو به دو میزان تکثیر HUVEC در زمان‌های مختلف مواجهه با میدان مغناطیسی دلیل بر فقدان تفاوت آماری قابل توجه بین گروه‌های تحت مواجهه در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت با یکدیگر ($P=0/988$) و همچنین بین گروه‌های در معرض میدان در زمان‌های مواجهه ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت با یکدیگر است ($P=1/000$). با این حال تفاوت تکثیر بین زمان‌های مواجهه ۳ و ۶ ساعت با زمان‌های مواجهه ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت قابل توجه بود ($P<0/001$).

توضیح می‌دهد ۸۳ درصد از واریانس تکثیر سلولی می‌تواند بر اثر تداخل اثر دو عامل میدان و زمان مواجهه باشد ($F(4,250)=305.215, P<0/001$).

برای اثر تداخلی غلظت‌های اوستین و مدت زمان مواجهه نیز شاخص مجذور اتا (η^2) برابر 0/191 است که نشان می‌دهد ۱۹/۱ درصد از تغییرات در واریانس تکثیر می‌تواند به لحاظ آماری به تداخل اثر مدت زمان مواجهه و غلظت‌های اوستین منسوب شود ($F(16,250)=3.689, P<0/001$).

اثرات تداخلی متغیرهای بیان‌شده دویه‌دو و چه سه متغیر با هم، همگی معنادار بوده و دلالت بر تداخل اثر مثبت در مهار تکثیر سلول‌های HUVEC دارد. برای اثر تداخل اثر میدان مغناطیسی و غلظت‌های اوستین بزرگی شاخص مجذور اتا (η^2) معادل ۰/۴۱۵ به دست آمد که نشان می‌دهد این اثر تداخلی از لحاظ آماری می‌تواند ۴۱/۵ درصد از واریانس تکثیر گروه‌های سلولی را توضیح دهد ($F(4,250)=44.392, P<0/001$).

برای تداخل آثار میدان و مدت زمان مواجهه اندازه شاخص مجذور اتا (η^2) برابر ۰/۸۳۰ به دست آمده که

همچنین برای تداخل اثر هر سه عامل شاخص می‌جذور
اتا (η^2) برابر ۰/۲۲۸ است که نشان می‌دهد تداخل
سه‌گانه می‌تواند ۲۲/۸ درصد از تغییرات ایجادشده در
واریانس بین گروه‌های سلولی را توضیح دهد
($F(16,250)=4.624, P<0/001$).

۴- بحث و نتیجه گیری

از راه به کارگیری همزمان عوامل فیزیکی مثل میدان مغناطیسی و داروها می توان با دوزهای پایین تر داروها، به درمان دست پیدا کرد و مشکلات ناشی از عوارض جانبی را نیز کاهش داد. در پژوهش پیش رو اثر غلظت های مختلف ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اوستین در یک گروه به طور جداگانه و در گروه دیگر همراه با میدان مغناطیسی در زمان های مواجهه ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت روی تکثیر HUVEC آزمایش شد. از آنجا که اوستین روی این سلول اثر سمیت مستقیم چندانی ندارد [۴۲]، به منظور بررسی اثر غلظت های مختلف اوستین روی تکثیر نخست غلظت های اوستین با VEGF به غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه و مخلوط حاصل روی سلول ها اثر داده شد. وانگ^{۴۴} و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی اثر اوستین بر تکثیر HUVEC، غلظت مؤثر اوستین برای مهار اثر VEGF را ۵۰۰ نانوگرم در میلی لیتر گزارش کردند که بسیار کمتر از غلظت های مؤثر استفاده شده در پژوهش حاضر (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) است و این مسئله می تواند به تفاوت های احتمالی در محیط کشت و درصد FBS آن، مقدار اوستین فعال موجود در ویال خریداری شده، شرایط ویال قبل از تحویل به آزمایشگاه و همچنین به روش ارزیابی تکثیر مربوط باشد، چرا که وانگ و گروه او، بررسی تغییرات تکثیر سلول ها را از راه ارزیابی نشر فلئورسانس آلاماربلو انجام دادند که روش حساس تری در مقایسه با روش رنگ سنتجی آلاماربلو استفاده شده در اینجا است [۴۳]. در مطالعه دیگری نوتارا^{۴۵} و همکارانش (۲۰۱۹) اثر اوستین روی فعالیت متابولیک و تکثیر سلول های اپیتلیوم ناحیه لیمب^{۴۶} قرنیه انسان را با استفاده از آلاماربلو آزمایش

کردند و گزارش دادند که غلظت های حتی تا ۱ میلی گرم در میلی لیتر اوستین روی فعالیت متابولیک و تکثیر HUVEC تأثیر بسیار چشمگیری نداشته است، اگرچه بیان ژن کراتین-۳ را در این سلول ها افزایش داده است [۴۴]. بنابراین، ارزیابی تکثیر سلول های مختلف در اثر تیمار اوستین باید به صورت غیرمستقیم و به صورت توانایی آن در مهار اثر افزایشی VEGF باشد. با توجه به نتایج مهار تکثیر به وسیله اوستین مشخص می شود که میزان اثر مهاري به غلظت اوستین وابسته است.

یافتن میدان های مغناطیسی که بتواند روی رگ زایی اثر مهاری داشته باشند، با توجه به کاربرد درمانی از اهمیت زیادی برخوردار است. یافته های پژوهش حاضر نشان می دهد که میدان مغناطیسی متناوب پالسی ۲ میلی تسلا با فرکانس ۲۰۰ هرتز در صورتی که مدت زمان مواجهه بیش از ۱۲ ساعت باشد، قادر است اثر مهاری معناداری روی تکثیر سلول های HUVEC بگذارد. به نظر می رسد میدان مغناطیسی پالسی به کاررفته اثر مهاری اوستین را به طور متوسط به میزان تقریبی ۲۵ درصد افزایش داده است. این افزایش بسته به این است که مدت زمان مواجهه با میدان مغناطیسی به کاررفته حداقل ۱۲ ساعت باشد. در زمان های مواجهه ۳ و ۶ ساعت (فقط در شرایطی که غلظت ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر اوستین استفاده شده است) اثر میدان در افزایش میزان مهار تکثیر اندوتلیال، از نظر آماری بسیار چشمگیر بوده است. علاوه بر این به نظر می رسد بعد از ۱۲ ساعت، افزایش زمان مواجهه به ۲۴ و ۴۸ ساعت تغییر چندانی در میزان تکثیر ایجاد نمی کند. اگرچه نظیر پژوهش حاضر با توجه به نوع و فرکانس میدان مغناطیسی و استفاده همزمان از آنتاگونیست اوستین، کمتر به چشم می خورد، اما می توان موارد به نسبت مشابه را برای مقایسه یافته ها و ارزیابی آنها به منظور دستیابی به یک قرارداد درمانی اولیه و نیز پیشنهاد یک سازوکار برهم کنش بین میدان مغناطیسی و رگ زایی پیدا کرد. دله موناچه و

44 Wang
45 Notara
46 Limbus

همکاران (۲۰۱۴) آثار مهاری میدان مغناطیسی ۲ میلی تسلا با فرکانس ۵۰ هرتز سینوسی روی تکثیر HUVEC را در زمان‌های مواجهه ۱، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ساعت گزارش کردند (بدون استفاده از آنتاگونیست) [۱۳]، درحالی که در پژوهش ما اثر مهاری میدان مغناطیسی پالسی در مدت زمان‌های مواجهه کمتر از ۱۲ ساعت بر تکثیر HUVEC قابل توجه نبود و فقط در حالتی که غلظت آنتاگونیست (اوستین) ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بود، این اثر معنادار بود. اختلاف مشاهده شده در یافته‌های دو پژوهش می‌تواند ناشی از تفاوت در شکل موج میدان (پالسی در مقابل سینوسی)، نحوه ارائه تیمار میدان و نیز شیوه ارزیابی تکثیر باشد، چرا که گروه یادشده از تست رنگ‌سنجی کریستال ویوله برای ارزیابی تکثیر HUVE استفاده کرده بود و در پژوهش ما از تست رنگ‌سنجی آلامار بلو استفاده شده است و در پژوهش‌های متعددی تأیید شده است که رنگ‌سنجی آلاماربلو در مقایسه با کریستال ویوله و حتی MTT به غیر از مواردی که احتمال واکنش بین آلاماربلو و عوامل شیمیایی موجود در محیط کشت وجود دارد، حساس‌تر و دقیق‌تر است [۴۵]. گروه دله‌مون‌اچه در مطالعه قبلی خود (۲۰۰۸) میدان مغناطیسی ۱ میلی تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز را استفاده کردند و اثر افزایشی آن را در تکثیر HUVEC و رگ‌زایی در برون‌تن گزارش داده بودند [۲۵]. این در حالی است که میدان ایستای ۱ میلی تسلا براساس گزارش به‌دست‌آمده از مطالعه لی و همکاران (۲۰۰۷)، تکثیر HUVEC را به‌طور معناداری کاهش داده بود [۴۶]. به نظر می‌رسد اضافه شدن تغییرات نوسانی سینوسی در میدان ۱ میلی تسلایی توانسته است پاسخ سلول‌ها را از اثر مهاری در حالت میدان ایستا به اثر تحریک و افزایش تکثیر در حالت میدان متناوب سینوسی تغییر دهد. این در حالی است که بالیاسنیکووا و همکاران (۱۹۹۴) در آزمایش بررسی اثر میدان مغناطیسی ایستای به‌نسبت قوی‌تر ۱۴۰ میلی تسلایی روی

تکثیر HUVEC، تفاوت معناداری گزارش نکرده‌اند. اگرچه آنها دیده‌اند که تحت تأثیر همان میدان، تکثیر سلول‌های اندوتلیال شریان ریوی گاو، زمانی که غلظت سرم FBS بیش از ۱۰ درصد است، اندکی افزایش پیدا کرده‌است [۱۶]. با درنظرداشتن مطالعه‌های دیگر که اثر میدان‌های مغناطیسی بر تکثیر سلول‌های اندوتلیال عروق را بررسی کرده‌اند [۲۰-۲۴؛ ۴۷؛ ۴۸]، اگر چه این تنوع در نتایج را می‌توان به تفاوت در نوع، شدت، فرکانس و سایر تنظیم‌های میدان‌های مغناطیسی به‌کاررفته و همچنین روش ارزیابی تکثیر، نوع نمونه زیستی استفاده شده و شرایط تیمار نسبت داد و این تنوع در آثار میدان مغناطیسی بر فرایندهای دیگر زیستی نیز گزارش شده‌است، اما برای توضیح آن می‌توان چنین فرض کرد که میدان مغناطیسی در محدوده‌های خاصی از شدت، فرکانس، شکل موج و مدت زمان تیمار با عنوان پنجره‌های بیولوژیک اثرگذار هستند و در سایر گستره‌ها آن اثر را نشان نمی‌دهند. با توجه به اینکه بسته به شدت، فرکانس و زمان مواجهه، آثار بیولوژیکی متفاوت، به‌صورت بی‌اثر بودن، اثر تحریکی و یا اثر مهاری گزارش شده‌اند، می‌توان برای هر فرایند و یا هر بخش از فرایندهای زیستی که شامل واکنش‌های بیوشیمیایی خاص است، پنجره‌ای با شدت، فرکانس، زمان مواجهه و شکل موج میدان خاص برای هر اثر تحریکی و یا مهاری در نظر گرفت. وجود تعداد فراوان گزارش‌ها مبنی بر اثرگذاری اینگونه میدان‌های مغناطیسی بسیار کم‌فرکانس آن هم در شدت‌های نه چندان بالا، بحث‌های زیادی در مورد سازوکار پیدایش آن آثار ایجاد کرده‌است [۴۹-۵۳]. از دیدگاه فیزیک و الکترومغناطیس کلاسیک، انرژی که میدان‌های مذکور روی سیستم اعمال می‌کنند، حتی در صورت جذب کامل و تبدیل به انرژی گرمایی، آن قدر کم است که نامحتمل است دمای بافت یا محیط کشت سلول‌ها را تغییر دهد، برای مثال میدان مغناطیسی پالسی با

چگالی شار ۲ میلی تسلا و فرکانس ۲۰۰ هرتز برای یک نمونه زیستی به شعاع ۵ میلی متر و با فرض اینکه ضریب هدایتی نمونه به طور میانگین معادل 0.67 زیمنس بر متر که حدود دوسوم ضریب هدایت بافت عضلانی است، باشد و چگالی آن را هم معادل چگالی آب در نظر بگیریم، در ۴۸ ساعت مواجهه مداوم با میدان مذکور، حداکثر مقدار انرژی جذب شده به ازای هر گرم نمونه زیستی معادل 5.4792×10^{-6} ژول است. از این رو افزایش دمای نمونه معادل 1.31×10^{-6} درجه سانتیگراد خواهد بود که به وضوح قابل چشم پوشی و بی اثر است [۵۴].

بنابراین آثار میدان های مغناطیسی مذکور روی سلول ها در صورت وجود، غیر گرمایی هستند، اگرچه در مورد میدان های با فرکانس های بالاتر (محدوده های مگاهرتز و گیگاهرتز) که آثار گرمایی داشته و میدان های الکتریکی القایی و نیز جریان های القایی به نسبت بزرگ تری ایجاد می کنند، مدل های نظری مبتنی بر الکترو دینامیک کلاسیک قانع کننده هستند. در برخی مطالعه ها برای توضیح آثار بیولوژیک میدان های مغناطیسی بر آثار احتمالی این میدان ها روی غشای پلاسمایی سلول و اثر آن روی کانال های یونی به ویژه کانال های وابسته به ولتاژ کلسیمی تأکید شده است و نبود آثار بیولوژیک میدان به هنگام استفاده همزمان از عوامل مسدود کننده کانال های کلسیمی را دلیلی بر این امر آورده اند [۵۵]. با توجه به مطالعه های دیگری که چنین آثاری را نشان نداده اند، درستی سازوکار اثرگذاری میدان های مغناطیسی بسیار کم فرکانس و حتی محدوده فرکانس های رادیویی روی غشای پلاسمایی و کانال های کلسیمی تردید شده است [۵۶]. علاوه بر این، میدان های الکتریکی حاصل از چنین میدان های کم فرکانسی از مرتبه میلی ولت بر متر هستند که در مقایسه با میدان الکتریکی دو طرف غشای سلول (که از مرتبه چند صد کیلوولت بر متر و بالاتر است) بسیار کوچک تر بوده و بعید به نظر می رسد بتوانند روی پتانسیل غشا و

کانال های یونی تأثیرگذار باشند. نکته دیگر این است که میدان های مغناطیسی برخلاف میدان های الکتریکی قادر به اعمال آثار از ورای غشای پلاسمایی (که عایق است) روی ارگانل های سیتوپلاسمی هستند، اما از نظر الکترو دینامیک کلاسیک، قدرت میدان های به کاررفته باید به اندازه کافی بزرگ باشد تا بتوانند ذرات باردار موجود در سیستم های حیاتی را که تحت قیود متعددی مثل آب پوشی شدن و حرکت های تصادفی ناشی از گرمای محیط هستند، در جهتی مشخص و برای یک برهم کنش خاص به حرکت در آورند [۵۴؛ ۵۷]. با توجه به موارد ذکر شده، در حال حاضر سازوکارهایی که مبتنی بر مکانیک کوانتومی هستند، مانند سازوکار جفت رادیکال، آثار میدان های مغناطیسی روی اسپین الکترون ها و سایر ذرات بنیادی برای توضیح آثار میدان های مغناطیسی بسیار کم فرکانس مطرح هستند [۵۸؛ ۵۹]. در این مطالعه، اثر کاربرد همزمان میدان مغناطیسی با زمان های مختلف تیمار و غلظت های مختلف آنتاگونیست بر یک ویژگی سلول های HUVEC، یعنی قابلیت تکثیر بررسی شده است و سازوکارهای مولکولی که در ایجاد این آثار مؤثر هستند، در اینجا مد نظر نبوده اند، اما هرچه معلومات بیشتری در مورد آثار میدان های با شدت و فرکانس مختلف روی یک پدیده زیستی داشته باشیم، در استنباط یک سازوکار احتمالی و در نتیجه یافتن شدت و فرکانس های مؤثر دیگر بر فرایند و به عبارت دیگر پنجره های بیولوژیک بعدی، کمک کننده خواهد بود.

پژوهش حاضر نواقص مهمی دارد: اول اینکه اثر میدان مغناطیسی و اوستین روی فقط یک نوع سلول اندوتلیال عروق (HUVEC) آزمایش شده است در حالی که انواع زیادی سلول های اندوتلیال مربوط به عروق خونی و لنفی دیگر وجود دارند که بررسی آثار میدان و آنتاگونیست ها روی تکثیر و نیز سایر شاخص های رگ زایی آنها اهمیت دارد. دوم اینکه اعمال میدان مغناطیسی برای مدت

۶- منابع

- [1]. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
- [2]. Folkman, J., *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis*. Semin Oncol, 2002. **29**(6 Suppl 16): p. 15-8.
- [3]. Folkman, J. and Y. Shing, *Angiogenesis*. J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 10931-4.
- [4]. Zucchelli, E., Q.A. Majid, and G. Foldes, *New artery of knowledge: 3D models of angiogenesis*. Vascular Biology, 2019. **1**(1): p. H135-H143.
- [5]. Cines, D.B., et al., *Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3527-3561.
- [6]. Yoo, S.Y. and S.M. Kwon, *Angiogenesis and Its Therapeutic Opportunities*. Mediators of Inflammation, 2013. **2013**: p. 127170.
- [7]. Al-Husein, B., et al., *Antiangiogenic therapy for cancer: an update*. Pharmacotherapy, 2012. **32**(12): p. 1095-1111.
- [8]. Zhang, W., et al., *The Benefits and Side Effects of Bevacizumab for the Treatment of Recurrent Ovarian Cancer*. Current drug targets, 2016. **18**.
- [9]. Rovithi, M. and H.M.W. Verheul, *Pulsatile high-dose treatment with antiangiogenic tyrosine kinase inhibitors improves clinical antitumor activity*. Angiogenesis, 2017. **20**(3): p. 287-289.
- [10]. Sengupta, S. and V.K. Balla, *A review on the use of magnetic fields and ultrasound for non-invasive cancer treatment*. Journal of Advanced Research, 2018. **14**: p. 97-111.
- [11]. de Seze, R., et al., *Effects of 100 mT time varying magnetic fields on the growth of tumors in mice*. Bioelectromagnetics, 2000. **21**(2): p. 107-111.
- [12]. Markov, M.S., *Pulsed electromagnetic field therapy history, state of the art and future*. The Environmentalist, 2007. **27**(4): p. 465-475.
- [13]. Delle Monache, S., et al., *Inhibition of angiogenesis mediated by extremely low-frequency*

زمان‌های مختلف، اگرچه برای گروه‌های آزمایش و کنترل از نظر زمان شروع مواجهه یکسان بوده، اما به علت متفاوت بودن زمان ختم تیمار میدان (اختلاف در چرخه سلولی در زمان پایان مواجهه و ارزیابی آلاماربلو) و در نتیجه تفاوت در وضعیت متابولیسمی سلول‌های هر گروه زمانی در مقایسه با زمان‌های دیگر، ممکن است ارزیابی‌ها با خطاهایی همراه باشد [۶۰]. بررسی آثار مهار رگ‌زایی میدان مغناطیسی استفاده‌شده در این مطالعه روی مدل‌های سه‌بعدی برون‌تن مثل تشکیل سازه‌های لوله مانند در ماتریزل، مدل‌های درون‌تن مثل CAM و مدل‌های حیوانی برای یافته‌های تکمیلی پیشنهاد می‌شود.

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میدان الکترومغناطیسی ۲ میلی‌تسلا با فرکانس ۲۰۰ هرتز با شکل موج پالس مربعی، اثر مهار اوستین روی تکثیر سلول‌های اندوتلیال HUVEC را به‌طور معناداری افزایش می‌دهد و به‌این‌ترتیب امید به نیل به یکی از اهداف کاربرد چنین میدان‌هایی تقویت می‌شود. با وجود آنکه سازوکار اثرگذاری میدان‌های مغناطیسی بسیار کم‌فرکانس با پدیده‌های زیستی مثل تکثیر سلولی که در مورد سلول‌های اندوتلیال (که یک جزء اساسی از فرایند رگ‌زایی است) هنوز مورد بحث و مناقشه است، اما داده‌های زیادی دلیل بر امکان کنترل این فرایند از راه میدان‌های مذکور وجود دارند که پرداختن به مطالعه‌های جانوری و پس از آن به مطالعه‌های بالینی را توجیه می‌کنند.

۵- قدردانی و تشکر

با توجه به اینکه بخش بزرگی از این پژوهش در آزمایشگاه کشت سلول دانشگاه علوم پزشکی ایرانشهر انجام شده‌است، نویسندگان مراتب قدردانی و سپاس خویش را از ریاست محترم و معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ایرانشهر به جهت همکاری و مساعدت در تجهیز آزمایشگاه مذکور اعلام می‌دارند.

- microvascular endothelial cells. Bioelectromagnetics, 2015. **36**(1): p. 1-9.
- [24]. Hopper, R.A., et al., *Osteoblasts stimulated with pulsed electromagnetic fields increase HUVEC proliferation via a VEGF-A independent mechanism*. Bioelectromagnetics, 2009. **30**(3): p. 189-197.
- [25]. Delle Monache, S., et al., *Extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMFs) induce in vitro angiogenesis process in human endothelial cells*. Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association, 2008. **29**(8): p. 640-648.
- [26]. Naarala, J., et al., *Direction-dependent effects of combined static and ELF magnetic fields on cell proliferation and superoxide radical production*. BioMed research international, 2017. **2017**.
- [27]. Wachsberger, P., R. Burd, and A.P. Dicker, *Tumor response to ionizing radiation combined with antiangiogenesis or vascular targeting agents: exploring mechanisms of interaction*. Clinical cancer research, 2003. **9**(6): p. 1957-1971.
- [28]. Dings, R.P.M., et al., *Scheduling of radiation with angiogenesis inhibitors anginex and Avastin improves therapeutic outcome via vessel normalization*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2007. **13**(11): p. 3395-3402.
- [29]. Nieder, C., et al., *Radiation therapy plus angiogenesis inhibition with bevacizumab: rationale and initial experience*. Reviews on recent clinical trials, 2007. **2**(3): p. 163-168.
- [30]. Peng, F., et al., *Recombinant human endostatin normalizes tumor vasculature and enhances radiation response in xenografted human nasopharyngeal carcinoma models*. PloS one, 2012. **7**(4): p. e34646.
- [31]. Hsu, H.-W., et al., *Combination antiangiogenic therapy and radiation in head and neck cancers*. Oral Oncology, 2014. **50**(1): p. 19-26.
- [32]. Zhuang, H., et al., *A study on the evaluation method and recent clinical efficacy of bevacizumab on the treatment of radiation cerebral necrosis*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 24364-24364.
- magnetic fields (ELF-MFs). PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79309.
- [14]. Mostafaie, A., H.R.M. Motlagh, and K. Mansouri, *Angiogenesis and the Models to Study Angiogenesis*. Yakhteh Medical Journal, 2010. **11**(4).
- [15]. Folkman, J., *Angiogenesis research: from laboratory to clinic*. Forum (Genova), 1999. **9**(3 Suppl 3): p. 59-62.
- [16]. Balyasnikova, I., K. Krotov, and S. Danilov, *Effect of a static magnetic field on the growth rate and in vitro angiogenesis of endothelial cells*. Bulletin of experimental biology and medicine, 1994. **117**(1): p. 110-113.
- [17]. Potenza, L., et al., *Effects of a 300 mT static magnetic field on human umbilical vein endothelial cells*. Bioelectromagnetics, 2010. **31**(8): p. 630-639.
- [18]. Fei, L., et al., *Effects of static magnetic field on human umbilical vessel endothelial cell*. Journal of Medical Colleges of PLA, 2007. **22**(2): p. 106-110.
- [19]. Wang, Z., et al., *Inhibitory effects of a gradient static magnetic field on normal angiogenesis*. Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association, 2009. **30**(6): p. 446-453.
- [20]. Martino, C.F., et al., *Effects of weak static magnetic fields on endothelial cells*. Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association, 2010. **31**(4): p. 296-301.
- [21]. Martino, C.F., *Static magnetic field sensitivity of endothelial cells*. Bioelectromagnetics, 2011. **32**(6): p. 506-508.
- [22]. Yen-Patton, G.A., et al., *Endothelial cell response to pulsed electromagnetic fields: stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro*. Journal of cellular physiology, 1988. **134**(1): p. 37-46.
- [23]. Li, F., et al., *Pulsed magnetic field accelerate proliferation and migration of cardiac*

- use in age-related macular degeneration. *Acta ophthalmologica*, 2009. **87**(5): p. 517-523.
- [43]. Wang, Y., et al., *Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro*. *Angiogenesis*, 2004. **7**(4): p. 335-345.
- [44]. Notara, M., et al., *Bevacizumab Induces Upregulation of Keratin 3 and VEGFA in Human Limbal Epithelial Cells in Vitro*. *Journal of Clinical Medicine*, 2019. **8**(11): p. 1925.
- [45]. Kleijn, A., et al., *A Systematic Comparison Identifies an ATP-Based Viability Assay as Most Suitable Read-Out for Drug Screening in Glioma Stem-Like Cells*. *Stem Cells International*, 2016. **2016**: p. 5623235.
- [46]. Li, F., et al., *Effects of static magnetic field on human umbilical vessel endothelial cell*. *Journal of Medical Colleges of PLA*, 2007. **22**(2): p. 106-110.
- [47]. Mahna, A. and M. Firoozabadi, *Environmental 50Hz Magnetic Fields Can Increase Viability of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)*. *Iranian Journal of Medical Physics*, 2016. **13**.
- [48]. Naarala, J., et al., *Direction-Dependent Effects of Combined Static and ELF Magnetic Fields on Cell Proliferation and Superoxide Radical Production*. *BioMed research international*, 2017. **2017**: p. 5675086-5675086.
- [49]. Madkan, A., et al., *Steps to the clinic with ELF EMF*. *Natural Science*, 2009. **Vol.01No.03**: p. 9.
- [50]. Blank, M. and R. Goodman, *Electromagnetic fields stress living cells*. *Pathophysiology*, 2009. **16**(2-3): p. 71-78.
- [51]. Funk, R.H.W., T. Monsees, and N. Özkucur, *Electromagnetic effects – From cell biology to medicine*. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 2009. **43**(4): p. 177-264.
- [52]. Salari, V., et al., *Towards non-invasive cancer diagnostics and treatment based on electromagnetic fields, optomechanics and microtubules*. *arXiv preprint arXiv:1708.08339*, 2017.
- [53]. Yuan, J., F. Xin, and W. Jiang, *Underlying Signaling Pathways and Therapeutic Applications of Pulsed Electromagnetic Fields in Bone Repair*. [33]. Gu, S., et al., *Evaluating the effect of Avastin on breast cancer angiogenesis using synchrotron radiation*. *Quantitative imaging in medicine and surgery*, 2019. **9**(3): p. 418-426.
- [34]. مشتاق, ص, et al., اثر عصاره آبی زعفران و میدان الکترو مغناطیس با فرکانس کم بر آنژیوژنز در حلقه آئورت موش صحرایی نژاد ویستار. کومش, ۱۳۹۳. ۱۵(۴) (پیاپی ۵۲): p. -.
- [35]. Zafar-Balanezhad, S., et al., *The synergic effects of rapamycin and extremely low frequency electromagnetic field on angiogenesis*. *Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences*, 2009. **11**(3): p. 70-76.
- [36]. مشتاق و همکاران، کاربرد توام پروتئازگیاهی بروملین و میدان الکترومغناطیس با فرکانس پایین (۵۰۰ Hz) بر آنژیوژنز در مدل حلقه آئورت موش صحرایی. فیزیولوژی و تکوین جانوری, ۲۰۱۸. ۱۲ (شماره ۱ زمستان ۱۳۹۷): p. 13-24.
- [37]. Absher, M., *CHAPTER 1 - Hemocytometer Counting*, in *Tissue Culture*, P.F. Kruse and M.K. Patterson, Editors. 1973, Academic Press. p. 395-397.
- [38]. Green, M.R. and J. Sambrook, *Estimation of cell number by hemocytometry counting*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019. **2019**(11): p. pdb. prot097980.
- [39]. Koyanagi, M., S. Kawakabe, and Y. Arimura, *A comparative study of colorimetric cell proliferation assays in immune cells*. *Cytotechnology*, 2016. **68**(4): p. 1489-1498.
- [40]. Riss, T.L., et al., *Cell viability assays*, in *Assay Guidance Manual [Internet]*. 2016, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- [41]. Al-Nasiry, S., et al., *The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells*. *Human Reproduction*, 2007. **22**(5): p. 1304-1309.
- [42]. Carneiro, A., et al., *Multiple effects of bevacizumab in angiogenesis: implications for its*

- [57]. Stovbun, S.V., et al., *The weak magnetic field inhibits the supramolecular self-ordering of chiral molecules*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 17072.
- [58]. Markov, M.S., *Expanding Use of Pulsed Electromagnetic Field Therapies*. Electromagnetic Biology and Medicine, 2007. **26**(3): p. 257-274.
- [59]. Lai, H., *Exposure to Static and Extremely-Low Frequency Electromagnetic Fields and Cellular Free Radicals*. Electromagnetic Biology and Medicine, 2019. **38**(4): p. 231-248.
- [60]. Mattei, M.D., et al., *Effects of Pulsed Electromagnetic Fields on Human Articular Chondrocyte Proliferation*. Connective Tissue Research, 2001. **42**(4): p. 269-279.
- Cellular Physiology and Biochemistry, 2018. **46**(4): p. 1581-1594.
- [54]. Furse, C., D.A. Christensen, and C.H. Durney, *Basic introduction to bioelectromagnetics*. Third ed. 2018: CRC press.
- [55]. Pall, M.L., *Electromagnetic fields act via activation of voltage-gated calcium channels to produce beneficial or adverse effects*. Journal of cellular and molecular medicine, 2013. **17**(8): p. 958-965.
- [56]. Wood, A. and K. Karipidis, *Radiofrequency Fields and Calcium Movements Into and Out of Cells*. Radiation Research, 2020. **195**(1): p. 101-113.

The effect of Extrmely low frequency magnetic field with Avastin on proliferation of Human umbilical vein endothelial cells

vahid zeraati¹, Parviz Abdolmaleki^{*2}, Reza Hassan Sajedi³, Abdolkarim Moazeni-roodi⁴

1- Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2-Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

3-Department of Biochemistry, Faculty of Biological sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

4- Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Iranshahr University of Medical Sciences, Iranshahr, Iran.

*Corresponding Author: parviz@modares.ac.ir

Receipt: 2021/10/23

Accepted: 2021/11/20

Abstract

Investigation of factors affecting endothelial cell proliferation is an essential part of angiogenesis studies. Given the importance of inhibiting angiogenesis in the treatment of cancers, and due to the side effects and high cost of anti-angiogenic drugs such as Avastin, the use of physical agents to aid in treatment and reduce the need for high doses of the drug is noteworthy. Magnetic fields are of interest due to their long-distance and non-invasive effects, and many studies have been conducted on their effects on biological phenomena, including angiogenesis, with inconsistent results. In the present study, the effect of a 2 mT alternating magnetic field with a frequency of 200 Hz and Austin on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was investigated. Cells were treated for 48 hours under a mixture of 50 µg/ml solution of vascular endothelial growth factor (VEGEF) and Avastin at concentrations (zero (drug control), 50, 100, 200 and 400 µg/ml) as well as field treatment groups for They were exposed to magnetic fields for 3, 6, 12, 24 and 48 hours. Then, cell proliferation was assessed using Alamar Blue colorimetric test. Data were analyzed by three-way analysis of variance. According to the findings, the exposure times of 12, 24 and 48 hours showed a significant reduction in cell proliferation compared to the control group, but this difference was not significant in the 3 and 6 hour treatments. Also, the degree of interaction of these factors with each other on HUVEC proliferation was investigated.

Keywords: Magnetic Fields, Angiogenesis, Avastin, Vascular Endothelial Growth Factor, Human Umbilical Vein Endithelial Cells