کومش- جلد 23، شماره 6 (پیاپی 86)، آذر و دی 1400

بررسی اثرات عصاره متانلی گیاه *Epilobium parviflorum* بر رشد و عملکرد سلول‌های کبد انسانی HepG2

الهه رودسرابی [1](M.Sc Student)، سکینه کاظمی نورعینی [*2](Ph.D)، حسن فریدنوری [1](Ph.D)، محمدرضا واعظی کاخکی [2](Ph.D)

1- *گروه سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان ، دامغان، ایران*

2- *گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران*

* نویسنده مسئول، تلفن: 09155725818 kazemibio@gmail.com

تاریخ دریافت: 1399/10/27 تاریخ پذیرش: 1400/3/9

چکیده

هدف: عصاره‌های بید علفی پونه‌ای *(Epilobium parviflorum)* ترکیبات آنتی‌اکسیدانت قوی دارد و رشد انواع معدودی سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند. هدف این مطالعه بررسی عصاره‌های این گیاه بر رشد سلول‌های کبدی HepG2 و نیز در شرایط تنش اکسیداتیو بود.

مواد و روش‌ها: عصاره‌ی متانلی بخش‌های مختلف گیاه جداگانه تهیه شد. زنده‌مانی سلول‌ها پس از تیمار 48 ساعته با عصاره‌ها و به دنبال آن با یا بدون تیمار با H2O2، به روش MTT ارزیابی گردید. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها و فعالیت ترانس آمینازها، سوپر اکسید دیسموتاز و لیپید پراکسیداز در سلول‌های تیمار شده سنجش شد.

یافته‌ها: نه تنها هیچ‌یک از عصاره‌ها سمیتی بر سلول‌های HepG2 نداشتند، بلکه زنده‌مانی سلول‌ها در تیمار با عصاره‌های بخش‌های هوایی و ریشه افزایش معناداری نشان داد ($P=0/006$). در مدل تنش اکسیداتیو، زنده‌مانی سلول‌های پیش تیمار شده با عصاره‌ها و به ویژه عصاره بخش‌های هوایی افزایش معنی‌دار داشت ($P\leq0/05$). پیش تیمار با این عصاره در سلول‌های تحت تنش به‌طور وابسته به غلظت باعث کاهش MDA و فعالیت آنزیم‌های ALT و AST درون سلولی و افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در مقایسه با کنترل شد ($P\leq0/05$). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها قابل مقایسه با ترولوکس برآورد شد.

نتیجه‌گیری: عصاره متانلی *Epilobium parviflorum* بر سلول‌های HepG2 سمیت ندارد و احتمالاً می‌تواند سلول‌های کبدی انسان را در برابر تنش‌های اکسیداتیو محافظت کند. لذا می‌تواند پیشنهاد ارزشمندی برای پیشگیری از آسیب‌های کبدی باشد.

واژه‌های کلیدی: *Epilobium*، استرس اکسیداتیو، زنده ماندن سلول، مرگ سلول، کبد، پراکسیداسیون لیپید، آنتی‌اکسیدان، سلول‌های HepG2

مقدمه

کبد به عنوان مهم‌ترین بافت در متابولیسم طبیعی و نیز متابولیسم ثانوی انواع زنوبیوتیک‌ها و از جمله داروها بیش‌ترین تنش اکسیداتیو و آسیب‌های بافتی را متحمل می‌شود که می‌تواند زمینه‌ساز سرطانی شدن باشد. سرطان رشد کنترل نشده سلول‌های غیرعادی در بدن است که با وجود تلاش‌های گسترده برای شناخت و غلبه بر آن، هم‌چنان از مهلک‌ترین بیماری‌ها در جهان به شمار می‌رود. با توجه به افزایش آمار مرگ و میر ناشی از سرطان، پیشگیری و تشخیص زود هنگام استراتژی‌های مهمی در مدیریت آن است [1]. بر اساس گزارش آمار منتشر شده در سال 2020 سرطان کبد هفتمین سرطان شایع در جهان و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان در جهان می‌باشد [2]. معمول‌ترین و شایع‌ترین نوع آن هپاتوسلولار کارسینوما است که تقریباً 75% سرطان‌های کبد را در بر می‌گیرد [3]. سلول‌های سرطانی به دلیل شرایط هیپوکسی، جهش ژن‌های هسته‌ای و میتوکندریایی، فعال شدن انکوژن‌ها و از دست رفتن فعالیت ژن‌های سرکوبگر تومور نسبت به سلول‌های سالم گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) بیش‌تری تولید می‌کنند و در معرض استرس اکسیداتیو قرار دارند [4]. از پاسخ‌های فیزیولوژیک طبیعی به این نوع تنش می‌توان به افزایش محصولات حاصل از واکنش‌های با واسطه‌ی ROS در خون و ادرار و افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اشاره نمود [5]. در سلول‌های سرطانی افزایش میزان ROS نتیجه‌ی افزایش فعالیت متابولیک، نقص عملکرد میتوکندری، فعالیت پراکسی زوم‌ها، افزایش سیگنالینگ به واسطه‌ی رسپتور، فعال شدن انکوژن‌ها، افزایش فعالیت اکسیدازها، سیکلو اکسیژنازها، لیپواکسیژنازها و

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

تیمیدین فسفریلازها می‌باشد. استرس اکسیداتیو با تأثیر بر مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز در تنظیم آن نقش مهمی دارد افزایش ROSبا تاثیر بر سیتوکروم C و فعال شدن کاسپاز منجر به مرگ سلولی می‌شود [6]. متعاقب پیام‌های آپوپتوتیک، رهایش پراکسید هیدروژن منجر به فعال شدنJNKs و در نهایت کاهش بیان پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیکBcl2 و Bcl-XL می‌شود [7]. مواد آنتی‌اکسیدانت می‌توانند از آسیب اکسیداتیو به مولکول هدف جلوگیری کرده و یا آن را به تاخیر بیندازند. سلول‌های انسانی دارای سیستم دفاعی محافظ در برابر رادیکال‌های آزاد مانند آنزیم سوپراکساید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز، ویتامین A و E و فلزاتی چون سلنیم و روی است [8-10]. در شرایطی مانند نقص در تولید آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن و یا به خاطر عوامل و موقعیت‌های فیزیوپاتولوژیک (از قبیل سیگار کشیدن، آلودگی هوا، تابش UV، رژیم‌های حاوی اسید چرب اشباع نشده بالا، التهاب، خونریزی و....) که در آن‌ها ROSبه مقدار فراوان در مکان و زمان اشتباهی تولید می‌شوند، دریافت مقادیر مناسب آنتی‌اکسیدان برای مقابله با اثرات تجمعی آسیب‌های اکسیداتیو ضروری است. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد افراد دارای رژیم غذایی حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، کم‌تر در معرض خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی - عروقی و انواع سرطان هستند [10،12].

گیاهان در درمان سرطان سابقه‌ای طولانی داشته و برخی منابع مهم و غنی از ترکیبات موثر ضد سرطان می‌باشند. در حال حاضر بیش از 60% از عوامل ضد سرطان مورد استفاده، به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم از طبیعت مشتق شده‌اند [13]. گیاهان جنس *Epilobium (Onagraceae)* شامل بیش از 200 گونه در دنیا هستند و در ایران 20 گونه از آن وجود دارد [14]. مواد زیستی فعال موجود در گونه‌های *Epilobium* شامل فلاونوئیدها و به ویژه میریستین، کوئرستین و کومپفرول – توکوفرول گلیکوزید (رامنوزید، گلوکورونید، هگزوزید، پنتوزید و غیره)، اسید چرب (اسید گالیک-اسید پالمیتیک اسید فنولیک اسیداستئاریک-اسید اولئیک و اسید لینولئیک)، الاژی تانن‌ها، مشتقات-β سیتوسترول، تری‌ترپن‌ها، ویتامین‌ها و ترکیبات فرار هستند [15-17]. از تانن‌های مهم در جنس*Epilobium* ، تانن‌های اونتئین B و (Oenothein B, A) A می‌باشند [18].

از اثرات فارماکولوژیک شناخته شده آن‌ها می‌توان به استفاده برخی از گونه‌های *Epilobium* در طب سنتی به ویژه استفاده از گونه *E. angustifolium* برای درمان هایپرپلازی خوش‌خیم سرطان پروستات (BPH) اشاره نمود که به واسطه فعالیت آنتی‌آندروژنیک، اثر ضد التهابی و مهار آروماتاز و نوع 2 ایزوآنزیم α-5 ردوکتاز است [19]. عصاره‌های آبی *E. angustifolium* و *E. parviflorum* به صورت وابسته به غلظت، آزاد شدن 6-کتو پروستاگلاندین F1α، PGE2 و PGD2 در شرایط آزمایشگاهی را کاهش می‌دهد [20،۲۱]. عصاره استونی و عصاره اتانولی *E. parviflorum* در in vitro با مهار آنزیم‌های COX-1 و COX-2 باعث سرکوب سنتز پروستاگلاندین E2 می‌شوند [14،22]. هم‌چنین با مهار لیپواکسیژناز منجر به کاهش قابل توجهی در انتشار LTB4 می‌گردند [23].

مرور مطالعات دیگران نشان می‌دهد که عصاره اتانولی *E. parviflorum* قابلیت خوبی در حذف رادیکال‌های آزاد را دارد، در حالی که عصاره متانولی آن فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به سایر عصاره‌های حاصل از*E. angustifolium* ، *E. montanum*، *E. tetragonum* و*E. roseum* دارد [22]. این فعالیت‌ها معمولاً با آنتی‌اکسیدان‌های رایج ترولوکس و اسید اسکوربیک قابل مقایسه بوده‌اند [14]. عصاره استون-آبی گیاه *E. parviflorum*پراکسیداسیون لیپید ناشی از پراکسید هیدروژن را مهار کرده و از سلول‌های فیبروبلاست انسانی محافظت می‌کند، به‌طوری‌که گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) توسط عصاره‌های آبی *E. parviflorum*، *E. angustifolium* و *E. hirsutum*به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد [24]. هم‌چنین انتشار میلو پراکسیداز از نوتروفیل‌های تحریک شده مهار می‌شود. تانن اصلی موجود در این گیاهان به نام اونتئین B (OeB)مهم‌ترین نقش در فعالیت‌های فوق را داشته است [23،25]. هم‌چنین عصاره آبی *E. parviflorum* آنزیم α-5 ردوکتاز را مهار می‌کند [26].

اثرات ضدسرطانی عصاره‌های گیاه بید علفی پونه‌ای هنوز چندان شناخته شده نیست. مهم‌ترین داده‌های موجود حاکی از اثرات مفید آن در مهار هایپرتروفی پروستات است که در عمل نیز تجویز می‌گردد [27]. بررسی‌های اخیر نشان‌دهنده اثرات مهاری رشد عصاره‌های متانلی این گیاه بر سلول‌های سرطانی پستان MCF7 است در حالی‌که سمیت چندانی در سلول‌های HEK293 مشاهده نشده است [28]. در جست‌وجوی داده‌های موجود در اینترنت و به‌ویژه PubMed و ScienceDirect هیچ گزارشی برای اثرات زیستی این گیاه بر سلول‌های کبدی یافت نشد. هدف از این پژوهش بررسی تاثیر عصاره‌های متانلی بخش‌های مختلف گیاه بید علفی پونه‌ای بر رشد سلول‌های کبد انسانی HepG2 و اثرات احتمالی آن‌ها در محافظت سلول‌ها در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از پراکسیدهیدروژن بوده است.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره‌ی گیاهی. بعد از شناسایی سیستماتیک گیاه*Epilobium* parviflorum بید علفی پونه‌ای، گل و بخش‌های هوایی در اوایل ماه اردیبهشت و ریشه گیاه در اوایل ماه شهریور سال 1388 از ناحیه بوژان نیشابور (58/96، 36/24) جمع‌آوری شد. قسمت‌های مختلف گیاه بید علفی را با آب شسته شده و در سایه و مجاورت هوا خشک شدند. با توجه به این‌که متانل ظرفیت بالایی در استخراج انواع متابولیت‌های ثانوی قطبی و غیر قطبی دارد، در عصاره‌گیری از محلول متانل 80% استفاده شد. میزان 5 گرم پودر قسمت‌های مختلف گیاه (ریشه، بخش‌های هوایی و برگ، گل) هر یک به‌طور جداگانه در ارلن حاوی 100 میلی‌لیتر حلال اضافه شد و پس از بستن ظرف به مدت 24 ساعت در دمای اتاق روی شیکر هم زده شد. مایع حاصل پس از گذراندن از کاغذ صافی به کمک روتاری (مدل Heidolph آلمان) تغلیظ شده و به مدت 24 ساعت در دمای 40 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا عصاره کاملاً خشک به‌دست آمد. عصاره‌های خشک تا زمان استفاده در فریز 20- نگهداری شدند [29].

از آن‌جا که این پژوهش تنها به مطالعه بیوشیمیایی و پیامدهای سلولی تیمار با عصاره‌ها در *in vitro* پرداخته است، نیازی به گرفتن مجوز از کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیستی نبود.

کشت سلول. سلول‌های کبد انسان رده‌ی HepG2 (ATCC HB-8065) از بانک سلولی پژوهشکده‌ی فناوری زیستی دانشگاه فردوسی خریداری و در این مطالعه استفاده شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) حاوی 10% FBS (Fetal Bovine Serum) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (100UI/ml) و استرپتومایسین (100µg/ml) در فلاسک (T25) کشت داده شده و در انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی‌گراد 5% CO2 نگهداری شدند. شمارش سلولی و تخمین تعداد سلول‌های زنده با لام نئوبار با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو انجام شد [30]. سلول‌ها هر 3 تا 4 روز یک‌بار پس از رسیدن به تراکم 80 تا 90% به کمک محلول تریپسین-EDTA (0/25% تریپسین و 0/05% EDTA) از کف فلاسک جدا شده و برای انجام تست‌ها استفاده شدند. لازم به ذکر است تمام آزمایشات سلولی در این پژوهش حداقل با سه بار تکرار مستقل انجام شده است و در هر تکرار حداقل 3 چاهک برای هر غلظت از عصاره‌ها مورد سنجش قرار گرفته است.

سنجش میزان زنده‌مانی سلول‌های HepG2 تحت تیمار با عصاره متانلی ریشه، بخش‌های هوایی و گل. به منظور بررسی اثرات کشندگی عصاره‌های متانلی گیاه *E. parviflorum* از آزمون متیل تیازولیل ترازولیوم برماید (MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد. این سنجش یک روش رنگ‌سنجی کمی بر پایه‌ی احیای آنزیمی محلول زرد رنگ MTT به وسیله‌ی آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی و تشکیل کریستال‌های ارغوانی رنگ و نامحلول در آب، فورمازان می‌باشد که تنها در سلول‌های زنده روی می‌دهد. میزان تولید بلورهای فورمازان پس از حل شدن در حلال آلی دی متیل سولفوکساید(DMSO: Dimethyl sulfoxide) به کمک قرائت جذب آن قابل سنجش است و بیانگر میزان سلول‌های زنده می‌باشد [31]. بدین منظور سلول‌های HepG2 در تراکم 9×103 سلول در هر چاهک، در پلیت 96 خانه کشت داده شدند. پس از 24 ساعت محیط جدید حاوی غلظت‌های متفاوت (0، 31/25، 62/5، 125، 250، 500، 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره متانلی ریشه، بخش‌های هوایی یا گل اضافه شد. بعد از 48 یا 72 ساعت تیمار به مدت 4 ساعت با MTT در غلظت نهایی 0/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انکوبه شد. با افزودن 100 میکرولیتر DMSO کریستال‌های نامحلول فورمازان حل گردیده و پس از 10 دقیقه شیک شدن میزان جذب نوری چاهک‌ها در طول موج 570 نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (BioTek Powerwave/USA) قرائت شد. درصد سلول‌های زنده با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد. لازم به ذکر است هر غلظت از عصاره متانلی در 4 چاهک تکرار شده، و هر آزمایش با سه بار تکرار مستقل انجام شد.

"درصد سلول‌های زنده= [(سلول‌های تیمارشده OD-بلانک OD)/ (سلول‌های کنترل OD-بلانک OD)]×100"

سنجش میزان زنده‌مانی سلول‌های HepG2 تحت استرس اکسیداتیو با H_2O_2. به منظور بررسی اثر استرس اکسیداتیو بر سلول‌های HepG2 نیز از تست رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. به این منظور سلول‌های HepG2 مانند روش قبل در چاهک‌های پلیت 96 خانه کشت داده شدند و پس از 48 سلول‌ها تحت تنش اکسیداتیو با افزودن پراکسید هیدروژن تازه تهیه شده (در PBS و با استفاده از آب اکسیژنه غلیظ (30%)) با غلظت‌های نهایی (0، 0/15، 0/31، 0/62، 1/25، 2/5، 5 میلی‌مولار) به مدت سه ساعت قرار گرفتند. درصد زنده‌مانی سلول‌ها به روش MTT ذکر شده در قسمت قبل محاسبه شد.

سنجش اثر حفاظتی و آنتی‌اکسیدانی عصاره متانلی ریشه، بخش‌های هوایی و گل در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از H2O2 بر سلول‌های HepG2. برای ارزیابی اثرات محافظتی عصاره‌ها در برابر سمیت ناشی از پراکسید هیدروژن ابتدا

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

سلول‌ها در پلیت 96 خانه به شیوه فوق‌الذکر کشت داده شدند و به مدت 48 ساعت با غلظت‌های مختلف هر یک از عصاره‌های متانلی ریشه، بخش‌های هوایی و گل تیمار شدند. سپس برای القای استرس اکسیداتیو به محیط10میکرولیتر پراکسید هیدروژن تازه تهیه شده در غلظت نهایی 1/25 میلی‌مولار اضافه و به مدت 3 ساعت دیگر انکوبه شدند. سپس درصد زنده‌مانی سلول‌ها به روش MTT شرح داده شده در بالا مورد ارزیابی قرار گرفت [32].

سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با روش کاتیون‌زدایی رادیکال ABTS. در روش (Trolox equivalent antioxidant capacity) TEAC برای تهیه رادیکال ABTS ابتدا یک محلول آبی از ABTS به غلظت 7 میلی‌مولار تهیه شد. به این محلول ABTS، پتاسیم پرسولفات در غلظت نهایی 2/45 میلی‌مولار اضافه شد. محلول حاصل در شرایط دمای اتاق و تاریکی به مدت 24 ساعت قرار داده شد. در این مدت از مولکول ABTS، رادیکال کاتیون ABTS تولید می‌شود. سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی در حضور چهار غلظت متفاوت (2/5، 0/25، 0/025 و 0/0025 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) هر یک از عصاره‌ها بررسی شد. مقدار 5 میکرولیتر از نمونه‌ها یا استاندارد Trolox (کنترل مثبت) با 95 میکرولیتر معرف رادیکال ABTS مخلوط گردید و بعد از ده دقیقه جذب در طول موج 734 نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد با استفاده از نرم‌افزارهای آماری مثل اکسل، نمودار استاندارد را با توجه به اعداد به دست آمده از دستگاه میکروپلیت ریدر، نمودار میزان جذب نمونه‌های استاندارد را در برابر غلظت آن‌ها رسم و با استفاده از داده‌های جذب مربوط به نمونه‌های مجهول محاسبات انجام شد [۳۳،۳۴]. آزمایش با سه بار تکرار مستقل انجام شد.

$$\text{درصد مهار}\% = [(OD_{blank}-OD_{drug})/OD_{blank}] \times 100$$

سنجش غلظت پروتئین سیتوزولی با استفاده از روش برادفورد. برای انجام سنجش‌های مختلف از جمله MDA و GSH لازم بود غلظت پروتئین موجود در هر نمونه محاسبه گردد، لذا سنجش پروتئین به روش میکرو برادفورد انجام شد. حدود 5 میکرولیتر از غلظت‌های مختلف BSA (0-10میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، عصاره گل، بخش هوایی و ریشه به همراه 95 میکرولیتر آب مقطر تهیه شد و مقدار 1000 میکرولیتر از واکنشگر برادفورد به هر غلظت اضافه شد. پس از ورتکس و انتقال مقادیر 150 میکرولیتری (در تکرار سه تایی برای هر نمونه) به پلیت 96 خانه، جذب در 595 نانومتر اندازه‌گیری و میانگین محاسبه شد [35].

سنجش فعالیت ترانس آمینازها (AST و ALT). در پی آسیب‌های مختلف بافت کبدی مقادیر آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) افزایش می‌یابد [36]. هم‌چنین آسیب‌های سلول‌ها کبدی باعث انتشار آن‌ها به خارج سلول می‌گردد. در این مطالعه سلول‌های HepG2 حدود 5×10^4 در پلیت 12 خانه کشت داده شدند و با غلظت‌های متفاوت عصاره‌ی متانلی بخش‌های هوایی 31/25 و 250 میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت 48 ساعت تیمار شدند. سپس به مدت 3 ساعت تحت تنش با پراکسید هیدروژن 1/25 میلی‌مولار قرار گرفتند. محیط کشت سلول‌ها و نیز پس از جدا کردن سلول‌ها از کف پلیت و شست‌وشو با PBS مورد سنجش آنزیم‌های ALT و AST با استفاده از کیت‌های آنزیمی تجاری شرکت پارس آزمون طبق دستور شرکت قرار گرفت [37].

سنجش پراکسیداسیون لیپیدی (MDA). سنجش مالون دی آلدئید (Malon di aldehyde) MDA یکی از رایج‌ترین سنجش‌ها برای ارزیابی تنش اکسیداتیو است. این ماده در حضور تیو باربیتوریک اسید (TBA) کمپلکسی به شکل (TBA-MDA-TBA) تشکیل می‌دهد که اساس سنجش آن را پایه‌ریزی می‌کند [38]. برای بررسی تاثیر عصاره‌ها بر میزان تولید مالون دی آلدهید در سلول‌های HepG2 تحت تنش اکسیداتیو، ابتدا سلول‌ها با تراکم حدود 105 سلول در هر چاهک از پلیت 6 خانه کشت داده شدند. روز بعد سلول‌ها با غلظت‌های 0، 31/25 و250 میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره‌ی متانلی بخش‌های هوایی به مدت 48 ساعت تیمار شدند. سپس به مدت 3 ساعت در معرض پراکسیدهیدروژن 1/25 میلی‌مولار قرار گرفتند. پس از جداکردن سلول‌ها از کف پلیت مقدار 500 میکرولیتر بافر لیز (شرکت پارس‌آزمون) اضافه شد. پس از 10 دقیقه در مجاورت یخ ورتکس شدند. نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ به مدت 3 دقیقه در 12000 دور و دمای 4 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. از مایع رویی برای انجام تست برادفورد و MDA استفاده شد. مقدار 300 میکرولیتر از محلول تازه تهیه شده‌ی MDA (شامل 1/5 میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید (TBA) 0/8% و 1/5 میلی‌لیتر اسید استیک 20% به همراه 0/2 میلی‌لیتر SDS 8/1% همراه با 0/1 میلی‌لیتر BHT 0/76% در متانل و 0/2 میلی‌لیتر آب دیونیزه)، 50 میکرولیتر نمونه‌ی سلولی و 100 میکرولیتر آب دیونیزه یا 150 میکرولیتر استاندارد (تترامتوکسی پروپان TMP) به میکروتیوپ‌های 1/5 میلی‌مولار اضافه شد و به مدت 45 دقیقه در دمای جوش (95 درجه سانتی‌گراد) درون بن‌ماری قرار گرفتند. پس از سانتریفیوژ با دور 3000 به مدت 15 دقیقه، مایع رویی از میکروتیوپ‌ها جمع‌آوری شده و میزان جذب در طول موج نوری 532 نانومتر

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

با کمک دستگاه میکروپلیت ریدر سنجیده شد. مقدار جذب به‌دست آمده با استفاده از ضریب مولی به عنوان مالون دی آلدهید تشکیل شده و بر حسب میکرو مول مالون دی آلدئید در میلی‌گرم پروتئین به دست آمد [39،38].

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (GPX و SOD). برای بررسی اثر عصاره‌ی متانلی گیاه بید علفی پونه‌ای بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در سلول‌های HepG2 ابتدا سلول‌ها در پلیت 6 خانه با تراکم سلولی 105 در هر چاهک کشت داده شدند. بعد از 24 ساعت سلول‌های HepG2 با غلظت‌های متفاوت 31/25، 250 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانلی بخش‌های هوایی به مدت 48 ساعت تیمار و سپس به مدت 3 ساعت با پراکسیدهیدروژن 1/25 میلی‌مولار تنش اکسیداتیو داده شدند [40]. پس از جمع‌آوری سلول‌ها از کف پلیت و سطح داخل سلولی GSH با استفاده از کیت شرکت آرسام فرازیست طبق دستورالعمل سازنده اندازه‌گیری شد محتوای پروتئین با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد [41]. برای سنجش SOD از کیت شرکت نوند سلامت و روش پشنهادی شرکت استفاده گردید.

تحلیل آماری. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه 21 (SPSS Inc, ILm USA) انجام شد و نتایج به دست آمده توسط با استفاده از تست کلموگروف اسمیر نوف نرمال بودن داده‌ها بررسی شد و در آخر از آزمون ناپارامتریک Kruskal Walis نرم‌افزر Graphpad Prism 8.4.3 ، p value محاسبه و گراف‌ها رسم گردید. همچنین تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد، میانگین خطاهای استاندارد محاسبه و $P<0/05$ از نظر آماری معنی‌دار تلقی شد.

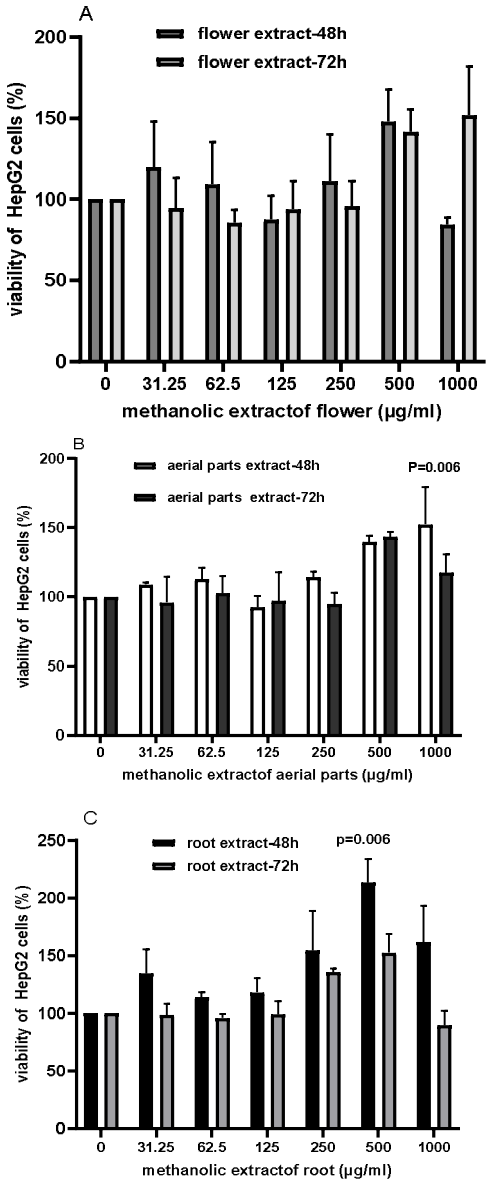
نتایج

تاثیر عصاره‌ی گیاهی بر زنده‌مانی سلول‌های HepG2

قابلیت زنده ماندن سلول به عنوان شاخصی در نظر گرفته می‌شود که به‌طور غیرمستقیم سمیت سلولی ترکیبات مختلف را با آن ارزیابی می‌کنند. ابتدا سیمت عصاره متانلی بید علفی پونه‌ای بر روی سلول‌های HepG2 با روش رنگ‌سنجی متیل تیازولیل تترازولیوم (MTT) مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در (شکل 1) نشان داده شده است، هیچ یک از تیمارهای 48 و 72ساعته عصاره‌ی متانلی گل و تیمارهای 72 ساعته عصاره‌های متانلی ریشه و بخش‌های هوایی در غلظت‌های مورد مطالعه (تا1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر) تاثیر معناداری بر زنده‌مانی سلول‌های HepG2 نداشت ($P\geq0/05$). تیمار 48 ساعته دو عصاره متانلی بخش‌های هوایی و ریشه گیاه بید علفی پونه‌ای نه تنها اسمیتی بر سلول‌های HepG2 نداشتند، بلکه در غلظت‌های بالاتر شاهد افزایش معناداری در زنده‌مانی سلول‌ها بودیم ($P\leq0/05$) $P=0/006$. میانگین رشد سلول‌ها در تیمار 48 ساعته با عصاره‌ی متانلی ریشه در غلظت‌های مختلف تا 500 میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور وابسته به غلظت افزایش می‌یابد. روند افزایش نسبی رشد سلول‌های تحت تیمار عصاره بخش‌های هوایی نیز کما بیش دیده می‌شود (شکل 1-B). به این ترتیب عصاره‌های الکلی در غلظت‌های کم‌تر از 500 میکروگرم در میلی‌لیتر ریشه، بخش‌های هوایی و گل تقریباً هیچ سمیتی در سلول‌های HepG2 نشان نداد (شکل 1- A-B-C). به نظر می‌رسد احتمالاً کاهش درصد سلول‌های زنده در غلظت 1000 میکروگرم در میلی‌لیتر نیز به دلیل تنش‌های اسمزی است و نه سمی بودن عصاره [42].

فعالیت آنتی‌اکسیداتیو عصاره‌های متانلی *E. parviflorum* در حذف رادیکال‌های آزاد. در تست TEAC، رادیکال ABTS به سرعت با آنتی‌اکسیدان‌ها واکنش داده و با توجه به این‌که هم در حلال‌های آبی و هم آلی محلول می‌باشد می‌تواند برای تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی لیپوفیلی و هیدروفیلی مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعات مختلف بیش‌تر از عدد TEAC (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولوکس یا قدرت مهار رادیکال ABTS با نمونه‌ها بر اساس استاندارد ترولوکس) استفاده می‌گردد [43]. آنالیز داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره متانلی قسمت‌های مختلف گیاه *E. parviflorum* (ریشه، بخش‌های هوایی، گل) تاثیر معناداری در مهار رادیکال ABTS دارد ($P\leq0/05$) $P=0/0001$. هر میکروگرم عصاره ریشه، ساقه و برگ به ترتیب معادل 0/49، 0/50 و 0/52 میکرگرم ترولوکس رادیکال‌های آزاد را مهار می‌کند (شکل 2). نمونه‌های مورد بررسی در این پژوهش در غلظت 2/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیش از 93% رادیکال‌های آزاد در آزمون ABTS را حذف می‌کنند.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

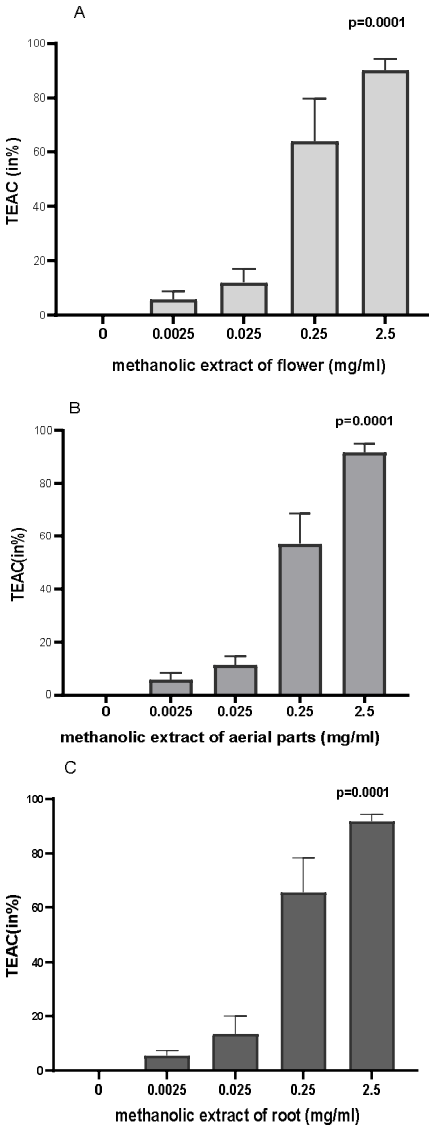


شکل 1. درصد زنده مانی سلول‌های HepG2 بعد از تیمار 48 و 72 ساعته با عصاره های الکلی گل (A)، بخش های هوایی (B) و ریشه (C) گیاه E. parviflorum . هر ستون از نمودار بر اساس mean±SD حاصل از حداقل سه بار تکرار مستقل آزمایش رسم شده است.

اثرات آنتی‌اکسیدانی و پیشگیرانه عصاره‌های متانلی *Epilobium parviflorum* در برابر تنش ناشی از پراکسیدهیدروژن در سلول‌های HepG2

زنده‌مانی سلول‌ها

برای بررسی تأثیر محافظتی عصاره‌های متانلی گیاه *E. parviflorum* در برابر تنش اکسیداتیو بر نمونه‌های سلولی HepG2، زنده‌مانی سلول‌ها پس از یک تنش 3 ساعته با غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن به روش MTT اندازه‌گیری شد. زنده‌مانی سلول‌ها در تیمار با پراکسیدهیدروژن به طور وابسته به غلظت به‌طور معناداری کاهش یافت (شکل 3) ($P\leq0/05$) $P=0/001$ غلظت 1/25 میلی‌مولار پراکسید هیدروژن سبب مهار رشد سلولی تا میزان 50% شد که به عنوان IC50 لحاظ شد و در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

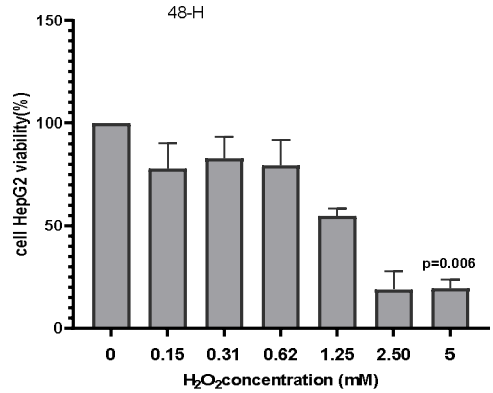


شکل 2. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با سنجش میزان مهار رادیکال ABTC در غلظت های مختلف عصاره ی الکلی گل (A)، بخش های هوایی (B) و ریشه (C) گیاه E. parviflorum .داده های حاصل از سه بار تکرار مستقل آزمایش بصورت عدد TEAC (ظرفیت آنتی اکسیدانی معادل ترولوکس یا قدرت مهار ABTS با نمونه ها بر اساس استاندارد ترولوکس) بیان و بر اساس mean±SD رسم شده است (P=0.0001).

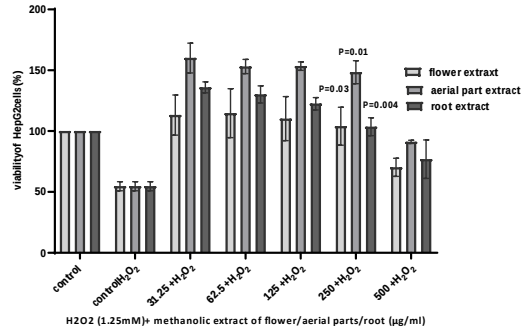
سلول‌های HepG2 به مدت 48 ساعت با غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانلی ریشه، بخش‌های هوایی و گل و سپس 3 ساعت با پراکسیدهیدروژن 1/25 میلی‌مولار تیمار شدند. همان‌طور که در شکل 4 نشان داده شده است، نه تنها سمیت پراکسیدهیدروژن در سلول‌هایی که قبلاً به مدت 48 ساعت با عصاره تیمار شده بودند، کمابیش جبران گردیده، بلکه زنده‌مانی سلول‌ها از گروه کنترل بدون تنش اکسیداتیو نیز بیش‌تر بود. سمیت سلولی ناشی از تنش اکسیداتیو با پراکسید

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

هیدروژن به طور معنی‌داری ($P\leq0/05$) توسط عصاره الکلی ریشه ($P=0/004$)، بخش‌های هوایی ($P=0/01$) و گل ($P=0/03$) کاهش یافته بود. هم‌چنین تاثیر پایین‌ترین غلظت‌های هر یک از عصاره‌ها (31/25 میکروگرم بر میلی‌لیتر) چشمگیرتر بوده و با افزایش غلظت این تاثیر کاهش می‌یابد.

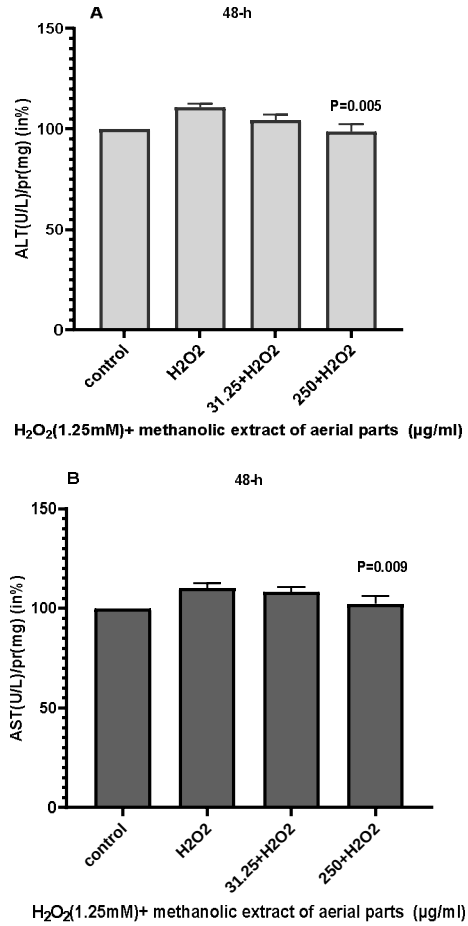


شکل 3. درصد زنده مانی سلول های HepG2 بعد از تیمار 3 ساعته با غلظت های متفاوت پراکسید هیدروژن. هر ستون از نمودار بر اساس mean±SD حاصل از سه بار تکرار مستقل آزمایش رسم شده است.



شکل 4 . درصد زنده مانی سلول های HepG2 که بعد از تیمار 48 ساعته با عصاره ی الکلی گل، بخش های هوایی و ریشه گیاه E. parviflorum ، تحت استرس اکسیداتیو با پراکسید هیدروژن 1/25میلی مولار به مدت 3 ساعت قرار گرفته بودند. هر ستون از نمودار بر اساس mean±SD حاصل از سه بار تکرار مستقل آزمایش رسم شده است میزان معنا داری به ترتیب در عصاره های گل ، بخش های هوایی و ریشه ($p=0.03$، $p=0.01$)، $p=0.004$) است.

سطح آنزیم‌های ALT و AST، مقدار فعالیت ALT و AST در محیط کشت سلول‌ها در حد قابل سنجش با کیت مورد استفاده نبود. اما فعالیت این آنزیم‌ها در سلول‌های HepG2 پس از تحمل تنش اکسیداتیو در مقایسه با سلول‌های کنترل افزایش مختصری (در هر دو آنزیم در حدود 10%) نشان داد (شکل 5)، در حالی‌که تیمار با غلظت‌های 31/25 و 250 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانلی بخش‌های هوایی به‌طور وابسته به غلظت مانع این افزایش فعالیت آنزیمی شده و فعالیت هر دو آنزیم در حد طبیعی نگهداشته شد ($P=0/001$).

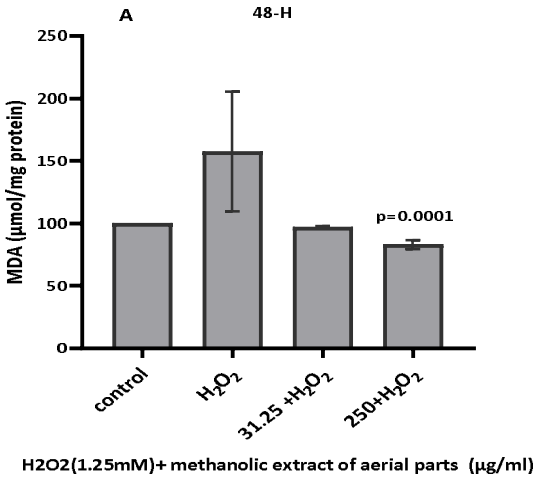


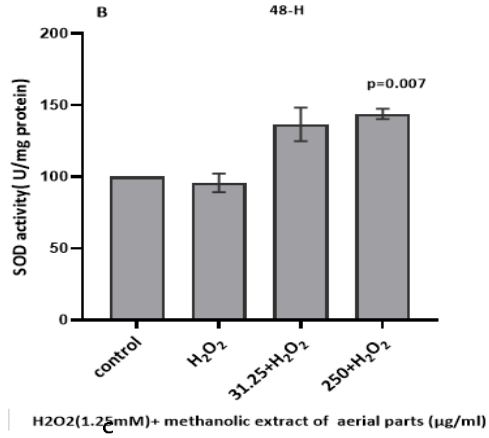
شکل 5. فعالیت آنزیم های آمینو ترانسفراز ALT (A) و AST (B) در سلولهای HepG2 پس از تیمار 48 ساعته با عصاره ی الکلی بخش های هوایی E. parviflorum و سپس تنش اکسیداتیو 3 ساعته با پراکسید هیدروژن. هر ستون از نمودار بر اساس mean±SD رسم شده است. داده ها میانگین سه بار تکرار مستقل را نشان می دهد.

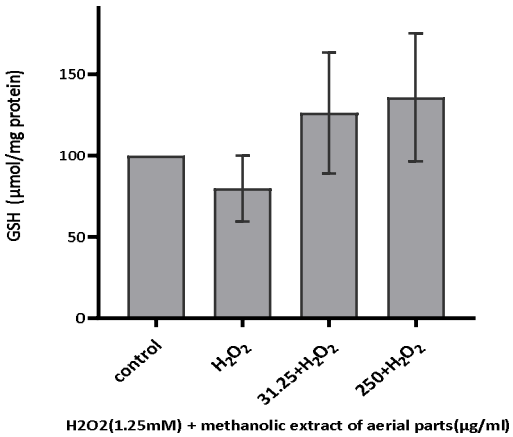
پراکسیداسیون لیپیدی، MDA یکی از محصولات اصلی و یک نشانگر زیستی برای پراکسیداسیون لیپیدها است. غلظت سیتوپلاسمی MDA پس از اعمال تنش اکسیداتیو در سلول‌های HepG2 تحت تیمار عصاره متانلی گیاه اندازه‌گیری شد. مقدار MDA در نمونه‌های سلولی در معرض 1/25 میلی‌مولار پراکسیدهیدروژن نسبت به گروه غیر تنشی افزایش یافت (44%) ولی تیمار با غلظت‌های 31/25 و 250 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره الکلی این گیاه به مدت 48 ساعت مانع از افزایش میزان MDA شد (شکل 6-A). سطح پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از پراکسیدهیدروژن در سلول‌های تیمار شده با 31/25 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره نه تنها کاهش (Mean=96.80,SD=1.01) یافت، بلکه از مقادیر موجود در سلول‌های کنترل که تحت تنش پراکسید هیدروژن نبوده‌اند، نیز کم‌تر بود. این روند در غلظت

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

250 میکروگرم بر میلی مشهودتر و در حدود 71% در مقایسه با کنترل بود (Mean=82.97, SD=3.6) (*P*=0/0001).







شکل 6. میزان MDA (A) و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی SOD (B) و GPX (C) در سلول های HepG2 پس از تیمار 48 ساعته با عصاره الکلی بخش های هوایی گیاه E. parviflorum و سپس تنش 3 ساعته اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن. هر ستون داده های حاصل از سه بار تکرار مستقل آزمایش را بر اساس mean±SD نشان می دهد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و GPX. نتایج به‌دست آمده از آزمایش سنجش آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (شکل 6-B) نشان می‌دهد که تیمار با 1/25 میلی‌مولار پراکسید هیدروژن به مدت سه ساعت می‌تواند به‌طور قابل توجهی فعالیت SOD در سلول‌های HepG2 را به مقدار بسیار اندکی کاهش دهد. ولی در سلول‌های HepG2 که به مدت 48 ساعت با عصاره‌ی متانلی بخش‌های هوایی تیمار شده و سپس به مدت 3 ساعت تحت تنش اکسیداتیو با پراکسیدهیدروژن قرار گرفته بودند، میزان فعالیت SOD به صورت معناداری در مقایسه با کنترل افزایش یافت (*P*≤0/05) *P*=0/007. افزایش فعالیت آنزیم به مقدار 40 و 53% به ترتیب در تیمارهای 31/25 و 250 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره بوده است. این نتایج نشان داد که عصاره متانلی بخش‌های هوایی بیدعلفی پونه‌ای اثرات پیشگیرانه‌ای را در برابر تغییرات ناشی از پراکسید هیدروژن با تقویت سیستم سوپراکسیددیسموتاز دارد که با افزایش غلظت عصاره بیش‌تر می‌شود. سطح GSH به عنوان نشانگر فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز، در سلول‌های HepG2 پس از 48 ساعت تیمار با عصاره متانلی بخش‌های هوایی و سه ساعت تنش اکسیداتیو با پراکسیدهیدروژن تغییرات معناداری را نشان نداد (*P*=0/09) (شکل 6 -C).

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از خواص درمانی گیاهان از گذشته‌های دور مرسوم بوده و مورد توجه اقوام بسیاری از تمدن‌های بشری به ویژه در کشورهای مصر و چین بوده است [44] و از جمله گیاه *E. angustifolium* برای رفع آفت و التهاب مخاط دهان و همچنین به عنوان التیام‌دهنده زخم و جراحات کاربرد داشته است [45]. امروزه نیز گونه‌های اپیلوبیوم در بسیاری از کشورها در درمان پروستات، عفونت‌های خونی ناشی از زخم، درمان التهاب مفصلی و تسکین درد، بیماری‌های پروستات، معدی-روده‌ای و بی‌نظمی‌های قاعدگی تجویز می‌شود [46]. در عصاره گیاهان جنس *Epilobium* آلکالوئیدها و فلاونوئیدها به فراوانی و اسید الاژیک، تانن‌های مختلف و اسیداولئیک به مقادیر کم‌تر یافت می‌شود [47]. عصاره *E. parviflorum* و *E. angustifolium* به واسطه جلوگیری از ترشح پروستاگلاندین‌ها، خاصیت ضد التهابی و آرام‌بخشی نیز دارند [48].

داده‌های LC-MS / MS حاکی از آن است که مولکول اصلی تانن *E. parviflorum* یک تانن کلرید کلسیم، اونتئین B است که یک فلاونوئید مهم مریستینی (میریستین-3--O rhamnoside) است. این ترکیب باعث مهار پروتئین α-5 ردوکتاز و آنزیم‌های آروماتاز می‌شود، بنابراین به طور غیرمستقیم اختلالات هورمونی را تعدیل می‌کند [28]. وجود کافئیک و اسید کلروژنیک، گالیک و مشتقات اسید گالیک،

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

میریستین، کورستین، کامپفرول و گلیکوزیدهای مختلف آن‌ها نیز مشخصه *E. parviflorum* است [49،48].

گونه‌های مختلف اپیلوبیوم به طور قابل توجهی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا هستند (مقدار EC50 بین 1/71 تا 3 میکروگرم در میلی‌لیتر بود) به طوری که قابل مقایسه با ترولوکس یا اسید اسکوربیک می‌باشند (ترولوکس :EC50 0/238±7/96 میکرومولار؛ اسید اسکوربیک :EC50 0/43±14/29 میکرومولار). بر اساس گزارشات قبلی در بین گونه‌های *Epilobium* و نمونه‌های تجاری، *E. parviflorum* بیش‌ترین ظرفیت آنتی‌اکسیدان را دارد؛ (EC50 معادل 1/0±71/01 میکروگرم در میلی‌لیتر) [14]. تا کنون اطلاعات چندانی از نمونه‌های این گیاه در ایران در دست نیست، لذا در این‌جا بررسی این گیاه بومی از جهات ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانتی و اثرات زیستی بر سلول‌های کبدی HepG2 مورد توجه قرار گرفت. در نمونه‌های عصاره‌های بید علفی پونه‌ای مورد بررسی ما نیز خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی با حذف رادیکال‌های آزاد مشاهده شد. توانایی حذف رادیکال‌های آزاد در آزمون ABTS در غلظت 2/5 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های مورد مطالعه در این پژوهش معادل 5/0±1/2 میکرومولار ترولوکس (وزن مولکولی 250/29 گرم بر مول) برآورد شد. با توجه به منحنی استاندارد سنجش ترولوکس مقادیر EC50 عصاره‌های ریشه، بخش‌های هوایی و گل در این نمونه‌ها به ترتیب 0/11، 0/15 و 0/12 میکروگرم بر میلی‌لیتر تخمین زده شد. در بین بخش‌های مختلف گیاه بیش‌ترین اثرات محافظتی که در زنده‌مانی سلول‌های تحت تنش بروز می‌کند، مربوط به بخش‌های هوایی بود، اگر چه در مقایسه قدرت حذف رادیکال‌های آزاد بیش‌تری در مقایسه با ریشه و گل نشان نداد. بنابراین به نظر می‌رسد که مکانیسم‌های دیگری نیز درگیر هستند و این احتمال وجود ترکیبات موثر متفاوت و ویژه‌ای در این بخش از گیاه را تقویت می‌کند. بررسی فیتوشیمیایی ترکیبات موثره شناخته شده در گونه‌های مختلف *Epilobum* اخیراً با دقت بیش‌تری مرور شده است [18]. عمده‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانتیو در این گیاه را یک الاژیتانین به نام اونتئین (Oenothein B) B و فلاونوئیدها که عمدتاً میریسیترین است، می‌دانند که اولی به میزان قابل توجه و دومی به مقدار کم‌تری در عصاره‌های این گیاه وجود دارد [23،25]. با وجود تنوع بسیاری از خواص درمانی این گیاه، تعداد بسیار معدودی مشاهدات حاکی از ویژگی‌های آنتی‌توموری آن در کنترل رشد سلول‌های سرطانی وجود دارد که مهم‌ترین آن‌ها در کنترل رشد سلول‌های سرطان پروستات حساس به هورمون است [27]. پژوهش‌های اخیر نیز نشان‌دهنده اثرات قابل توجه عصاره‌های این گیاه در مهار رشد سلول‌های سرطان پستان است، در حالی‌که سمیت چندانی بر سلول‌های غیرسرطانی ندارد [28]. از آن‌جا که هیچ گزارشی از اثرات زیستی عصاره‌های بید علفی پونه‌ای بر سلول‌های کبدی در دست نیست، در این مطالعه برای اولین بار به بررسی تأثیر عصاره‌های متانلی آن بر رشد و عملکرد سلول‌های کبدی پرداخته شده است. نه تنها هیچ‌یک از عصاره‌های متانلی در آزمون‌های MTT باعث مهار رشد سلول‌های HepG2 نشدند، بلکه در بررسی‌های مورفولوژیک نیز هیچ‌گونه آسیب غشایی یا تغییرات سیتوپلاسمی مشاهده نشد. از آن‌جا که کبد جایگاه منحصر به فردی در متابولیسم ثانوی و مقابله با زنوبیوتیک‌ها داشته و بالقوه بیش‌ترین آسیب‌های اکسیداتیو را متحمل می‌شود، بر آن شدیم که اثرات محافظتی عصاره‌های گیاه *E. parviflorum* بر کبد را در مدل کشت سلول بررسی کنیم.

در مجموع با تیمارهای 48 ساعته شاهد اثرات محافظتی عصاره متانلی این گیاه بر سلول‌های کبدی در مقابل تنش اکسیداتیو ROS هستیم که می‌تواند به واسطه وجود متابولیت‌های ثانوی در این گیاه باشد. عصاره متانلی بخش‌های هوایی گیاه *E. parviflorum* محصولات پایانی پراکسیداسیون لیپید (عمدتاً مالون دی آلدئید) در سلول‌های تحت تنش اکسیداتیو را به‌طور قابل توجه و معناداری کاهش می‌دهد ($P\leq0/05$). به‌طور سازگار با داده‌های ما Hevesi و همکاران نیز اثر محافظتی گیاه *E. parviflorum* در دوزهای بالاتر از 0/20 میلی‌گرم در میلی‌لیتر در برابر پراکسیداسیون لیپید در عصاره‌ی مغز گاو به واسطه مهار وابسته به غلظت لیپید پراکسیداز را گزارش کرده‌اند [49]. عصاره‌های مطالعه حاضر کاهش مقادیر MDA را در غلظت‌های به مراتب پایین‌تری نشان می‌دهند که حاکی از قدرت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تر نمونه‌های بید علفی پونه‌ای ایران در مقایسه با نمونه‌های مطالعه شده گیاه در پژوهش فوق است. به این ترتیب انتظار می‌رود که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در نمونه‌های گیاه مورد مطالعه در این‌جا غلظت به مراتب بیش‌تری از نمونه‌های مورد اشاره در گزارشات دیگران دارد.

به‌طور کلی ترکیبات آنتی‌اکسیدان از مکانیسم‌های مهار مستقیم و غیرمستقیم برخوردار هستند. ظرفیت آنتی‌اکسیدان مستقیم توانایی آنتی‌اکسیدان در مهار ROS از طریق اهدای هیدروژن یا الکترون‌ها است، در حالی که ظرفیت آنتی‌اکسیدان غیرمستقیم توانایی یک آنتی‌اکسیدان در جلوگیری از تنش اکسیداتیو با القای بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است. بنابراین تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را می‌توان نشانگر زیستی پاسخ آنتی‌اکسیدانی در نظر گرفت. در این مطالعه، هر

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

دو مکانیسم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی و آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت. عصاره بخش‌های هوایی گیاه که در محافظت سلول‌های کبدی در مقابل تنش اکسیداتیو موثرتر از ریشه و گل بود، هر دو مکانیسم آنتی‌اکسیدانی مستقیم و غیر مستقیم را نشان می‌دهد. نتایج مطالعات Hevesi و همکاران در سال 2008 نیز حاکی از اثر محافظتی عصاره *E. parviflorum* بر فیبروبلاست‌های انسانی تحت تنش با پراکسید هیدروژن در حد قابل مقایسه با کاتالاز (250IU/ml) می‌باشد [49]. وجود ترکیبات فنلی که قابلیت احیاکنندگی و حذف گونه‌های فعال اکسیژن در سلول تحت تنش اکسیداتیو را دارند، در این گیاه که توانایی مهار فعالیت COX داشته و با کاهش تولید PGE2 اثر ضد التهابی دارند، کاملاً تایید شده است [52-50].

از سوی دیگر تیمار با عصاره‌ها از افزایش هر چند اندک فعالیت ALT و AST ناشی از تنش اکسیداتیو در سلول‌های HepG2 جلوگیری کرده است. اگرچه توضیح این مطلب با دانش فعلی قدری مشکل است و هنوز جزئیات تنظیم بیان ژنی این آنزیم‌ها به خوبی روشن نشده است، ولی احتمالاً حضور ترکیبات آنتی‌اکسیداتیو موجود در عصاره‌ها باعث حذف رادیکال‌های آزاد و کم شدن شدت پاسخ شده است. بر اساس دانش امروز، در تنش‌های اکسیداتیو فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی دخیل در پاسخ به ROS مانند ATF4 و NRF2 روی می‌دهد [53] که در نتیجه باعث افزایش بیان پروتئین‌های دفاعی پایین دست از جمله ALT1 (ایزوفرم سیتوپلاسمی ALT) می‌شود [54]. بنابراین می‌توان انتظار داشت که عصاره‌های گیاه بید علفی پونه‌ای می‌تواند علاوه بر اثرات مستقیم در تقابل با تنش‌های اکسیداتیو، بتواند با جلوگیری از تغییر الگوی بیان ژن‌ها اثرات غیرمستقیم را نیز در پی داشته باشد.

در مجموع به نظر می‌رسد عصاره متانلی بخش‌های هوایی این گیاه که اثرات محافظتی بیش‌تری در مقایسه با ریشه و گل در مقابل تنش اکسیداتیو در سلول‌های کبدی دارد، شامل مقادیر بیش‌تری متابولیت‌های موثر باشد و بررسی‌های بعدی آزمایشگاه بر شناسایی و ارزیابی مقداری آن‌ها متمرکز شده است.

پژوهش حاضر به اثرات زیستی عصاره‌ی متانلی بیدعلفی پونه‌ای *Epilobium parviflorum* بر رشد و عملکرد سلول‌های کبدی در مدل سلول‌های کبدی HepG2 پرداخته است. عصاره‌های متانلی قسمت‌های مختلف این گیاه واجد قدرت آنتی‌اکسیدانی قابل مقایسه با ترولوکس بوده و نه تنها بر سلول HepG2 کشندگی ندارند، بلکه زنده‌مانی سلول‌ها را در مقایسه با سلول‌های کنترل افزایش می‌دهند. در تنش اکسیداتیو ناشی از پراکسیدهیدروژن در مجموع اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظتی بخش‌های هوایی در سلول‌های HepG2 قوی‌تر از ریشه و گل است. اثرات محافظتی عصاره‌های متانلی این گیاه می‌تواند ناشی از تقویت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سرکوب لیپید پراکسیدازها باشد. بنابراین می‌توان انتظار داشت که احتمالاً انواع ترکیبات موثرتر و یا مقادیر بیش‌تری از آن‌ها در بخش‌های هوایی در مقایسه با گل این گیاه وجود دارد. این نتایج مکمل دیگر اثرات شناخته شده گیاه *E. parviflorum* از قبیل خاصیت ضد توموری، ضد درد، ضد باکتریایی و..... بررسی شده توسط دیگر محققان است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه حکیم سبزواری و دانشگاه دامغان به سبب فراهم آوردن امکانات پژوهشی و حمایت مالی پروژه اعلام می‌دارند.

مشارکت و نقش نویسندگان

سکینه کاظمی نورعینی: ایده و طراحی مطالعه، آموزش و هدایت پژوهش، نویسنده مقاله. الهه رودسرابی: جمع آوری داده ها؛ آنالیز و تفسیر نتایج و نگارش نسخه اول مقاله محمد رضا واعظی کاخکی: آموزش و هدایت پژوهش، نویسنده مقاله. حسن فریدنوری: آموزش و هدایت پژوهش، نویسنده مقاله.همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند

منابع

[1] Siegel R, Naishadham D. jemal A: Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin 2013; 63: 11-30. https://doi.org/10.3322/caac.21166 PMid:23335087

[2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2021. https://doi.org/10.3322/caac.21660 PMid:33538338

[3] Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. Nutr Metab 2010; 7: 7. https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-7 PMid:20181022 PMCid:PMC2845135

[4] Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NR-D, Huang P. Redox regulation of cell survival. Antioxid Redox Signal 2008; 10: 1343-1374. https://doi.org/10.1089/ars.2007.1957 PMid:18522489 PMCid:PMC2932530

[5] Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. Drug Resist Updat 2004; 7: 97-110. https://doi.org/10.1016/j.drup.2004.01.004 PMid:15158766

[6] Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis 2000; 5: 415-418.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

carrageenin induced oedema of the rat paw. J Ethnopharmacol 1986; 17: 161-169.
https://doi.org/10.1016/0378-8741(86)90055-3

[21] Allkanjari O, Vitalone A. What do we know about phytotherapy of benign prostatic hyperplasia? Life Sci 2015; 126: 42-56.
https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.01.023
PMid:25703069

[22] Steenkamp V, Gouws M, Gulumian M, Elgorashi E, Van Staden J. Studies on antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activity of herbal remedies used in the treatment of benign prostatic hyperplasia and prostatitis. J Ethnopharmacol 2006; 103: 71-75.
https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.07.007
PMid:16122891

[23] Kiss AK, Bazylko A, Filipek A, Granica S, Jaszewska E, Kiarszys U, et al. Oenothein B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of Epilobium sp. Phytomedicine 2011; 18: 557-560.
https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.10.016
PMid:21112753

[24] Babich H, Visioli F. In vitro cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. Il Farmaco 2003; 58: 403-407.
https://doi.org/10.1016/S0014-827X(03)00048-X

[25] Schepetkin IA, Kirpotina LN, Jakiw L, Khlebnikov AI, Blaskovich CL, Jutila MA, et al. Immunomodulatory activity of oenothein B isolated from Epilobium angustifolium. J Immunol 2009; 183: 6754-666.
https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901827
PMid:19846877 PMCid:PMC2783546

[26] Lesuisse D, Berjonneau J, Ciot C, Devaux P, Doucet B, Gourvest J, et al. Determination of oenothein B as the active 5-α-reductase-inhibiting principle of the folk medicine Epilobium parviflorum. J Nat Prod 1996; 59: 490-492.
https://doi.org/10.1021/np960231c
PMid:8778238

[27] Vitalone A, Bordi F, Baldazzi C, Mazzanti G, Saso L, Tita B. Anti-proliferative effect on a prostatic epithelial cell line (PZ-HPV-7) by Epilobium angustifolium L. Il Farmaco 2001; 56: 483-489.
https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01067-9

[28] Kazemi Noureini S, Hatefi Kia B, Vaezi Kakhki MR.The extracts of epilobium parviflorum inhibit MCF-7 breast cancer cells. Iran J Toxicol 2021; 15: 65-72.
https://doi.org/10.32598/IJT.15.1.752.1

[29] Soltani N, Karami R, Ranjbar M. The interaction of salicylic acid and cold stress on antioxidant enzyme activities in licorice (Glycyrrhiza glabra). J Herbal Drugs 2011; 2: 7-13.

[30] Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications: John Wiley & Sons; 2015.

[31] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65: 55-63.
https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4

[32] Wang P, Peng X, Wei ZF, Wei FY, Wang W, Ma WD, et al. Geraniin exerts cytoprotective effect against cellular oxidative stress by upregulation of Nrf2-mediated antioxidant enzyme expression via PI3K/AKT and ERK1/2 pathway. Biochim Biophys Acta 2015; 1850: 1751-1761.
https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.04.010
PMid:25917210

[33] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol Med 1999; 26: 1231-1237.
https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3

[34] Mahammadi Purfard A, Kavoosi G. Chemical composition, radical scavenging, antibacterial and antifungal activities of Zataria multiflora bioss essential oil and aqueous extract. J Food Safet 2012; 32: 326-332.
https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2012.00384.x
https://doi.org/10.1023/A:1009616228304
PMid:11256882

[7] de la Rosa LC, Schoemaker MH, Vrenken TE, Buist-Homan M, Havinga R, Jansen PL, et al. Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases. J Hepatol 2006; 44: 918-929.
https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.07.034
PMid:16310883

[8] Ferreira IC, Baptista P, Vilas-Boas M, Barros L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. Food Chem 2007; 100: 1511-1516.
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.043

[9] Collins AR. Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. Eur J Cancer 2005; 41: 1923-1930.
https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.06.004
PMid:16111883

[10] Khullar M, Al-Shudiefat AA-RS, Ludke A, Binepal G, Singal PK. Oxidative stress: a key contributor to diabetic cardiomyopathy. Can J Physiol Pharmacol 2010; 88: 233-240.
https://doi.org/10.1139/Y10-016
PMid:20393588

[11] Alañón M, Castro-Vázquez L, Díaz-Maroto M, Gordon M, Pérez-Coello M. A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. Food Chem 2011; 128: 997-1002.
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.005

[12] Record IR, Dreosti IE, McInerney JK. Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruit and vegetables or following dietary supplementation with an antioxidant mixture. Br J Nutr 2001; 85: 459-464.
https://doi.org/10.1079/BJN2000292
PMid:11348560

[13] Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. J Ethnopharmacol 2005; 100: 72-79.
https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.011
PMid:16009521

[14] Tóth BH, Blazics B, Kéry Á. Polyphenol composition and antioxidant capacity of Epilobium species. J Pharm Biomed Anal 2009; 49: 26-31.
https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.09.047
PMid:19013046

[15] Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. Crit Rev Toxicol 2003; 33: 105-136.
https://doi.org/10.1080/713611034
PMid:12708612

[16] Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol 2002; 8: 385.
https://doi.org/10.3748/wjg.v8.i3.385
PMid:12046056 PMCid:PMC4656407

[17] Gueritte-Voegelein F, Guenard D, Lavelle F, Le Goff MT, Mangatal L, Potier P. Relationships between the structure of taxol analogs and their antimitotic activity. J Med Chem 1991; 34: 992-998.
https://doi.org/10.1021/jm00107a017
PMid:1672159

[18] Vitalone A, Allkanjari O. Epilobium spp: pharmacology and phytochemistry. Phytother Res 2018; 32: 1229-1240.
https://doi.org/10.1002/ptr.6072
PMid:29575111

[19] Juan H, Sametz W, Hiermann A. Anti-inflammatory effects of a substance extracted from Epilobium angustifolium. Inflamm Res 1988; 23: 106-107.
https://doi.org/10.1007/BF01967206
PMid:3354371

[20] Hiermann A, Juan H, Sametz W. Influence of Epilobium extracts on prostaglandin biosynthesis and

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[35] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

[36] Reddy BS, Reddy RKK, Reddy BP, Ramakrishna S, Diwan PV. Potential in vitro antioxidant and protective effects of Soymida febrifuga on ethanol induced oxidative damage in HepG2 cells. Food Chem Toxicol 2008; 46: 3429-3442.
https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.034
PMid:18812207

[37] Martín MÁ, Serrano ABG, Ramos S, Pulido MI, Bravo L, Goya L. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. J Nutr Biochem 2010; 21: 196-205.
https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.10.009
PMid:19195869

[38] Zeb A, Ullah F. A simple spectrophotometric method for the determination of thiobarbituric acid reactive substances in fried fast foods. J Anal Methods Chem 2016; 2016.
https://doi.org/10.1155/2016/9412767
PMid:27123360 PMCid:PMC4830699

[39] Mertens K, Rogiers V, Vercruysse A. Measurement of malondialdehyde in cultures of adult rat hepatocytes. Toxicol Vitro 1993; 7: 439-441.
https://doi.org/10.1016/0887-2333(93)90043-5

[40] Tian Y, Zou B, Yang L, Xu SF, Yang J, Yao P, et al. High molecular weight persimmon tannin ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in senescent mice induced by D-galactose. Food Chem Toxicol 2011; 49: 1728-1736.
https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.018
PMid:21539885

[41] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

[42] She X, Wang F, Ma J, Chen X, Ren D, Lu J. In vitro antioxidant and protective effects of corn peptides on ethanol-induced damage in HepG2 cells. Food Agricul Immunol 2016; 27: 99-110.
https://doi.org/10.1080/09540105.2015.1079597

[43] Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (Sorghum bicolor) and sorghum products. J Agric Food Chem 2003; 51: 6657-6662.
https://doi.org/10.1021/jf034790i
PMid:14582956

[44] Lazhiry A, Vlak J. Herb plants. Translated to Persian by: Zaman S Tehran: Ghoghnoos Pub. 1993.

[45] Zargari A. Iranian medicinal plants. Tehran: Tehran Univ Public 1997. (Persian).

[46] Akbari Mehr RS, Malekzadeh P. Antibacterial activity of some Epilobium L. species aerial parts extract. J Aqu Eco 2015; 5: 68-62.

[47] Watson L, Dallwitz MJ. The families of angiosperms: automated descriptions, with interactive identification and information retrieval. Austr Syst Botany 1991; 4: 681-695.
https://doi.org/10.1071/SB9910681

[48] Ducrey B, Marston A, Göhring S, Hartmann R, Hostettmann K. Inhibition of 5α-reductase and aromatase by the ellagitannins oenothein A and oenothein B from Epilobium species. Planta Med 1997; 63: 111-114.
https://doi.org/10.1055/s-2006-957624
PMid:9140222

[49] Hevesi B, Houghton P, Habtemariam S, Kéry Á. Antioxidant and antiinflammatory effect of epilobium parviflorum schreb. Phytother Res 2009; 23: 719-724.
https://doi.org/10.1002/ptr.2725
PMid:19107731

[50] Stolarczyk M, Naruszewicz M, Kiss AK. Extracts from Epilobium sp. herbs induce apoptosis in human hormone-dependent prostate cancer cells by activating the mitochondrial pathway. J Pharm Pharmacol 2013; 65: 1044-1054.
https://doi.org/10.1111/jphp.12063
PMid:23738732

[51] Piwowarski JP, Bobrowska-Korczak B, Stanisławska I, Bielecki W, Wrzesien R, Granica S, et al. Evaluation of the effect of Epilobium angustifolium aqueous extract on LNCaP cell proliferation in in vitro and in vivo models. Planta Med 2017; 83: 1159-1168.
https://doi.org/10.1055/s-0043-109372
PMid:28454190

[52] Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco J. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. Food Chem 2003; 83: 547-550.
https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00151-1

[53] Yang RZ, Park S, Reagan WJ, Goldstein R, Zhong S, Lawton M, et al. Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. Hepatology 2009; 49: 598-607.
https://doi.org/10.1002/hep.22657
PMid:19085960 PMCid:PMC2917112

[54] Ma TJ, Lan DH, He SZ, Ye Z, Li P, Zhai W, et al. Nrf2 protects human lens epithelial cells against H(2)O(2)-induced oxidative and ER stress: The ATF4 may be involved. Exp Eye Res 2018; 169: 28-37.
https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.01.018
PMid:29421327

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Koomesh -Volume 23, Issue 6 (November and December 2021), 801-812

Effects of methanolic extracts of *Epilobium parviflorum* on growth and function of human liver cells HepG2

Elahe Roudsarabi (M.Sc Student) [1], Sakineh Kazemi Noureini (Ph.D)[*2], Hassan Faridnouri (Ph.D)[1], Mohammad Reza Vaezi Kakhki (Ph.D) [2]

1 – Dept. of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, Iran

2 – Dept. of Biology, Faculty of Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

* Corresponding author. +98 23 33623300 Kazemibio@gmail.com

Received: 16 Jan 2021 ; Accepted: 30 May 2021

Introduction*: Epilobium parviflorum*, the willow-herb, extracts contain strong antioxidant compounds and inhibit few types of cancer cell. This study investigates for the first time the effect of its extracts on the growth of human liver cells HepG2, also under oxidative stress.

Materials and Methods*:* Methanolic extract of roots, shoots and flowers was prepared separately. Cell viability was assessed by MTT method after 48 hours of treatments with extracts and then with or without hydrogen peroxide treatment. The antioxidant capacity of the extracts as well as the activities of transaminases, superoxide dismutase and lipid peroxidase were measured in the treated cells.

Results: None of the extracts showed cytotoxicty against HepG2 cells, nevertheless cell viability in treatment with aerial and root extracts was significantly increased (P<0.05). In the oxidative stress model, the survival of cells pretreated with extracts, especially methanolic extracts of aerial parts, increased significantly (P<0.05). Pretreatment with this extract in cells under oxidative stress decreased the concentration of MDA and the activity of intracellular ALT and AST enzymes and also increased the activity of superoxide dismutase enzyme compared to the control. The antioxidant capacity of the extracts was comparable to that of Trolux.

Conclusion: Methanolic extract of *Epilobium parviflorum* showed no cytotoxicity on HepG2 cells and probably protect human liver cells against oxidative stress. It can be a valuable suggestion for preventing liver damages.

Keywords*: Epilobium*, Oxidative Stress, Cell Survival Cell Death, Liver, Lipid Peroxidation, Antioxidants, HepG2 Cells

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]