

بررسی اثرات هیوسیامین روی استرس اکسیداتیو سلول های کبدی در موش صحرائی نر

نریمان خسروی فارسانی^۱، مسعود مشهدی اکبر بوجار^۱، حسین تیموری^{۲*}، زینب امینی فارسانی^۳،
دلنیا غلامی^۲، زهرا سجادیپور^۲

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران؛ ^۱مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۳۰

چکیده:

زمینه و هدف: افزایش تولید رادیکال های آزاد توسط دستگاه‌های درون زا و برون زا در بدن ما منجر به استرس های اکسیداتیو شده که به سلول‌های اندام‌های مختلف آسیب می‌رساند. هیوسیامین یک تروپان آلکالوئید مهم جدا شده از برخی گونه‌های سولاناسه می‌باشد که به واسطه خواص ضد درد، ضد التهاب، ضد تب و ضد تشنج، در پزشکی سنتی استفاده می‌شود. خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌گلایکیشنی تروپان آلکالوئیدها می‌تواند در مقابله با استرس اکسیداتیو نقش داشته باشد. هدف این مطالعه بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌گلایکیشنی ترکیب هیوسیامین روی سلول‌های کبد موش‌های صحرائی نر است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی، سلول‌های کبد از موش نر Sprague-Dawley جدا گردیده، در شرایط استاندارد کشت داده شدند. غلظت‌های متعدد هیوسیامین (۳۲-۰ میکرومولار) روی سلول‌های کبدی اثر داده شد، سپس فعالیت آنزیم‌های گلوکوتایون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و همچنین خنثی‌سازی DPPH و گلی اکسال به روش اسپکتروفتومتری بررسی شد. تغییرات در میزان مالون دی آلدئید (MDA) در سلول‌های کبدی به وسیله کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: فعالیت آنزیم‌های گلوکوتایون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز به موازات افزایش غلظت هیوسیامین در سلول‌های کبدی افزایش یافت و تولید گونه های فعال اکسیژن را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد. میزان فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD و GPX در غلظت ۸ میکرومولار هیوسیامین در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی‌داری افزایش یافت و به ترتیب ۱۰/۳۳ و ۸/۶ و ۶/۳ واحد آنزیم بود ($P < 0/05$). همچنین استفاده از غلظت ۴ میکرومولار هیوسیامین میزان MDA، گلی اکسال و میزان مهار DPPH را در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب ۱/۹۴، ۲/۲۶ و ۲/۳۳ برابر کاهش داده است ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که هیوسیامین دارای فعالیت های آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌گلایکیشنی قابل توجهی روی سلول های کبد موش صحرائی است. این ترکیب، سلول‌های کبد را در برابر اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد حفاظت می‌کند. بررسی اثرات این ترکیب برای درمان بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو در آینده مفید خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: هیوسیامین، استرس اکسیداتیو، سلول‌های کبد، موش صحرائی.

مقدمه:

رادیکال های آزاد، مولکول های فعال و بسیار ناپایداری هستند که از گونه‌های فعال اکسیژن ROS (Reactive Oxygen Species) و گونه‌های فعال نیتروژن (RNS) حاصل می‌شوند. ROS به صورت

نویسنده مسئول: شهرکرد- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی- پژوهشکده علوم پایه سلامت- تلفن: ۰۹۱۳۳۰۵۴۷۸۱

E-mail: hosseintimm@yahoo.com

قرار می گیرند. گیاهان حاوی این آلکالوئیدها از دوران باستان به عنوان سموم، نقش حیاتی در پزشکی ارتدوکس ایفا می کردند (۱۲،۱۱). به تازگی، خواص آنتی اکسیدانی بعضی از اعضای خانواده تروپان آلکالوئیدها نشان داده شده است. باین وجود، مطالعات کمی در زمینه خواص آنتی اکسیدانی هیوسیامین انجام شده است. علاوه بر این، اعضای این خانواده دارای فعالیت آنتی گلیکیشنی (Antiglycation activity) نیز هستند (۱۳)؛ اما تاکنون خواص آنتی گلیکیشنی هیوسیامین بررسی نشده است. پژوهش حاضر با هدف بررسی خواص آنتی اکسیدانی و آنتی گلیکیشنی هیوسیامین در غلظت های مختلف در کشت بافت کبد موش صحرایی انجام شده است.

روش بررسی:

برای انجام این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، ۵۶ سر موش های صحرایی نر سالم از نژاد Sprague-Dawley (۸ هفته ای با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم) از آزمایشگاه حیوانات انستیتو پاستور تهیه شد. حیوانات در شرایط عادی (۱۲ ساعت نور/ ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند و با یک رژیم غذایی استاندارد آزمایشگاهی و مقدار آب مناسب تغذیه شدند (۱۴). شرایط نگهداری و آزمایشگاهی برای تمام موش ها، یکسان در نظر گرفته شده است. لازم به ذکر است، کلیه اصول اخلاقی در مورد نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید وزارت بهداشت، مدنظر قرار گرفته شد (کد ۱۱۳۵). آنزیم های استاندارد CAT، SOD و GPX، هیوسیامین، DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) و محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) از شرکت مواد شیمیایی سیگما (St. Louis, MO) خریداری شدند. مواد شیمیایی دیگر نیز از مواد تجاری موجود بالاترین کیفیت بودند.

برای تهیه محلول اصلی، هیوسیامین در اتانول ۷۰٪ حل شد. در ادامه برای آماده سازی غلظت مطلوب

مداوم از طریق فرایندهای متابولیک بدن تولید می شوند و به لیپیدهای غشایی سلول، پروتئین ها و DNA حمله کرده و منجر به توسعه بیماری های مختلف می شوند (۲،۱). افزایش تولید ROS به وسیله دستگاه های داخلی و منابع خارجی منجر به استرس اکسیداتیو شده که به سلول های اندام های مختلف از جمله کبد صدمه می زند (۴،۳)؛ بنابراین، یک سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی برای خنثی کردن اثرات استرس اکسیداتیو در کبد ضروری است. آنزیم های گلوکوتایون پراکسیداز (GPX (Glutathione peroxidase)، کاتالاز (CAT (Catalase)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD (Superoxide dismutase) و مهم ترین اجزای سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در برابر ROS هستند. CAT، SOD و GPX در کبد برای خنثی کردن رادیکال های سوپراکسید و هیدروکسیل بسیار فعال هستند (۶،۵).

رادیکال های آزاد در واکنش گلیکیشن نیز شرکت می کنند. در این واکنش گروه های آمین پروتئین ها با گروه های کربونیل قندهای احیاکننده واکنش می دهند و از طریق یک سری واکنش های پیچیده در نهایت منجر به تشکیل AEGs (Advanced glycation end products) می شوند (۷). استرس اکسیداتیو منجر به افزایش تولید AEG می شود. مطالعات مختلف نشان داده اند که AEG ارتباط نزدیکی با بیماری دیابت دارد (۹،۸)؛ بنابراین بررسی ترکیبات گیاهی که خواص آنتی اکسیدانی و آنتی گلیکیشنی دارند، در مهار آسیب های زیستی القاء شده توسط استرس اکسیداتیو و درمان بیماری های مختلف موثر است.

هیوسیامین، یک تروپان آلکالوئید دارویی مهم است که توسط بسیاری از گیاهان گونه سولاناسه از جمله Anisodus، Atropa، Datura و Duboisia تولید می شود (۱۰). این ترکیبات به واسطه خواص ضد درد، ضد التهاب، ضد تب، ضد تشنج، ضد اسهال و فعالیت آنتی اکسیدانی شان برای درمان چندین بیماری مورد استفاده

در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیوسامین، میزان فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD و GPX، میزان (Malondialdehyde) MDA و درصد خنثی‌سازی رادیکال DPPH اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت SOD با روش اسپکتروفتومتری همانند روش سان و همکاران اندازه‌گیری شد (۱۷). در این روش، سیستم آنزیم گزانتین-گزانتین اکسیداز برای مهار احیا NBT (Nitro Blue Tetrazolium) استفاده می‌شود. یک واحد از SOD برابر با مقدار آنزیمی است که باعث مهار ۵۰٪ میزان احیا NBT می‌شود. فعالیت SOD به‌عنوان یک واحد آنزیم بر گرم بافت (g/U) بیان می‌شود. برای سنجش میزان فعالیت GPX از روش اصلاح شده گانزله و همکاران استفاده شد (۱۸). مخلوطی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر $MgCl_2$ (غلظت ۱/۵ میلی مولار)، ۲۰۰ میکرولیتر ایزوآسکوربات (غلظت ۹/۹ میلی مولار)، ۲۰۰ میکرولیتر گلوکاتیون (غلظت ۰/۲۵ میلی مولار)، ۱۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (غلظت ۱ میلی مولار)، ۱۵۰ میکرولیتر NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) غلظت ۱/۵ میلی مولار، ۱۵۰ میکرولیتر EDTA (غلظت ۰/۳۶ میلی مولار)، ۱۰۰ میکرولیتر گلوکاتیون ردوکتاز (۰/۲۴ واحد) به ۲۰ میکرولیتر از عصاره بافت اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. میزان جذب آنزیم GPX در طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر U2000 اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم به‌عنوان یک واحد آنزیم بر گرم بافت (g/U) بیان می‌شود. میزان فعالیت CAT نیز با استفاده از روش آیبیز و همکاران اندازه‌گیری شد (۱۹). مخلوط واکنش شامل ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH>۵)، ۵۰ میکرولیتر H_2O_2 و ۱۰ میکرولیتر عصاره بافت بود. واکنش با افزودن عصاره آغاز شد. میزان کاهش H_2O_2 در جذب ۲۴۰ نانومتر مورد

جهت تیمار کردن بافت کبد، محلول اصلی هیوسامین به محلول محیط کشت اضافه شد. محلول محیط کشت و محلول اصلی هیوسامین به‌صورت تازه در آب مقطر حل شدند و از طریق یک فیلتر ۰/۲۲ میکرونی (Gelman, Acrodisc) فیلتر شدند. مقدار اتانول موجود در محلول ۰/۱٪ بود. در آزمایش‌های بعدی مقدار اتانول معادل با آن ارائه شد و هیچ اثر واضحی در پارامترهای بیولوژیکی مشاهده نشد.

برای انجام آزمایش، موش‌ها به‌صورت تصادفی بر اساس جدول اعداد تصادفی به یک گروه کنترل ۷ تایی و ۷ گروه تجربی ۷ تایی تقسیم شدند. موش‌ها کشته شدند و کبد آن‌ها در شرایط استریل برداشته شد. بافت‌های کبد سالم گروه اول به‌عنوان شاهد (کنترل) و بافت‌های کبد گروه‌های دوم تا هشتم که به ترتیب تحت تأثیر غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ میکرومولار هیوسامین قرار می‌گیرند، به‌عنوان گروه‌های تیمار (تحت درمان) در نظر گرفته شدند. لوب کبد دو بار با نرمال سالین سرد شسته شد و سپس به قطعات کوچک تقسیم شد. در ادامه مقدار ۰/۵ گرم از لوب کبد هر نمونه به یک پتری دیش که هر یک حاوی محیط کشت، ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آسپاراژین، آنتی‌بیوتیک (۲۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۲۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر استرپتومایسین) و ۱۰٪ سرم جنین گوساله غیرفعال شده با گرما بود (pH=۷/۴)، اضافه شد. در انتها کشت بافت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه و ۵٪ CO_2) قرار گرفته. غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ میکرومولار از هیوسامین به‌طور جداگانه تهیه شد. نمونه‌های بافت کبد به‌صورت جداگانه با غلظت‌های مختلف هیوسامین تحت تیمار قرار گرفتند. سپس نمونه‌های تیمار به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند و برای مراحل بعدی مطالعه آماده شدند (۱۶-۱۴).

اندازه‌گیری شد (۲۲). مخلوطی که شامل ۱۰۰ میکرولیتر سدیم فومارات و ۱۰۰ میکرولیتر Girard بود، به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره بافت اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. میزان جذب در طول موج ۲۹۴ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. میزان گلی اکسال برحسب میکرومول بیان می‌شود.

هر آزمایش حداقل ۳ بار تکرار شد و داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده است. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و به روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون دانکن انجام شد. ارزش $(P < 0.05)$ برای همه آزمایش‌های آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌ها در دوزهای مختلف در کشت بافت کبد پس از ۲۴ ساعت در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

سنجش قرار گرفت. فعالیت آنزیم به‌عنوان یک واحد آنزیم بر گرم بافت (g/U) بیان می‌شود.

MDA، محصول پر اکسیداسیون لیپیدی است که توسط HPLC مشخص می‌شود و توسط برد و همکاران توصیف شده است (۲۰). میزان آن به صورت میکرومول MDA بر میلی گرم پروتئین بیان می‌شود.

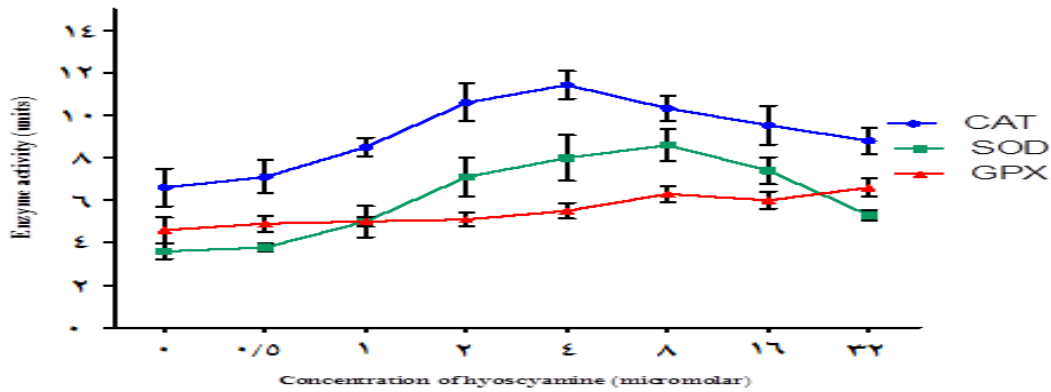
DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که باعث تغییراتی در میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر از طریق جذب الکترون از ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌شود. اثر عصاره‌ها بر رادیکال DPPH با استفاده از روش Brand-Williams برآورد شد (۲۱). به صورت خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از یک مجموعه از غلظت‌های عصاره با ۵۰۰ میکرولیتر از DPPH ۱ میلی مولار مخلوط شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و درصد ختنی‌سازی رادیکال DPPH محاسبه شد. در ادامه، برای سنجش فعالیت آنتی‌گلاکسیکشی هیوسیامین، میزان گلی اکسال با استفاده از روش میشل و همکاران

جدول شماره ۱: میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بافت کبد پس از ۲۴ ساعت تیمار با هیوسیامین

میکرومولار	هیوسیامین / غلظت (units) SOD	(units) GPX	(units) CAT
۰	۳/۸ \pm ۰/۳۷	۴/۶ \pm ۰/۶۱	۶/۶ \pm ۰/۸۸
۰/۵	۳/۳ \pm ۰/۲۱	۴/۹ \pm ۰/۳۷	۷/۱ \pm ۰/۷۸
۱	۵ \pm ۰/۷۳	۵ \pm ۰/۲۴	۸/۵ \pm ۰/۴۳
۲	۷/۱ \pm ۰/۹	۵/۱ \pm ۰/۳۲	۱۰/۶ \pm ۰/۸۹
۴	۸ \pm ۱/۰۸	۵/۵ \pm ۰/۳۷	#۱۱/۴۳ \pm ۰/۶۶
۸	#۸/۶ \pm ۰/۷۷	#۶/۳ \pm ۰/۳۷	۱۰/۳۳ \pm ۰/۵۸
۱۶	۵/۴ \pm ۰/۶۳	۶ \pm ۰/۴	۹/۵۳ \pm ۰/۹۱
۳۲	۲/۳ \pm ۰/۲۵	۶/۶ \pm ۰/۴۵	۸/۸ \pm ۰/۶۱

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده‌اند؛ # غلظتی از هیوسیامین که باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم می‌شود ($P < 0.05$).

تیمار بافت کبد با هیوسيامين در غلظت ۸ میکرومولار پس از تیمار کبد با هیوسيامين در غلظت ۸ میکرومولار میزان فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPX به ترتیب ۱۰/۳۳ و ۸/۶ و ۶/۳ واحد آنزیم بود (نمودار شماره ۱). کنترل به صورت معنی داری افزایش داده است ($P < 0.05$).



نمودار شماره ۱: مقایسه میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بافت کبد پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف هیوسيامين

با افزایش غلظت هیوسيامين تا مقدار ۸ میکرومولار، میزان فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX نیز افزایش می‌یابد. حداکثر میزان فعالیت CAT نیز در غلظت ۴ میکرومولار مشاهده شده است.

قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد توسط DPPH بررسی شد. بالاترین اثر مهاری هیوسيامين در مقایسه با کنترل در غلظت ۴ میکرومولار مشاهده شد. محصولات حاصل از آسیب‌ها یا اکسیداتیو لیپیدها پس از تیمار با غلظت‌های ۰/۵ تا ۳۲ میکرومولار هیوسيامين توسط روش MDA اندازه‌گیری شد (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: سطح پر اکسیداسیون لیپیدی، میزان مهار DPPH و میزان گلی‌اکسال در بافت کبد پس از ۲۴ ساعت تیمار با هیوسيامين

Glyoxal (nmol/mg)	DPPH (nmol/mg)	MDA (nmol/mg)	هیوسيامين / غلظت میکرومولار
۳۱/۵±۰/۹۶	۰/۹۴±۱۱/۴	۲۲/۱۳±۱/۵۱	۰
۲۶/۶±۱/۷	۱۲/۴۶±۰/۷۵	۲۰/۵±۱/۰۶	۰/۵
۲۴±۱/۷۱	۱۷±۰/۹۹	۱۶/۵۳±۰/۶۲	۱
۱۹/۲±۱/۷۱	۱۹/۳±۱/۲	۱/۰۶±۱۳/۲	۲
۱۳/۵±۰/۷۱*	۲۵/۸±۰/۸#	۱۱/۴±۰/۹۸	۴
۱۸±۱/۰۸	۲۱/۴±۱/۲	۱۰/۱±۰/۹۴**	۸
۲۷/۵±۱/۰۵	۱۴±۰/۶۳	۱۷/۲۳±۱/۵۸	۱۶
۳۲/۲±۲/۱۵	۸/۲±۰/۶۱	۲۴±۱/۶۳	۳۲

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند؛ **#: غلظتی از هیوسيامين که باعث کاهش معنی داری در مقدار MDA می‌شود ($P < 0.05$); #: غلظتی از هیوسيامين که باعث تغییرات معنی داری بر جذب ۵۱۷ نانومتر می‌شود ($P < 0.05$); *: غلظتی از هیوسيامين که باعث کاهش معنی داری در مقدار گلی‌اکسال می‌شود ($P < 0.05$).

هیوسیامین باعث می‌شود، سطح پایه گلی اکسال در مقایسه با کنترل به صورت معنی‌داری کاهش یابد ($P < 0.05$). بالاترین اثر مهار هیوسیامین در مقایسه با کنترل در غلظت ۴ میکرومولار مشاهده شد. همچنین در مقایسه بین غلظت‌های مختلف هیوسیامین تفاوت‌های معنی‌داری در کاهش مقدار گلی اکسال مشاهده شد.

بحث:

سلول‌های انسان دو خط دفاعی در برابر رادیکال‌های آزاد دارند. این دو خط دفاعی شامل آنتی‌اکسیدان‌های داخلی و آنزیم‌ها هستند. آنزیم‌های SOD، CAT و GPX اولین خطوط دفاعی سلول‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد هستند (۲۳). آنزیم SOD اثرات سمی آنیون سوپر اکسید را از طریق تبدیل کردن آن به پراکسید هیدروژن کاهش می‌دهد. CAT آنزیم آنتی‌اکسیدان دیگری است که به‌طور گسترده در بافت‌های حیوانی وجود دارد و بالاترین فعالیت را در کبد و گلبول‌های قرمز خون دارد. CAT پراکسید هیدروژن را تجزیه و بافت‌های مختلف بدن را در برابر رادیکال‌های هیدروکسیل محافظت می‌کند. GPX نیز اثرات سمی H_2O_2 را در سلول‌های قرمز خون کاهش می‌دهد (۲۴، ۲۵).

یافته‌های مطالعه ما نشان داد که نه تنها یک سطح پایه از فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPX در بافت کبد وجود دارد، بلکه تیمار کبد با هیوسیامین باعث افزایش قابل‌توجهی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی این آنزیم‌ها می‌شود. پژوهش حاضر، یافته‌های مطالعات دیگر را در بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی هیوسیامین تأیید می‌کند. قربان پور و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند، بیوسنتز آلکالوئیدهایی مانند هیوسیامین در گیاه هیوسیامین‌نایجر به‌واسطه نیتروژن تحت تأثیر قرار می‌گیرد و باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD و GPX می‌شود (۲۶).

علاوه بر این آنزیم‌ها، آزمایش‌های DPPH بر اساس توانایی مهار رادیکال‌های آزاد به‌صورت

گسترده برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی استفاده می‌شود (۲۷). یافته‌های مطالعه ما نشان داد که هیوسیامین توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را دارد. نتایج مطالعه ما همسو با سایر مطالعات بیانگر فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی هیوسیامین می‌باشد (۲۸). Kai و همکاران با استفاده از روش DPPH نشان دادند که آلکالوئیدهایی مانند هیوسیامین در ریشه گیاه *Anisodus acutangulus* (از خانواده سولاناسه) باعث اثرات آنتی‌اکسیدانی این گیاه نسبت به گروه شاهد می‌شود که تأیید کننده مطالعه ما است (۱۳).

با این وجود، فعالیت افزایش یافته این آنزیم‌ها در تحقیق حاضر مشابه با گزارش‌های دیگر نشان می‌دهد که ROS آغازگر فعالیت این آنزیم در کبد، تغییر قابل‌توجهی در فعالیت SOD، CAT و GPX پس از درمان با مواد شیمیایی نشان داده شده است (۲۹). بعضی از اعضای خانواده تروپان آلکالوئیدها مانند آتروپین و کوکائین معمولاً در گیاهان خانواده‌های مختلف یافت می‌شوند. Al-Ashaal و همکاران گزارش کردند که آتروپین، هیوسیامین و اسکوپولامین فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند (۱۲). مطالعه کریمی و ختایی نشان داد که آلومینیوم باعث افزایش بیوسنتز متابولیک‌های ثانویه، مانند هیوسیامین و القای تولید ROS و در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT می‌شود. در مطالعه کریمی و ختایی، اثر غلظت‌های مختلف آلومینیوم در سطح سنتز متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم‌ها اندازه‌گیری شد. کریمی و ختایی نشان دادند که آلومینیوم در غلظت‌های ۲۵ و ۲۲۵ میلی‌مولار باعث می‌شود هیوسیامین به حداکثر سطح خود برسد و در این غلظت‌ها فعالیت مهار SOD و CAT به بیشترین مقدار خود برسد (۳۰). در مطالعه Sivakumar و Panneerselvam فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT پس از درمان با Triadimefon افزایش پیدا کرد (۳۱).

یک مثال دیگر از آسیب‌های رادیکال‌های آزاد اکسیژن، پراکسیداسیون لیپیدی است که می‌تواند

منجر به اختلال در عملکرد کبد شود. برای مشخص کردن این که آیا پر اکسیداسیون لیپیدی توسط ROS ایجاد می شود، ما سطح MDA را اندازه گیری کردیم. تشکیل MDA یکی از قدیمی ترین و رایج ترین آزمون ها برای اندازه گیری پر اکسیداسیون لیپیدی ایجاد شده توسط ROS می باشد. سطح قابل تشخیصی از MDA در سلول های بافت کبد دیده شد. این مشاهده بیانگر این نکته هست که یک سطح پایه ای از آسیب اکسیداسیون لیپیدی در بافت طبیعی کبد وجود دارد. به خصوص، شواهدی وجود دارد که نشان می دهد آسیب بافت کبد پس از مواجهه با ROS، القا کننده پر اکسیداسیون لیپیدی و افزایش شکل گیری MDA است (۳۱،۳۰). Jun و همکاران اثبات کردند که استرس اکسیداتیو ناشی از مواجهه با کمبود اکسیژن متناوب به مدت یک هفته منجر به احتمال افزایش در سطح MDA در بافت کبد می شود (۳۲). در حالی که هیپوکسی متناوب روی سطح MDA در آئورت و قلب تأثیر نمی گذارد. یافته های ما نشان داد که هیوسیامین مقدار MDA را کاهش می دهد. هم راستا با مطالعه ما، مطالعه Liu و همکاران نشان داد که یک آلکالوئید به نام بربرین فعالیت آنزیم SOD را افزایش داده و یون سوپراکسید و مقدار MDA را کاهش می دهد (۳۳).

منجر به اختلال در عملکرد کبد شود. برای مشخص کردن این که آیا پر اکسیداسیون لیپیدی توسط ROS ایجاد می شود، ما سطح MDA را اندازه گیری کردیم. تشکیل MDA یکی از قدیمی ترین و رایج ترین آزمون ها برای اندازه گیری پر اکسیداسیون لیپیدی ایجاد شده توسط ROS می باشد. سطح قابل تشخیصی از MDA در سلول های بافت کبد دیده شد. این مشاهده بیانگر این نکته هست که یک سطح پایه ای از آسیب اکسیداسیون لیپیدی در بافت طبیعی کبد وجود دارد. به خصوص، شواهدی وجود دارد که نشان می دهد آسیب بافت کبد پس از مواجهه با ROS، القا کننده پر اکسیداسیون لیپیدی و افزایش شکل گیری MDA است (۳۱،۳۰). Jun و همکاران اثبات کردند که استرس اکسیداتیو ناشی از مواجهه با کمبود اکسیژن متناوب به مدت یک هفته منجر به احتمال افزایش در سطح MDA در بافت کبد می شود (۳۲). در حالی که هیپوکسی متناوب روی سطح MDA در آئورت و قلب تأثیر نمی گذارد. یافته های ما نشان داد که هیوسیامین مقدار MDA را کاهش می دهد. هم راستا با مطالعه ما، مطالعه Liu و همکاران نشان داد که یک آلکالوئید به نام بربرین فعالیت آنزیم SOD را افزایش داده و یون سوپراکسید و مقدار MDA را کاهش می دهد (۳۳).

علاوه بر این، در این مطالعه ما فعالیت آنتی گلایکیشنی هیوسیامین را نیز بررسی کردیم. گلی اکسال متابولیت فیزیولوژیکی است که در اثر اتو اکسیداسیون آسکوربات، تخریب اکسیداتیو گلوکز و تخریب پروتئین های گلیکوزیله ایجاد می شود. گلی اکسال القاکننده آسیب سلولی است و همچنین باعث افزایش میزان گلایکیشن شده و منجر به تشکیل AGE

نتیجه گیری:

مطالعه حاضر نشان می دهد که هیوسیامین ترکیب فعال زیستی با فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی گلایکیشنی است. هیوسیامین که نوعی آنتی اکسیدان طبیعی است سلول های کبد را در برابر اثرات مخرب رادیکال های آزاد حفاظت می کند و به دلیل داشتن فعالیت آنتی گلایکیشنی ترکیب موثری برای درمان دیابت خواهد بود؛ این یافته به بررسی بیشتری در آینده نیاز دارد.

تشکر و قدردانی:

مطالعه حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد آقای نریمان خسروی فارسانی در دانشگاه خوارزمی با کد ۱۱۳۵ می باشد. از زحمات خانم دکتر زهرا امینی فارسانی که در آنالیز آماری ما را مساعدت کردند، تشکر می نمایم.

منابع:

1. Aprioku JS. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J Reprod Infertil*. 2013; 14(4): 158-72.
2. Kallapura G, Pumford N, Hernandez-Velasco X, Hargisand B, Tellez G. Mechanisms involved in lipopolysaccharide derived ROS and RNS oxidative stress and septic shock. *J Microbiol Res Rev*. 2014; 2(1): 6-11.

3. Simeonova R, Kondeva-Burdina M, Vitcheva V, Mitcheva M. Some *in vitro/ in vivo* chemically-induced experimental models of liver oxidative stress in rats. *Biomed Res Int*. 2014; 70(6): 30-2.
4. Zhu R, Wang Y, Zhang L, Guo Q. Oxidative stress and liver disease. *Hepato Res*. 2012; 42(8): 741-9.
5. Garba A, Mada SB, Ibrahim G, Abarshi MM. Hepatoprotective effect of ethyl acetate extract of vitex doniana stem bark on Carbon Tetrachloride (CCl₄) induced liver damage in Wistar rats. *Am J Biochem and Molecul Biol*. 2014; 4(1): 35-41.
6. El-Bahr SM, El-Deeb WM. Acute-phase proteins, oxidative stress biomarkers, proinflammatory cytokines, and cardiac troponin in Arabian mares affected with pyometra. *Theriogenology*. 2016; 86(4): 1132-6.
7. Deetae P, Parichanon P, Trakunleewatthana P, Chanseetis C, Lertsiri S. Antioxidant and anti-glycation properties of Thai herbal teas in comparison with conventional teas. *Food Chem*. 2012; 133(3): 953-9.
8. Prasad A, Bekker P, Tsimikas S. Advanced glycation end products and diabetic cardiovascular disease. *Cardiol Rev*. 2012; 20(4): 177-83.
9. Hanssen NM, Beulens JW, Van Dieren S, Scheijen JL, Van der AD, Spijkerman AM, et al. Plasma advanced glycation end products are associated with incident cardiovascular events in individuals with type 2 diabetes: A case-cohort study with a median follow-up of 10 years (EPIC-NL). *Diabetes*. 2015; 64(1): 257-65.
10. Bedewitz MA, Gongora-Castillo E, Uebler JB, Gonzales-Vigil E, Wiegert-Rininger KE, Childs KL, et al. A root-expressed L-phenylalanine:4-hydroxyphenylpyruvate aminotransferase is required for tropane alkaloid biosynthesis in *Atropa belladonna*. *Plant Cell*. 2014; 26(9): 3745-62.
11. Alizadeh A, Moshiri M, Alizadeh J, Balali-Mood M. Black henbane and its toxicity: A descriptive review. *Avicenna J Phytomed*. 2014; 4(5): 297-311.
12. Al-Ashaal HA, Aboutabl ME, Maklad YA, El-Beih AA. Tropane alkaloids of *Atropa belladonna* L.: *In vitro* production and pharmacological profile. *Eur Phys J*. 2013; 12(2): 130-5.
13. Kai G, Yang S, Luo X, Zhou W, Fu X, Zhang A, et al. Co-expression of AaPMT and AaTRI effectively enhances the yields of tropane alkaloids in *Anisodus acutangulus* hairy roots. *BMC Biotechnol*. 2011; 11: 43.
14. Boojar MM, Goodarzi F. Oxidative response of rat lung tissue after crown ethers exposure and the effects of alpha-tocopherol treatment. *Clin Chim Acta*. 2006; 370(1-2): 158-64.
15. Khosravi-Farsani N, Boojar MMA, Amini-Farsani Z, Heydari S, Teimori H. Antioxidant and antiglycation effects of scopolamine in rat liver cells. *Der Pharmacia Lettre*. 2016; 8(1): 169-74.
16. Haripyaee A, Guneshwor K, Damayanti M. Evaluation of antioxidant properties of phenolics extracted from *Ananas comosus* L. *Not Sci Biol*. 2010; 2(2): 68-71.
17. Yapca OE, Turan MI, Borekci B, Akcay F, Suleyman H. Bilateral ovarian ischemia/reperfusion injury and treatment options in rats with an induced model of diabetes. *Iran J Basic Med Sci*. 2014; 17(4): 294-302.
18. Al-Enazi MM. Combined therapy of rutin and Silymarin has more protective effects on streptozotocin-induced oxidative stress in rats. 2014.
19. Jaydari F, Johari H, Taati M, Asadian P, Alirezaei M, Sheikhzadeh F. The effects of fruit extract on catalase activity and lipid peroxidation in the heart and erythrocytes of rats following chronic ethanol consumption *Ziziphus jujuba*. *Int J Vet Sci Med*. 2011;5(3):179-83.

20. Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova*. 2009; 32(1): 169-74.
21. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 2011; 48(4): 412-22.
22. Hall BS, Wilkinson SR. Activation of benzimidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(1): 115-23.
23. Singh R, Kumar S, Rana A, Sharma N. Different models of hepatotoxicity and related liver diseases: A review. *Int Res J Pharm*. 2012; 3(7): 86-95.
24. Noori S. An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Open access Sci Rep*. 2012; 1(8): 1-9.
25. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012; 5(1): 9.
26. Ghorbanpour M, Ghafarzadegan R, Hatami M. Seed alkaloids content and antioxidant enzymes activity in black henbane as influenced by ammonium nitrate application and water deficit stress. *J Med Plants*. 2014; 1(49): 75-86.
27. Boutennouna H, Boussoufa L, Rawashdeh A, Al-Qaoud K, Abdelhafez S, Kebieche M, et al. *In vitro* cytotoxic and antioxidant activities of phenolic components of algerian *Achillea odorata* leaves. *Arab J Chem*. 2014; 5(13): 1-7.
28. Kumar DJ, Santhi RJ. Antioxidant and cytotoxic effects of hexane extract of *Morinda pubescens* leaves in human liver cancer cell line. *Asian Pac J Trop Dis*. 2012; 5(5): 362-6.
29. Boojar MMA, Farahi MH. The role of antioxidative enzymes in copper tolerance strategy of *Mimosaceae prosopis farcta* growing in a copper mine. *Int J Plant Biol*. 2011; 2(6): 1.
30. Karimi F, Khataee E. Aluminum elicits tropane alkaloid production and antioxidant system activity in micropropagated *Datura innoxia* plantlets. *Acta Physiol Plant*. 2012; 34(3): 1035-41.
31. Sivakumar T, Panneerselvam R. Salinity induced changes in photosynthetic pigment and antioxidant responses in *Sesuvium portulacastrum*. *Pak J Biol Sci*. 2011; 14(21): 967.
32. Jun J, Savransky V, Nanayakkara A, Bevans S, Li J, Smith PL, et al. Intermittent hypoxia has organ-specific effects on oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 295(4): R1274-R81.
33. Liu W-h, Hei Z-q, Nie H, Tang F-t, Huang H-q, Li X-j, et al. Berberine ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats by suppression of both oxidative stress and aldose reductase. *Chin Medical J*. 2008; 121(8): 706-12.

The study of hyoscyamine in oxidative stress of liver cells in male rat

Khosravi Farsani N¹, Mashhadi Akbar Boojar M¹, Teimori H^{2*}, Amini-Farsani Z³,
Gholami D², Sajadpoor Z²

¹Biology Dept., University of Kharazmi, Tehran, I.R. Iran; ²Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ³Young Researchers and Elites Club, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 16/Apr/2016

Accepted: 21/Oct/2016

Background and aims: Increased production of free radicals by endogenous systems and exogenous sources in cells leads to oxidative stress, which damages to the cells of various organs. Hyoscyamine is one of the important tropane alkaloid isolated from some Solanaceous species used to traditional medicine that they are used for their analgesic, anti-inflammatory, antipyretic, and anticonvulsant activities. The antioxidant and antiglycation properties of tropane alkaloids may represent a role in dealing with oxidative stress. The aim of this study was to investigate the antioxidant and antiglycation effects of hyoscyamine component on the liver cells in male rats.

Methods: In this experimental- laboratory study, liver cells were isolated from male Sprague–Dawley rats. The cells cultured under standard conditions. Various concentrations of hyoscyamine (0-32 μ M) were treated on rat liver cells. Then, the activity of glutathione peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) as well as glyoxal and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) inhibition were measured by spectrophotometry. High-performance liquid chromatography (HPLC) was performed for measuring malondialdehyde (MDA) in liver cells.

Results: CAT, SOD and GPX enzyme activities increased as the concentration of hyoscyamine increased. DPPH showed a strong inhibition on reactive oxygen species generation compared to control group. The amount of SOD, CAT and GPX enzyme activities in 8 micromolar concentration of hyoscyamine compared with the control group significantly increased as 10.33 and 8.6 and 6.3 units ($P < 0.05$). Also, hyoscyamine (4 μ M) reduced the amount of MDA, glyoxylate and DPPH compared to the control group as 1.94, 2.26, and 2.33 times ($P < 0.05$).

Conclusion: Our findings indicated that hyoscyamine had considerable antioxidant and antiglycation activities on rat liver cells. This compound protects liver cells against the damaging effects of free radicals. The effects of this compound for the treatment of diseases associated with oxidative stress would be useful in the future.

Keywords: Hyoscyamine, Oxidative stress, Liver cells, Rat.

Cite this article as: Khosravi Farsani N, Mashhadi Akbar Boojar M, Teimori H, Amini-Farsani Z, Gholami D, Sajadpoor Z. The study of hyoscyamine in oxidative stress of liver cells in male rat. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 19(4): 35-44.

***Corresponding author:**

Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00989133054781, E-mail: hosseintimm@yahoo.com