



بررسی اثرات توأم عصاره اتانولی سیر (*Allium Sativum L*) و میدان الکترومغناطیس با فرکانس پایین بر رگ‌زایی در پرده کوریوالانتوتیک جنین جوجه (*In Vivo*)

سید دامون صدوقی^{۱*}، سعیده ظفربالانژاد^۲، جواد بهارآرا^۳، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی^۴

۱- کارشناسی ارشد بیولوژی سلولی تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران

۲-۳- دکتری تخصصی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران

۴- دکتری تخصصی ژنتیک ملکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۴/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۲۶

چکیده

مقدمه: تحقیقات بیانگر اثرات ضد تکثیری میدان‌های الکترومغناطیس بر سلول‌های جانوری هستند. همچنین سیر علاوه بر خواص آنتی‌اکسیدانی، حاوی ترکیباتی است که می‌تواند مهار کننده تکثیر سلولی باشد. این پژوهش با هدف یافتن اثرات عصاره سیر و میدان الکترومغناطیس با فرکانس پایین بر پدیده رگ‌زایی انجام شد.

روش بررسی: ۸۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار به گروه‌های شاهد، شاهد آزمایشگاهی ۱ (تیمار توسط نرمال سالین)، شاهد آزمایشگاهی ۲ (در مجاورت میدان الکترومغناطیس به حالت خاموش)، تجربی ۱ (تیمار توسط عصاره سیر با غلظت ۱۰۰ µg/ml)، تجربی ۲ (تیمار توسط عصاره سیر با غلظت ۲۰۰ µg/ml)، تجربی ۳ (در معرض میدان الکترومغناطیس با شدت ۵۰ گاؤس)، تجربی ۴ (تیمار توسط عصاره سیر با غلظت ۱۰۰ µg/ml و میدان الکترومغناطیس ۵۰ گاؤس) و تجربی ۵ (تیمار توسط عصاره سیر با غلظت ۱۰۰ µg/ml و میدان الکترومغناطیس ۵۰ گاؤس) تقسیم شدند. روز هشتم انکوباسیون اسفنجی ژلاتینی روی پرده کوریوالانتوتیک قرار داده شد و گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۴ و ۵ با ۱۰ میکرولیتر عصاره سیر تیمار شدند. روز دهم گروه‌های تجربی ۳، ۴ و ۵، ۴ ساعت در معرض میدان الکترومغناطیس قرار گرفتند. در روز دوازدهم تمامی نمونه‌ها عکسبرداری شدند و طول و تعداد انشعابات عروقی با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ و آزمون‌های آماری ANOVA و Tukey تجزیه و تحلیل شد.

نتایج: میانگین تعداد و طول انشعابات عروق خونی در تمام گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: سیر اثرات مهاری بر رگ‌زایی دارد و این اثرات توسط میدان الکترومغناطیس با شدت ۵۰ گاؤس تشدید گردید.

واژه‌های کلیدی: رگ‌زایی، عصاره اتانولی سیر، میدان الکترومغناطیس

مقدمه

رگ‌زایی (آنژیوژنز Angiogenesis) مکانیسم ایجاد رگ‌های خونی جدید از سیستم عروقی موجود است. رگ‌زایی در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک مثل ترمیم زخم و در موارد پاتولوژیک مثل دیابت، هیپرتانسیون و در رشد تومورها دخالت دارد (۳-۱). سلول‌های آندوتلیال، همه رگ‌های خونی را می‌پوشانند و ماهیت واقعی مویرگ‌ها را تشکیل می‌دهند. برای تشکیل عروق خونی جدید سلول‌های آندوتلیال پیام تحریک کننده‌ای را از سوی آنژیوکینین‌ها دریافت کرده و آنزیم‌های ویژه‌ای مثل متالوپروتئینازهای ماتریکسی و هپاریناز را ترشح می‌کنند که موجب هضم ماتریکس خارج سلولی و غشای پایه می‌گردند و در نتیجه اتصالات محکم بین سلول‌های آندوتلیال از هم جدا می‌شوند. در ادامه این فرآیند، سلول‌های آندوتلیال می‌توانند به فضاهای جدید به وجود آمده مهاجرت نموده، و در جهت تشکیل لوله‌های مویرگی جدید سازمان یافته، تکثیر شوند و تمایز حاصل کنند (۴). در بسیاری از بیماری‌ها، از قبیل پسوریازیس، آندومتريوزیس و سرطان‌ها کنترل رگ‌زایی دچار اختلال می‌گردد. هنگامی که سلول‌های سرطانی به طور غیرطبیعی مقادیر زیادی فاکتورهای رگ‌زایی مثل فاکتور رشد آندوتلیال عروقی و فاکتور رشد فیبروبلاستی ترشح می‌کنند، این فاکتورها عوامل مهارکننده طبیعی رگ‌زایی، مثل آنژیواستاتین، آندوستاتین و ترومبوسپوندين را مهار نموده و در نتیجه رگ‌زایی رخ می‌دهد. به طور کلی، بیش از ۷۰ نوع بیماری مثل چاقی، رماتیسم مفصلی و آسم وجود دارد که با رگ‌زایی غیرطبیعی در ارتباط هستند (۵،۶). امروزه اعتقاد بر این است که هم تومورهای دارای بافت سفت مثل سرطان مثانه، مغز، سینه، رحم، کولون، ریه و پروستات و هم تومورهای دارای بافت نرم مثل لوسمی حاد میلوئید و میلوما دارای پتانسیل رگ‌زایی بوده و برای رشد، تهاجم و متاستاز خود وابسته به رگ‌زایی می‌باشند (۷). رشد تومورهای توپر (Solid) به ایجاد رگ‌های جدید و رفع نیازهای تغذیه‌ای سلول‌های توموری وابسته است. فاکتورهای رگ‌زایی توسط سلول‌های توموری در محیط رها می‌شوند که موجب تحریک سلول‌های

آندوتلیال مویرگ‌های مجاور تومور می‌گردد. این سلول‌ها در پاسخ به فاکتورهای فوق، غشای پایه را تجزیه کرده و با جداسدن از سلول‌های مجاور و ورود به ماتریکس خارج سلولی، به سمت توده تومورها مهاجرت کرده و در نهایت منجر به تشکیل عروق جدید در اطراف سلول و بافت سرطانی، افزایش دریافت مواد غذایی توسط تومورها و در نتیجه منجر به رشد سریع آنها می‌شود (۸). بسیاری از میانجی‌های ماست‌سل‌ها نظیر فاکتور سلول بنیادی (SCF: Stem Cell Factor)، فاکتور رشد اپیتلیال (EGF: Epithelial Growth Factor)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF: Growth Factor Fibroblast) و فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF: Platelet Derivative Growth Factor) به علاوه خانواده ژنی (TGFβ: Transforming Growth Factor β) رگ‌زا بوده و فعالیت سلول‌های آندوتلیال را تنظیم می‌کنند (۹،۱۰). یکی از مهم‌ترین فاکتورهای رگ‌زایی فاکتور رشد آندوتلیال عروقی (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor) می‌باشد. این فاکتور به کمک دو گیرنده ویژه که فقط در سلول‌های آندوتلیالی بیان می‌شوند، هم مهاجرت سلول‌های آندوتلیالی و هم تکثیر و نفوذپذیری آنها را تنظیم می‌کند (۱۱). علاوه بر فاکتورهای تحریک کننده رگ‌زایی، تعداد زیادی از فاکتورهای درونزای (Endogenous) مهارکننده رگ‌زایی شناسایی شده است که منشاء بسیاری از آنها به طور طبیعی از ماتریکس خارج سلولی می‌باشد و برخی هم پروتئین‌های غشایی هستند. بر این اساس، مهارکننده‌های رگ‌زایی به دو دسته اصلی شامل مهارکننده‌های مشتق از ماتریکس و مهارکننده‌های مشتق نشده از ماتریکس تقسیم می‌شوند. از نمونه‌های معروف دسته اول می‌توان به Arresten، Canstatin، Collagen، Endostatin، Endorepellin، EFC-XV، fragments، Fibulin، Fibronectin fragments، Tumstatin و Thrombospondin-1 and -2 اشاره کرد. از دسته دوم نیز می‌توان به Interferons، Growth factors and cytokines، Chondromodulin، Plastelet factor-4، Interleukins و Vasostatin اشاره کرد (۱۲،۱۳). هرگاه

مخری بر بافت‌ها و سلول‌های طبیعی نداشته باشند. علاوه بر این، محققان تاکنون بیش از ۳۰۰۰ گونه گیاهی را گزارش کرده‌اند که از زمان‌های بسیار دور اثرات مفیدی بر درمان سرطان داشته‌اند. به همین دلیل، امروزه گرایش به سمت استفاده از ترکیبات گیاهی به عنوان داروهای ضد سرطانی بالقوه که فعالیت سمی مستقیمی بر روی سلول‌های بدخیم داشته باشند، رو به افزایش است. به طوری که در حال حاضر، بیش از نیمی از داروهای ضدسرطانی مورد استفاده، مشتق از منابع طبیعی مثل گیاهان، جانوران دریایی و میکروارگانیسم‌ها هستند (۱۹). جنس *Allium* متعلق به خانواده *Liliaceae* دارای ۴۵۰ گونه است که یکی از گونه‌های خوراکی آن سیر (*Allium sativum* L) می‌باشد (۲۰). در مطالعات، خواص بازدارندگی سیر بر رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های متعدد گزارش شده است (۲۱). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان دهنده ارتباط معکوس میان مصرف سیر و بروز سرطان است. همچنین اثرات ضدسرطانی ترکیبات موجود در سیر به اثرات سایتوتوکسیک آن نسبت داده شد (۲۲). برخی مطالعات اثرات ضد سرطانی سیر را به خواص آنتی اکسیدانی آن نسبت داده‌اند (۲۳). از مهم‌ترین ترکیب‌های سیر می‌توان آلیین را نام برد. علاوه بر آن ترکیب‌های دیگری مانند آلیسین، پلی‌سولفیدها، آلیناز، اینولین، آجوبین‌ها، مرکاپتان‌ها، تیوگلیکوزیدها، تیوسولفینات‌ها و آدنوزین نیز در این گیاه یافت می‌شود. اما نسبت به آلیین اهمیت کمتری داشته و مقادیر آن‌ها بسیار ناچیز است. همچنین دارای مواد معدنی، ویتامین‌های A، B و C، پراکسیدازها، پروتئین، چربی، آمینواسید و پروستاگلاندین است (۲۴). برخی پاسخ‌های بیولوژیکی مصرف سیر شامل کاهش ایجاد بیماری‌های قلبی عروقی، مهار تکثیر سلول‌های سرطان، تحریک فعالیت‌های ایمنی، افزایش سمیت‌زدایی ترکیبات خارجی، اثر ضد میکروبی و ضد ویروسی، فعالیت آنتی اکسیدانی و محافظت از سلول‌های زایا می‌باشد (۲۵). با توجه به اینکه یکی از مکانیسم‌های جلوگیری از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی، مهار رگ‌زایی می‌باشد، این پژوهش با هدف بکارگیری عصاره اتانولی سیر با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ توام با

تعادل بین فاکتورهای مهارکننده رگ‌زایی و فاکتورهای محرک رگ‌زایی به نفع عوامل تحریک کننده تغییر کند، موجب رگ‌زایی می‌شود. در طی چند دهه گذشته با افزایش استفاده از وسایل الکتریکی تولیدکننده میدان‌های الکترومغناطیس در محیط‌های کار و زندگی، توجه محققین به تهدیدات احتمالی این وسایل بر سلامتی بشر جلب شده است (۱۴). فرکانس بیشتر این دستگاه‌ها بین ۵۰ تا ۶۰ هرتز و شدت جریان آنها بین ۶ تا ۱۰ آمپر متغیر می‌باشد. لذا شدت میدان حاصل از این دستگاه‌ها بسته به شدت جریان و فاصله از دستگاه، بین ۰/۱ تا ۸ میلی‌تسلا متغیر است (۱۵). بر اساس تأثیری که تشعشعات الکترومغناطیس بر موجودات زنده اعمال می‌کند، آنها را به دو دسته تقسیم کرده‌اند: ۱- امواج یونیزان، تشعشعاتی با فرکانس بالا، طول موج کوتاه و قدرت نفوذپذیری زیاد. نظیر اشعه گاما و اشعه X. به طور مستقیم و غیرمستقیم اثرات بیولوژیکی داشته و منجر به تخریب مولکول DNA و آسیب ژنتیکی می‌شوند. ۲- امواج غیر یونیزان: تشعشعاتی با فرکانس پایین، طول موج بلند و قدرت نفوذ کم، و با توجه به اینکه انرژی کافی برای شکستن پیوندهای شیمیایی مولکول‌ها و اتم‌ها را ندارند می‌توانند اثرات متفاوتی بر فرایندهای زیستی اعمال کنند (۱۶). مطالعات آزمایشگاهی در شرایط *In vivo* و *In vitro* نشان می‌دهد که مواجهه با میدان‌های الکترومغناطیس با فرکانس پائین، حوزه وسیعی از پاسخ‌ها را در سیستم‌های زنده القاء می‌کند (۱۷). همچنین میدان‌های الکترومغناطیس در شدت‌های بالا، با تغییر در عملکرد و یا مراحل عملکردی سلول‌ها، پاسخ‌های متنوعی در موجودات زنده القاء می‌کنند که می‌توان به تاثیر آن بر روی تکثیر و تمایز سلولی، اختلال در چرخه سلولی، القای مرگ برنامه ریزی سلولی (آپوپتوز)، اختلال در ارتباطات بین سلولی، افزایش بروز تخریب RNA، اختلال در بیان ژن‌ها، افزایش بروز تخریب DNA، تولید رادیکال‌های آزاد و تغییر در فعالیت‌های آنزیمی - آنتی‌اکسیدانی اشاره نمود (۱۸). استفاده از گیاهان دارویی در درمان انواع سرطان تاریخچه‌ای طولانی دارد. امروزه هدف بسیاری از تحقیقات یافتن ترکیبات و فرآورده‌های طبیعی گیاهی است که به طور مؤثری برای تومورها سمی بوده و اثرات

تیمار شدند و در معرض میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۵۰ گاؤس قرار گرفتند.

۸) گروه تجربی پنجم: با عصاره سیر با غلظت ۲۰۰ μg/ml تیمار شدند و در معرض میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۵۰ گاؤس قرار گرفتند.

عصاره‌گیری به روش سوکسله انجام گرفت. بدین صورت که ۵۰ گرم پودر خشک شده ریشه خوراکی گیاه سیر با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد توسط هیتر برقی به مدت ۱۸ ساعت جوشانده شد. سپس با حذف حلال توسط آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد عصاره تام استخراج گردید. عصاره تهیه شده در نرمال سالین حل گردید و غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ μg/ml تهیه شد. همه غلظت‌های تهیه شده از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد و استریل گردید. تخم مرغ‌ها به مدت ۸ روز در شرایط طبیعی و در دستگاه انکوباسیون (دامدشت- ایران) در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد قرار داده شدند. بخشی از پوسته انتهای پهن تخم مرغ‌ها در روز هشتم انکوباسیون در شرایط استریل ایجاد شده توسط هود لامینار (Telstar - Spain) برداشته شد و با پنس استریل، پرده غشایی انتهای تخم مرغ‌ها برداشته و روی پرده کوریولانتوتیک یک اسفنج ژلاتینی (آلبومین، سفیده تخم مرغ و محلول آگار در نرمال سالین به نسبت مساوی) به ابعاد ۴×۴×۱ میلی‌متر قرار داده شد. گروه شاهد در شرایط طبیعی نگهداری شدند و به اسفنج ژلاتینی روی پرده کوریولانتوتیک توسط میکروپیت میزان ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد. گروه شاهد آزمایشگاهی یک توسط ۱۰ میکرولیتر نرمال سالین (حلال عصاره) تیمار شد. هر پنج گروه تجربی توسط ۱۰ میکرولیتر عصاره اتانولی سیر با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ μg/ml تیمار شدند. در روز دهم انکوباسیون تخم مرغ‌های گروه‌های ۳، ۴ و ۵ به مدت ۴ ساعت در معرض میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز شدت ۵۰ گاؤس قرار گرفتند. در تمامی گروه‌ها محل تزریق، زمان تزریق و میزان تزریق عصاره یکسان بود. در روز دوازدهم انکوباسیون از تمام گروه‌ها در محدوده محل قرارگیری اسفنج ژلاتینی به کمک فوتواسترئومیکروسکوپ تحقیقاتی

میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۵۰ گاؤس به منظور بررسی اثرات آن بر پدیده رگ‌زایی در پرده کوریولانتوتیک جوجه انجام شد.

روش بررسی

این پژوهش یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی است که در آزمایشگاه تحقیقاتی تکوین جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد در سال ۹۱-۱۳۹۰ انجام شد. در این پژوهش از تخم مرغ‌های نطفه‌دار نژاد Hy-Line به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده گردید. تعداد ۸۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار به طور تصادفی به ۸ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه‌ها شامل:

۱) شاهد: نمونه‌های گروه شاهد به مدت ۱۲ روز در شرایط طبیعی نگهداری شدند و در روز ۸ انکوباسیون، جهت اینکه شرایط با گروه‌های دیگر کاملاً یکسان باشد به اندازه حجم عصاره تزریق شده به گروه‌های تجربی (۱۰ ماکرولیتر)، به اسفنج ژلاتینی گروه شاهد آب مقطر استریل تزریق شد.

۲) شاهد آزمایشگاهی یک: در روز هشتم انکوباسیون توسط ۱۰ ماکرولیتر نرمال سالین تیمار شدند. هدف این است که مشخص شود نرمال سالین که با استفاده از آن عصاره‌هایی با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ تهیه شده و حلال عصاره بود چه تأثیری بر رگ‌زایی دارد و اثر مهاری که بر رگ‌زایی ایجاد می‌شود، در نتیجه اثرات عصاره اتانولی سیر است یا حلال آن.

۳) شاهد آزمایشگاهی دو: در روز دهم انکوباسیون دقیقاً همانند سایر نمونه‌های توأم با میدان الکترومغناطیس، به مدت ۴ ساعت در مجاورت سیستم مولد میدان الکترومغناطیس به حالت خاموش ولی سیستم انکوباسیون به حالت روشن قرار گرفتند.

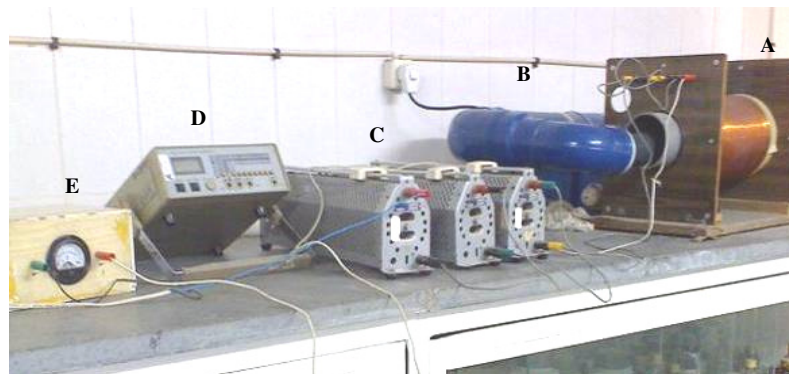
۴) گروه تجربی یک: با عصاره سیر با غلظت ۱۰۰ μg/ml تیمار شدند.

۵) گروه تجربی دو: تیمار شده توسط عصاره سیر با غلظت ۲۰۰ μg/ml تیمار شدند.

۶) گروه تجربی سه: در معرض میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۵۰ گاؤس قرار داده شدند.

۷) گروه تجربی چهار: با عصاره سیر با غلظت ۱۰۰ μg/ml

انکوباسیون (دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۵٪، شرایط استریل)، بوبین، سه رئوستا، خازن و آمپر متر است، استفاده شد (طراحی و ساخت با کمک و همکاری گروه زیست‌شناسی و گروه فیزیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد). برای ساخت بوبین، حول یک لوله از جنس PVC مقادیر مشخصی از سیم مسی، با استفاده از فرمول محاسبه شدت میدان الکترومغناطیس ($B = \mu n I$) پیچانده شد. (B: شدت میدان الکترومغناطیس بر حسب تسلا، $\mu: 4\pi \times 10^{-7}$ ، n: تعداد دور در واحد طول، I: شدت جریان) این سیم‌پیچ قادر به تأمین شدت میدان الکترومغناطیس بین ۱۰ تا ۴۰۰ گاوس می‌باشد. به منظور اطمینان از صحت خروجی میدان الکترومغناطیس با شدت ۵۰ گاوس، پس از برقراری جریان در مدار، با استفاده از گاوس‌متر شدت میدان بررسی شد (تصویر ۱).



تصویر ۱: سیستم مولد میدان الکترومغناطیس و انکوباسیون (A) سیم پیچ مولد میدان الکترومغناطیس، (B) سیستم انکوباسیون، (C) رئوستا، (D) ولت سنج، (E) خازن

نتایج

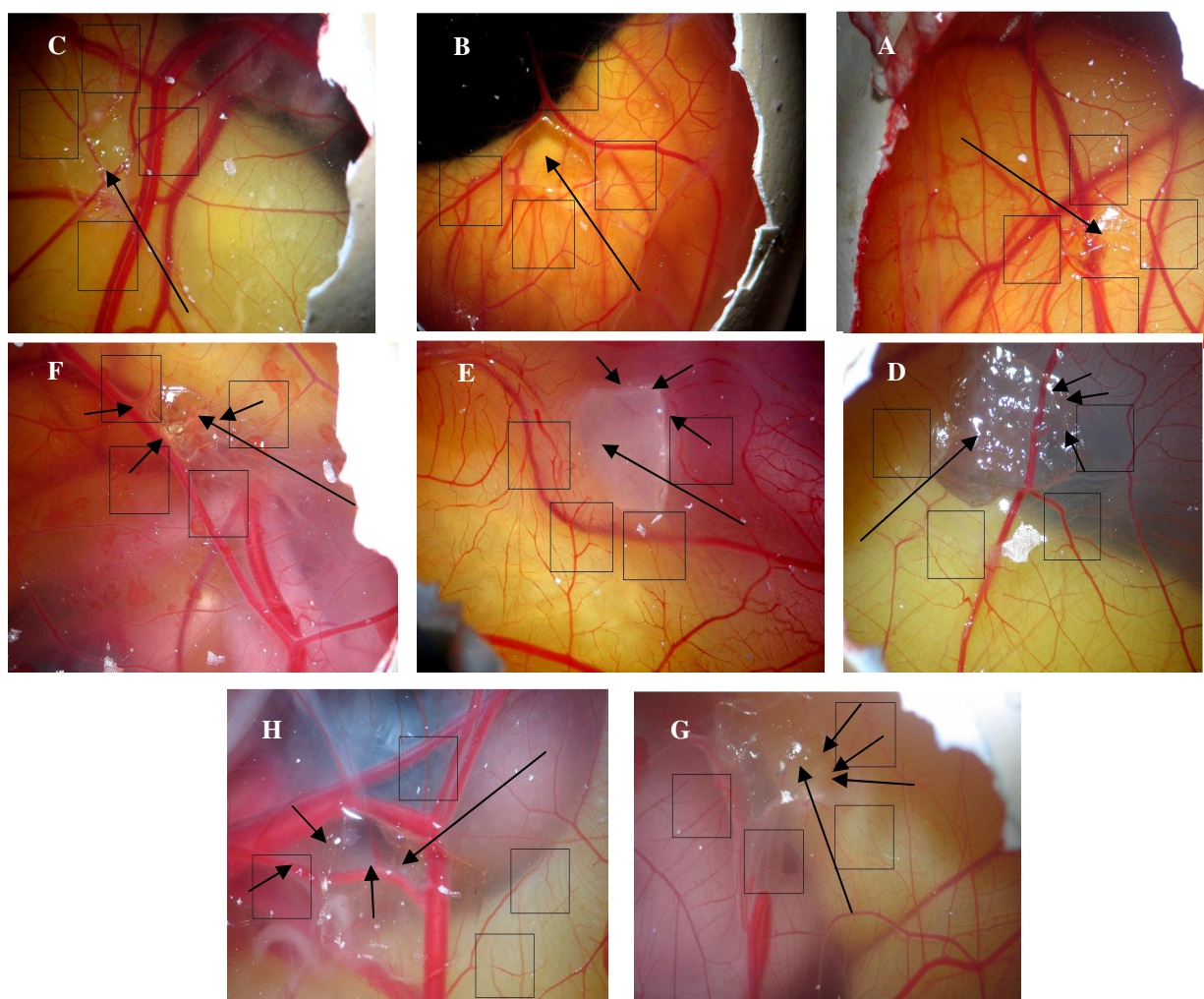
معرض میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۵۰ گاوس در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0/05$). میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در گروه‌هایی که توسط عصاره سیر با غلظت‌های $\mu\text{g/ml}$ ۱۰۰ و ۲۰۰ و میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۵۰ گاوس تیمار شدند، در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0/05$) (جدول ۱)، (تصویر ۲).

جدول ۱: طول و تعداد انشعابات عروق و به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه ($n=10$)

مجهز به دوربین عکاسی (ziess - Germany) و دوربین دیجیتال (Cannon - Japan) تصاویری با بزرگنمایی ۲۶ برابر ($4 \times 10 \times 0/65$) تهیه شد و طول و تعداد انشعابات عروقی در اطراف ناحیه تیمار (۴ مربع به ابعاد 100×100 پیکسل در ۴ طرف اسفنج ژلاتینی) به طور تصادفی توسط نرم افزار Image J نسخه ۲ اندازه‌گیری گردید. داده‌های بدست آمده از تمامی گروه‌ها ($n=10$) با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ و آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار میان گروه‌ها و به منظور تفکیک گروه‌هایی که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. جهت تأمین میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۵۰ گاوس از یک سیستم ویژه که دارای شرایط مناسب

بر اساس نتایج به دست آمده و تحلیل آزمون‌های آماری، میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در گروه‌های شاهد آزمایشگاهی یک و دو در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0/05$). میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در گروه‌های تجربی تیمار شده توسط عصاره سیر با غلظت‌های $\mu\text{g/ml}$ ۱۰۰ و ۲۰۰ در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0/05$). میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در گروه تجربی قرار داده شده در

| P-Value | تعداد عروق | | طول عروق (سانتی‌متر) | | معیارهای توصیفی گروه |
|---------|--------------------------|---------|--------------------------|---------|----------------------|
| | (میانگین ± انحراف معیار) | P-Value | (میانگین ± انحراف معیار) | P-Value | |
| | ۲۷/۷ ± ۴/۵۹ | | ۳۸/۸۲ ± ۶/۴۷ | | شاهد |
| ۰/۰۶۲ | ۲۸/۲ ± ۱۰/۱۴ | ۰/۰۹۶ | ۳۹/۷۷ ± ۶/۴۱ | | شاهد آزمایشگاهی ۱ |
| ۰/۰۷۹ | ۳۱/۱ ± ۱۱/۴۳ | ۰/۰۸۳ | ۴۳/۳۹ ± ۶/۲۱ | | شاهد آزمایشگاهی ۲ |
| ۰/۰۱۹ | ۲۰/۱ ± ۷/۱۵ | ۰/۰۲۹ | ۳۰/۰۴ ± ۷/۴۱ | | تجربی ۱ |
| ۰/۰۱۲ | ۱۷/۹ ± ۸/۷۲ | ۰/۰۱۹ | ۲۳/۴۸ ± ۹/۹۸ | | تجربی ۲ |
| ۰/۰۲۳ | ۲۲/۲ ± ۷/۲۵ | ۰/۰۳۱ | ۳۰/۶۸ ± ۹/۲۲ | | تجربی ۳ |
| ۰/۰۰۹ | ۱۱/۹ ± ۵/۸۵ | ۰/۰۱۱ | ۲۰/۸۱ ± ۷/۴۶ | | تجربی ۴ |
| ۰/۰۰۳ | ۹/۹ ± ۷/۸۱ | ۰/۰۰۱ | ۱۶/۲۵ ± ۱۰/۲۸ | | تجربی ۵ |



تصویر ۲: (A: شاهد، B) شاهد آزمایشگاهی یک، (C) شاهد آزمایشگاهی دو، (D) گروه تجربی یک، (E) گروه تجربی دو، (F) گروه تجربی سه، (G) گروه تجربی چهار، (H) گروه تجربی پنج

در تمامی تصاویر فلش بزرگ محل اسفنج ژلاتینی و فلش‌های کوچک نشان دهنده کاهش محسوس انشعابات عروقی (طول و تعداد) در نمونه‌های تیمار شده با عصاره اتانولی سیر می‌باشد. چهار مربع سیاه رنگ در اطراف اسفنج ژلاتینی، نشان دهنده سطح اندازه گیری به ابعاد ۱۰۰×۱۰۰ پیکسل می‌باشد که به صورت تصادفی در اطراف اسفنج قرار داده شده است.

بحث

بر اساس نتایج این پژوهش میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در اطراف محل تیمار در نمونه‌های شاهد آزمایشگاهی یک (تیمار شده توسط نرمال سالین) و شاهد آزمایشگاهی دو (قرار داده شده در مجاورت سیستم مولد میدان الکترومغناطیس به حالت خاموش) در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$). بنابراین می‌توان گفت حلال عصاره سیر (نرمال سالین) که توسط آن دوزهای مصرفی آزمایش تهیه شده است، تاثیر معنی‌داری بر تعداد و طول انشعابات عروقی ندارد. همچنین با بررسی نتایج به دست آمده از نمونه‌های شاهد آزمایشگاهی دو مشخص شد تغییر شرایط انکوباسیون در روز دهم و انتقال نمونه‌ها به محفظه انکوباسیون سیستم مولد میدان الکترومغناطیس، موجب اختلاف معنی‌داری در میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی نسبت به نمونه‌های گروه شاهد نمی‌شود ($p > 0.05$). بنابراین اثراتی را که میدان الکترومغناطیس به حالت روشن بر میزان رگ‌زایی اعمال می‌کند ناشی از تشعشعات میدان الکترومغناطیس است و تغییر شرایط انکوباسیون اثری بر میزان رگ‌زایی در پرده کوریوالانتویک جنین جوجه ندارد. نتایج این پژوهش مشخص نمود میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در اطراف محل تیمار در نمونه‌های تیمار شده توسط عصاره سیر با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد، به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.05$). همچنین مشخص گردید میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در اطراف محل تیمار در نمونه‌های گروهی که توسط عصاره سیر با غلظت ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ تیمار شدند در مقایسه با نمونه‌های گروهی که توسط عصاره سیر با غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ تیمار گردیدند، کاهش داشته است اما آزمون‌های آماری کاهش معنی‌داری را نشان ندادند ($p > 0.05$). در پژوهشی که در سال ۲۰۰۱ میلادی انجام شد، آلیسین که یکی از ترکیبات اصلی سیر می‌باشد، به عنوان مهارکننده پرولیفراسیون بسیاری از بدخیمی‌های انسانی شناخته شد. همچنین مشخص شد آجوئن مشتق شده از سیر می‌تواند پرولیفراسیون سلول‌های لوسمی

انسانی را مهار کرده و سبب القای مرگ برنامه ریزی سلولی در آنها شود (۲۶). Powolny و همکاران در سال ۲۰۰۸ میلادی دریافتند آلیسین موجود در سیر می‌تواند از تکثیر سلول‌های سرطانی پستان، آندومتر و روده بزرگ جلوگیری کند (۲۷). Ramos و همکاران دریافتند روغن سیر حاوی ترکیباتی است که می‌تواند تکثیر سلول‌های آندوتلیال عروقی را مهار کند (۲۸). Capasso در مطالعه خود دریافت، ترکیبات موجود در سیر می‌تواند مانع از جهش‌های کروموزومی شود و خطر ایجاد سرطان را کاهش دهد به نظر وی این اثرات ناشی از خواص آنتی اکسیدانی ترکیبات موجود در این گیاه دارویی می‌باشد (۲۹). Thomson و همکاران دریافتند سیر حاوی ترکیباتی است که می‌تواند منجر به القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی در سلول‌های سرطانی شده و با این مکانیسم مانع از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شوند (۳۰). در پژوهشی که توسط Le Bon و همکاران صورت گرفت، مشخص شد، اثرات مهاری که عصاره سیر بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی دارد، ناشی از ترکیبات ارگانوسولفور موجود در آن می‌باشد. همچنین مشخص شد سیر حاوی ترکیباتی است که با مهار تکثیر سلول‌های آندوتلیال عروقی می‌تواند موجب کاهش روند تکثیری سلول‌های سرطانی شود (۳۱). Matsuura و همکاران در مطالعه‌ای دریافتند عصاره سیر از طریق مهار رگ‌زایی و کاهش جوانه زدن عروق خونی در اطراف سلول‌های کارسینوم کولورکتال می‌تواند موجب کاهش روند پیشرفت سرطان شود (۳۲). بر اساس نتایج این پژوهش میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در اطراف محل تیمار، در نمونه‌های تیمار شده توسط عصاره سیر با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۵۰ گاوس، در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.05$). همچنین از مقایسه نتایج به دست آمده از نمونه‌های گروهی که توسط عصاره سیر با غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و میدان الکترومغناطیس تیمار شد با گروهی که توسط عصاره سیر با غلظت ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و میدان الکترومغناطیس تیمار گردید، مشخص شد میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی بین

و شدت ۴۰۰ گاؤس می‌تواند موجب تشدید اثرات مهاری عصاره زعفران بر رگ‌زایی شود (۳۵). Balanejad و همکاران در سال ۲۰۱۰ میلادی گزارش کردند که تشعشعات میدان‌های الکترومغناطیس با شدت ۴۰۰ گاؤس می‌تواند منجر به افزایش اثر مهاری راپامایسین بر رگ‌زایی در پرده کوریوالانتوتیک جنین جوجه شود. به عقیده آنها میدان‌های الکترومغناطیس پالسی و مستقیم با فرکانس پایین می‌تواند سبب کاهش وزن جنین در مراحل اولیه رشد و نمو و کاهش طول و تعداد انشعابات عروقی گردد (۳۶). با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش و تحقیقات مشابه، میدان‌های الکترومغناطیس با فرکانس پایین می‌تواند موجب مهار رگ‌زایی شوند، لذا کاربرد توأم آن با روش‌های شیمی درمانی می‌تواند جهت درمان بسیاری از بدخیمی‌ها مورد توجه قرار گیرد. عصاره سیر با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ مطابق با روش‌های این پژوهش دارای اثرات مهاری بر رگ‌زایی است. بنابراین می‌توان از ترکیبات آن جهت ساخت داروهای با منشأ گیاهی استفاده نمود که می‌تواند موجب مهار رگ‌زایی در اطراف تومورها شود، استفاده نمود. با توجه به اینکه ترکیبات موجود در سیر می‌تواند اثرات مهاری بر رگ‌زایی اعمال کند، لذا مصرف بیش از حد آن در دوران بارداری می‌تواند تهدیدی برای تکوین سیستم عروقی جنین باشد. همچنین اثرات مهاری میدان‌های الکترومغناطیس بر رگ‌زایی می‌تواند هشدار برای زنان بارداری باشد که به صورت مداوم در معرض تشعشعات میدان‌های الکترومغناطیس با فرکانس پایین قرار دارند. با توجه به اینکه استفاده از میدان‌های الکترومغناطیس جهت درمان سرطان می‌تواند علاوه بر تخریب سلول‌های سرطانی و عروق اطراف آن، موجب تخریب سلول‌های سالم شود، یافتن روشی که به کمک آن بتوان بدون آسیب به سلول‌های سالم تنها سلول‌های سرطانی و عروق اطراف آن را مورد هدف قرار داد، می‌تواند یک روش مؤثر در درمان بسیاری از سرطان‌ها باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش بیانگر آن است که عصاره اتانولی سیر با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ دارای اثر مهاری بر رگ‌زایی در

این دو گروه اختلاف معنی‌داری ندارد. با توجه به اینکه غلظت ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ عصاره سیر توأم با میدان الکترومغناطیس ۵۰ گاؤس توانست میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی را در مقایسه با غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ عصاره سیر توأم با میدان الکترومغناطیس ۵۰ گاؤس کاهش دهد، ولی با توجه به آزمون‌های آماری این کاهش معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). مقایسه نتایج گروهایی که توسط عصاره سیر با غلظت‌های ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و ۲۰۰ تیمار شدند با گروه‌هایی که توسط عصاره سیر غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۵۰ گاؤس تیمار شدند، مشخص گردید میدان الکترومغناطیس توانسته است به طور معنی‌داری اثر کاهشی عصاره سیر با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بر رگ‌زایی را تشدید کند ($p < 0.05$). مقایسه نتایج گروهی که به مدت ۴ ساعت در معرض میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۵۰ گاؤس قرار داشت با نمونه‌های گروه شاهد نشان داد، میدان الکترومغناطیس به تنهایی می‌تواند موجب کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در اطراف محل تیمار شود ($p < 0.05$). Baharara و همکاران مطالعه‌ای با قرار دادن تخم مرغ‌های نطفه‌دار از روز دهم انکوباسیون در معرض میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ گاؤس متوجه شدند که میدان الکترومغناطیس با شدت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ گاؤس دارای اثر مهاری بر آنژیوژنز در پرده کوریوالانتوتیک جنین جوجه است و تعداد و طول انشعابات عروقی را کاهش می‌دهد. به عقیده آنها میدان الکترومغناطیس با شدت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ گاؤس اثر بازدارندگی بر رشد و تقسیم سلول‌های آندوتلیال عروق خونی جنین جوجه دارد (۳۳). در پژوهشی که توسط Baharara و همکاران صورت گرفت، گزارش شد کاربرد آتورواستاتین با غلظت ۱۰ μm توأم با میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۵۰ گاؤس دارای اثر مهاری بر آنژیوژنز است و میدان الکترومغناطیس می‌تواند اثر رگ‌زایی ناشی از تیمار با آتورواستاتین با غلظت ۰/۱ μm را کاهش دهد (۳۴). Mousavi و همکاران دریافتند میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز

وابسته به رگ‌زایی مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از تمامی اساتید محترمی که در انجام این پژوهش مرا یاری نموده‌اند، به ویژه دوستان و همکاران آزمایشگاه تحقیقاتی تکوین سلولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد تشکر و قدردانی می‌شود.

پرده کوریوالانتوئیک جنین جوجه است و تشکیل رگ‌های خونی را به طور موضعی در محل تیمار کاهش می‌دهد و این تغییرات توسط میدان الکترومغناطیس با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۵۰ گاؤس تشدید می‌گردد. بنابراین کاربرد عصاره اتانولی سیر همراه با میدان الکترومغناطیس می‌تواند جهت تحقیقات بیشتر به منظور درمان سرطان‌ها و بسیاری از بیماری‌های

References:

- 1- Zarei M, Khazaei M, Sharifi MR, Pourshanazari A. *Coronary angiogenesis during experimental hypertension: is it reversible?* J Res Med Sci 2011; 16(3): 269-75.
- 2- Khazaei M, Fallahzadeh AR, Sharifi MR, Afsharmoghaddam N, HaghjooyJavanmard SH, Salehi E. *Effects of diabetes on myocardial capillary density and serum angiogenesis biomarkers in male rats.* Clinics 2011; 66(8): 1419-24.
- 3- Amjadi F, Javanmard SH, Zarkesh-Esfahani H, Khazaei M, Narimani M. *Leptin promotes melanoma tumor growth in mice related to increasing circulating endothelial progenitor cells numbers and plasma NO production.* J Exp Clin Cancer Res 2011; 30(8): 121-9.
- 4- Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. *Vasculogenic mimicry and tumor-cell lasticity: lessons from melanoma.* Nat Rev Cancer 2003; 3(4): 411-21.
- 5- Noonan DM, Benelli R, Albin A, *Angiogenesis and cancer prevention: a vision.* Cancer Res 2007; 174: 219-24.
- 6- Quesada AR, Muñoz-Chápuli R, Medina MA, *Antiangiogenic drugs: from bench to clinical trials.* Med Res Rev 2006; 26(2): 483-530.
- 7- Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A. *The history of angiogenic switch concept.* J Leukemia 2007; 21(1): 44-52.
- 8- Battle MR, Goggi JL, Allen L, Barnett J, Morrison MS. *Monitoring tumor response to antiangiogenic sunitinib therapy with 18F-fluciclatide, 18F-labeled α Vbeta3-integrin and α V beta5-integrin imaging agent.* J Nucl Med 2011; 52(3): 424-30.
- 9- Hiromatsu Y, Toda Sh. *Mast cells and angiogenesis.* Micros Res Tech 2003; 60(1): 64-9.
- 10- Llyod R, Vidal S, Horvath E, Kovacs K, Scheithauer B. *Angiogenesis in normal and neoplastic pituitary tissues.* Micros Res Tech 2003; 60(2): 244-50.
- 11- 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; 39(2): 212-20.

- 12- Makhni E. *Angiogenesis: an examination of both tumorigenic and rehabilitative properties*. MURJ 2003; 8: 23-6.
- 13- Nyberg P, Xie L, Kalluri R. *Endogenous inhibitors of angiogenesis*. Cancer Res 2005; 65(10): 3967-79.
- 14- Falone S, Grossi MR, Cinque B, D'Angelo B, Tettamanti E, Cimini A, et al. *Fifty hertz extremely low frequency electromagnetic field causes changes in redox and differentiative status in neuroblastoma cells*. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39(11): 2093-106.
- 15- Kundi M, Hardell L, Sage C, Sobel E. *Electromagnetic fields and the precautionary principle*. Environ Health Perspect 2009; 117(11): A84-95.
- 16- Khurana VG, Teo C, Kundi M, Hardell L, Carlberg M. *Cell phones and brain tumors: a review including the long-term epidemiologic data*. Surg Neurol 2009; 72(3): 205-14.
- 17- Levin M. *Bioelectromagnetics in morphogenesis*. Bioelectromagnetics 2003; 24(5): 295-315.
- 18- Focke F, Schuermann D, Kuster N, Schär P. *DNA fragmentation in human fibroblasts under extremely low frequency electromagnetic field exposure*. Mutat Res 2010; 683(1-2): 74-83.
- 19- Cragg GM, Newman DJ. *Plants as source of anticancer agents*. J Ethnopharmacol 2005; 100(1-2): 72-9.
- 20- Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Goran A, Igetic R. *Phenolics as antioxidants in garlic (Allium Sativum L)*. Food Chem 2008; 111(4): 925-29.
- 21- Shams-Ghahfarokhi M, Shokoohamiri MR, Amirrajab N, Moghadasi B, Ghajari A, Zeini F, et al. *In vitro antifungal activities of Allium cepa, Allium sativum and ketoconazole against some pathogenic yeasts and dermatophytes*. Fitoterapia 2006; 77(4): 321-3.
- 22- Colić M, Vučević D, Kilibarda V, Radicević N, Savić M. *Modulatory effects of garlic extracts on proliferation of T-lymphocytes in vitro stimulated with concanavalin A*. Phytomedicine 2002; 9(2): 117-24.
- 23- Lu HF, Sue CC, Yu CS, Chen GW, Chung JG. *Diallyl-disulfide (DADS) induced apoptosis undergo caspase-3 activity in human bladder cancer T24 cells*. Food Chem Toxicol 2004; 42(10): 1543-52.
- 24- Lee J, Huang JS, Jayathilaka LP, Lee BS. *HPLC-MTT assay Anticancer activity of aqueous garlic extract is from allicin*. Analytical Biochem 2013; 436(2): 187-9.
- 25- Song K, Milner JA. *The influence of heating on the anticancer properties of garlic*. J Nutr 2001; 131(35): 10545-75.
- 26- Ahmed N, Laverick J, Sammons J, Zhang H, Maslin DJ, Hassan HT. *Ajoene, a garlic derived natural compound, enhances chemotherapy-induced apoptosis in human myeloid leukaemia CD34-positive resistant cells*. Anticancer Res 2001; 21(5): 3519-24.
- 27- Powolny A, Singh S. *Multitargeted prevention and therapy of cancer by diallyl trisulfide and related Allium vegetable-derived organosulfur compounds*. Cancer Lett 2008; 269(2): 305-14.
- 28- Ramos GB, Arguelles CL, Herrera AA, Ragasa CV. *Screening for potential anti-angiogenic property utilizing*

- avian embryo chorioallantois membranes (CAMs). Garlic (Allium sativum L) oil.* Asia Life Sciences 2011; 20(1): 13-23.
- 29- Capasso A. *Antioxidant action and therapeutic efficacy of allium sativum L.* Molecules 2013; 18(1): 690-700.
- 30- Thomson M, Ali M. *Garlic [allium sativum]: a review of its potential use as an anti-cancer agent.* Current Cancer Drug Targets 2003; 3(1): 67-81.
- 31- Le Bon AM, Siess MH. *Organosulfur compounds from allium and the chemoprevention of cancer.* Drug Metabol Drug Interac 2011; 17(1-4): 51-79.
- 32- Matsuura N, Miyamae Y, Yamane K, Nagao Y, Hamada Y, Kawaguchi N, et al. *Aged garlic extract inhibits angiogenesis and proliferation of colorectal carcinoma cells.* J Nutr 2006; 136(3 Suppl): 8425-65.
- 33- Baharara J, Ashraf AR, Zafar-Balanezhad S, Samareh-Mosavi S. *The inhibitory effect of low frequency electromagnetic field (50Hz) on angiogenesis in chorioalantoic membrane of chick.* J Zahedan Univ Med Sci 2010; 12(2): 8-12. [Persian]
- 34- Baharara J, Zafar-Balanezhad S, Nejadshahrokh Abadi KH, Hesami Z. *Synergic effects of Atorvastatin and low frequency electromagnetic field on chorioallantoic membrane angiogenesis of chick embryo.* J Birjand Univ Med Sci 2012; 19(2): 148-56. [Persian]
- 35- Mousavi M, Baharara J, Zafar-Balanezhad S, Nejadshahrokh Abadi KH. *The synergic effects of saffron aqua extract and low frequency electromagnetic field on angiogenesis in chick chorioalantoic membrane.* J Shahrekord Univ Med Sci 2013; 15(1): 1-10. [Persian]
- 36- Balanejad S, Parivar K, Baharara J, Mohseni Kochesfahani H. *Effect of Combined rapamycine and of low frequency electromagnetic field on angiogenesis.* J Shahrekord Univ Med Sci 2010; 11(3): 70-6. [Persian]

Investigating the Synergic Effects of Ethanolic Extract of Allium sativum L and Electromagnetic Field with Low Frequency on Angiogenesis in Chick Chorioallantoic Membrane (In Vivo)

Sadooghi SD(MSc)^{*1}, Zafar Balanzhad S(PhD)², Baharara J(PhD)³, Nezhad Shahrokh Abadi Kh(PhD)⁴

¹⁻⁴Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran

Received: 15 Jan 2013

Accepted: 4 Jul 2013

Abstract

Introduction: A number of researches show anti-proliferative effects of EMF on animal cells. In addition to antioxidant properties of garlic, it contains compounds that can inhibit cell proliferation. This study was conducted to investigate the effects of garlic extract and EMF with low frequency on angiogenesis.

Methods: Eighty fertilized eggs were divided into the control group, sham-exposed 1 (treated by normal saline), sham-exposed 2 (in vicinity of switched off EMF), experimental group 1 (treated by concentration 100 µg/ml of garlic extract), experimental group 2 (treated by concentration 200 µg/ml of garlic extract), experimental group 3 (in vicinity of EMF with intensity of 50 gauss), experimental group 4 (treated by concentration 100 µg/ml of garlic extract and EMF with intensity of 50 gauss), experimental group 5 (treated by concentration 200 µg/ml of garlic extract and EMF with intensity of 50 gauss). On the 8th day of incubation, gelatin sponge was placed on the chorioallantoic membrane and experimental groups 1, 2, 4, and 5 were treated with 10 microliters of garlic extract. On the 10th day of incubation, experimental groups 3, 4 and 5 were exposed to EMF for 4 hours. All samples were photographed on the 12th day of incubation and the length and numbers of vessels were analyzed by ANOVA and Tukey statistical tests.

Results: The mean number and length of blood vessels in all experimental groups were significantly decreased compared to the control group ($p < 0.05$).

Conclusion: Garlic has inhibitory effects on angiogenesis. Moreover, these effects were amplified by EMF with intensity of 50 gauss.

Keywords: Allium Sativum L; Angiogenesis; Electromagnetic field

This paper should be cited as:

Sadooghi SD, Zafar Balanzhad S, Baharara J, Nezhad Shahrokh Abadi Kh. *Investigating the synergic effects of ethanolic extract of allium sativum L and electromagnetic field with low frequency on angiogenesis in chick chorioallantoic membrane (in vivo)*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2013; 21(4): 493-504.

***Corresponding author: Tel: +98 9153026313, Email: damoon.sadoughi@gmail.com**