

اثر محافظتی عصاره آبی-الکلی میوه گیاه سپستان در کاهش سمیت ناشی از پراکسید هیدروژن در سلول‌های اندوتلیال آئورت گاو (BAE-1): یک مطالعه آزمایشگاهی

سحر فنودی^۱، آذر حسینی^۲

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۳/۲۶ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۳/۰۴/۲۴ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۳/۰۷/۲۸ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۰۷/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به اثرات منفی استرس اکسیداتیو در پاتوفیزیولوژی بیماری‌های قلبی و عروقی، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها مانند گیاهان دارویی می‌تواند به کاهش عوارض کمک کند. این مطالعه با هدف تعیین اثر محافظتی گیاه سپستان در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در سلول‌های اندوتلیوم آئورت جدا شده از گاو (Bovine Aortic Endothelial; BAE-) انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، ابتدا عصاره آبی-الکلی از میوه گیاه سپستان تهیه شد. سلول‌های BAE-1 به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره (۲۰۰-۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) قرار گرفتند، سپس H_2O_2 (۲۰۰ میکرومولار) اضافه شد و پس از نیم‌ساعت تست‌های مختلف شامل زنده‌مانی سلول‌ها، میزان آپوپتوز سلولی به روش فلوسایتومتری، بررسی پراکسیداسیون لیپیدی با سنجش مالون‌دی‌آلدهید و بررسی تولید رادیکال‌های آزاد با پروب دی‌کلرودی‌فلئورسین‌دی‌استات (Dichlorodifluorescein diacetate; DCFDA) انجام گردید. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: غلظت‌های مختلف عصاره میوه سپستان به‌صورت وابسته به دوز میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و مالون‌دی‌آلدهید ناشی از سمیت H_2O_2 را به صورت معنی‌دار نسبت به گروه H_2O_2 کاهش داد ($P < 0/05$). همچنین، پیش‌تیمار سلول‌ها با عصاره میوه سپستان به صورت وابسته به دوز باعث کاهش معنی‌دار میزان آپوپتوز نسبت به گروه پراکسید هیدروژن شد ($P < 0/01$).

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، به نظر می‌رسد استفاده از عصاره آبی-الکلی میوه سپستان می‌تواند سبب کاهش آسیب اکسیداتیو و سمیت سلولی ناشی از پراکسید هیدروژن در سلول‌های BAE-1 شود.

واژه‌های کلیدی: سپستان، پراکسید هیدروژن، استرس اکسیداتیو، سلول اندوتلیال

ارجاع: فنودی س، حسینی آ، اثر محافظتی عصاره آبی-الکلی میوه گیاه سپستان در کاهش سمیت ناشی از پراکسید هیدروژن در سلول‌های اندوتلیال آئورت گاو (BAE-1): یک مطالعه آزمایشگاهی. *مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان*، سال ۱۴۰۳، دوره ۲۳ شماره ۷، صفحات: ۶۰۵-۶۲۱

۱- استادیار، گروه علوم پایه پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی نیشابور، نیشابور، ایران

۲- دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

دانشیار، مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تلفن: ۰۵۱-۳۸۰۰۲۲۷۰، پست الکترونیکی: hoseini@ums.ac.ir

مقدمه

سلول‌های اندوتلیال نقش اساسی در حفظ هموستاز عروقی دارند و در بسیاری از فرایندهای عروقی از جمله رگ‌زایی، پاسخ‌های التهابی و اتساع عروق درگیر می‌شوند (۱). شواهد فراوانی وجود دارد که نشان می‌دهد، افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) که از میتوکندری منشأ می‌گیرند، ارتباط نزدیکی با پاتوژنز بیماری‌های قلبی و عروقی مانند تصلب شرایین، آنفارکتوس میوکارد و نارسایی قلبی دارند. مطالعات تجربی و بالینی متعدد نشان داده‌اند که تجمع ROS به طور قابل توجهی در سلول‌های میوکارد که دچار اختلال عملکرد شده‌اند، افزایش می‌یابد. همچنین، مشخص شده است که تماس مزمن سلول‌های قلبی-عروقی با ROS، منجر به آپوپتوز، نکروز و فیبروز می‌شود که در نهایت خود باعث اختلال عملکرد قلب می‌شود (۲).

استرس اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن از یک سو و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی از سوی دیگر ایجاد می‌شود. در شرایط نرمال استرس اکسیداتیو از طریق زنجیره انتقال الکترون تولید می‌شود و به طور طبیعی به وسیله آنتی‌اکسیدان‌های سلولی مثل سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase; SOD)، کاتالاز (Catalase; CAT) و گلوکاتایون برداشته می‌شود. استرس اکسیداتیو به ترکیبات مختلف سلول از جمله پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک آسیب وارد می‌کند (۳).

تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان یکی از اثرات تجمع ROS در میوسیت‌های قلب است. برای مثال، در این شرایط، فعالیت SOD، CAT و گلوکاتایون پراکسیداز (Glutathione peroxidase; GPX) کاهش می‌یابد که خود منجر به تشدید فرآیند پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. در نتیجه افزایش

پراکسیداسیون لیپیدها، تولید مالون‌دی‌آلدهید (Malondialdehyde; MDA) و انواع رادیکال‌های آزاد بیشتر شده و دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول بیشتر تضعیف می‌شود. نتیجه نهایی این موارد در نهایت آزاد شدن مولکول‌های پیش برنده آپوپتوز از میتوکندری و مرگ سلول است (۴).

پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به عنوان مولد ROS نقش بسیار مهمی در اختلالات عروقی ایفاء می‌کند. بسیاری از مطالعات نشان داده است که پراکسید هیدروژن می‌تواند باعث صدمه و القاء آپوپتوز در سلول‌های اندوتلیال شود (۵). بنابراین، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند به کاهش عوارض کمک کند.

از آن جا که گیاهان دارویی حاوی ترکیباتی همچون پلی‌فنول‌ها، بتاکاروتن و توکوفرول می‌باشند، می‌توانند در آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو نقش محافظتی نشان دهند. مطالعات نشان دادند گیاهان دارویی مانند زعفران (۶)، *Phyllanthus emblica* (۷) و *Melissa officinalis* (۸) توانسته‌اند سمیت ناشی از H_2O_2 در سلول‌های اندوتلیال را کاهش دهند. همچنین، ترکیبات تانن و پلی‌فنول موجود در گیاهانی مانند انار به واسطه اثرات آنتی‌اکسیدانی سبب محافظت از سلول‌های BAE-1 شده‌اند (۹). امروزه مطالعات جهت تولید داروهای جدید از منابع طبیعی از جمله گیاهان به علت عوارض جانبی کمتر، رونق زیادی گرفته است. گیاهان دارویی از دیر باز و در طب سنتی و اسلامی در ایران مصرف بالایی داشته‌اند. اقبال عمومی بالا، پذیرش دارو، دسترسی آسان‌تر و قیمت پایین‌تر گیاهان دارویی از جمله دلایل استفاده از این ترکیبات در بهبود بیماری‌ها می‌باشد (۱۰).

سپستان (*Cordia myxa*)، گیاهی از تیره گاوبانیان، گونه‌ای از خانواده Boraginaceae است که گل‌های سفید و مودار آن در فروردین و اردیبهشت شکوفا و میوه قهوه‌ای کمرنگ تا صورتی و شیرین آن در تیر یا مرداد ظاهر می‌شود (شکل ۱). جنس *Cordia*

یک مطالعه اخیر، اثر محافظتی عصاره متانولی سپستان در یک مدل حیوانی سمیت قلبی القاء شده توسط دوکسوروبیسین در موش صحرایی بررسی گردید. عصاره باعث بهبود مارکرهای آسیب قلبی شامل لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase; LDH) و کراتین کیناز عضلات قلب (Creatine kinase; CK-MB)، و هم‌چنین مارکرهای آسیب اکسیداتیو شامل گلووتاتیون و پتانسیل روبش‌گری رادیکال‌های آزاد و مقابله با استرس اکسیداتیو، به دلیل حضور ترکیبات واجد خصوصیات آنتی‌اکسیدانی از جمله ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در میوه این گیاه می‌باشد (۱۱).

با توجه به این‌که استرس اکسیداتیو سبب آسیب به سلول‌های قلب و عروق می‌شود، و هم‌چنین با توجه به مزایای ترکیبات آنتی‌اکسیدان برای کاهش آسیب‌های اکسیداتیو، ضرورت استفاده از ترکیبات جدید با منشاء گیاهی برای مقابله با این آسیب‌ها احساس می‌شود (۱۷). لذا در این مطالعه بر آن شدیم تا به تعیین اثر عصاره میوه گیاه سپستان در کاهش سمیت ناشی از H_2O_2 در سلول‌های اندوتلیال آئورت گاو بپردازیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه آزمایشگاهی با کد اخلاق IR.MUMS.MEDICAL.REC.1398.239 به تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد رسید و در سال ۱۳۹۹ مراحل آزمایشگاهی آن انجام گردید. گیاه سپستان از منابع تجاری تهیه و توسط مسئول هرباریوم دانشگاه فردوسی شناخته و تأیید گردید (شماره هرباریوم: E-1644-FUMH). به منظور عصاره‌گیری پس از آسیاب کردن، مقدار ۵۰ گرم از پودر گیاه در حلال اتانول ۷۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه سوکسله (Electrothermal, UK) قرار داده شد (۱۸). عصاره حاصل روی بن‌ماری خشک شد

گونه‌های متفاوتی مانند *C. francisci*, *C. cerratifolia*, *C. myxa* دارد. سپستان از شرق مدیترانه تا شرق هندوستان به طور بومی وجود دارد. در ایران غیربومی است و از زمان‌های پیش وارد ایران شده است و در سواحل و جزایر جنوبی و جنوب کشور کشت می‌شود (۱۱). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که این گیاه از ترکیبات مختلفی مانند (۵/۸۶ درصد) Stigmasterol، (۶/۳۸ درصد) Phytol، (۵/۲۸ درصد) Linoleic acid، (۰/۹۹ درصد) Ascorbic acid، (۹/۹۴ درصد) Olealdehyde، (۴/۸۶ درصد) Stigmastanol، (۳/۴۶ درصد) γ -Sitosterol تشکیل شده است. هم‌چنین حضور ترکیبات فنولی مانند گالیک اسید، کاتچین، کلروژنیک اسید، والنیک اسید، پی-کوماریک، روتین، کامفرول و کوئرستین در عصاره میوه سپستان، به تأیید رسیده است (۱۲).



شکل ۱- گیاه سپستان

این گیاه در طب سنتی به صورت خوراکی برای درمان عفونت‌های تنفسی و گلودرد به کار می‌رفته است (۱۳). پالپ این گیاه برای درمان آبسه‌ها، تسکین دردهای روماتیسمی (۱۴)، و میوه، دانه و برگ آن به عنوان دیورتیک، درمان عفونت‌های ادراری، بیماری‌های ریوی و ضد کرم به کار می‌رفته است. استفاده از برگ‌های آن برای درمان عفونت‌های پوستی و زخم‌ها از کاربردهای دیگر آن است. اثرات ضد التهاب و ضد درد، تعدیل سیستم ایمنی، ضد انگل و ضد کرم، اثر کاهنده فشارخون و بهبود عملکرد تنفسی نیز در مطالعات نشان داده شده است (۱۵). در

و برای مراحل بعدی در دمای منهای ۱۸ درجه سلسیوس نگهداری شد.

محتوای ترکیبات فنلی عصاره با روش فولین-سیوکالتئو (Folin-Ciocalteu) تعیین گردید (۱۹). حجم ۲۰ میکرولیتر از عصاره گیاه (با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) و یا اسیدگالیک به عنوان استاندارد (با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر) به طور جداگانه با ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتئو و ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۱ مول در لیتر) مخلوط شد. حجم نمونه‌ها با آب دیونیزه به ۲ میلی لیتر رسانده شد. پس از ۲ ساعت، جذب نوری نمونه‌ها با دستگاه طیف سنج (Cecil BioQuest CE 2501 Life Science Spectrophotometer, UK) در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد برای اسیدگالیک رسم شد و محتوای ترکیب فنلی عصاره به صورت میلی گرم معادل اسید گالیک در هر گرم عصاره بیان شد (۱۹).

برای تعیین محتوای فلاونوئیدها در عصاره گیاه از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد (۲۰). حجم ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاه (با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) و یا فلاونوئید روتین (Rutin) به عنوان استاندارد (با غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) به طور جداگانه با ۱/۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شدند. پس از ۱۰ دقیقه، جذب نوری نمونه‌ها با دستگاه طیف‌سنج در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد برای روتین رسم شد و محتوای ترکیبات فلاونوئیدی به صورت میلی گرم معادل روتین در هر گرم عصاره بیان شد (۲۱).

در زمان استفاده از عصاره گیاه به منظور حل شدن کامل از دی‌متیل سولفوکسید (Dimethyl sulfoxide; DMSO) استفاده گردید و به گونه‌ای به محیط کشت اضافه شد که درصد DMSO

بیشتر از ۱٪ نگردد (۲۲). رده سلولی اندوتلیال آئورت گاو (Bovine Aortic Endothelial; BAE-1) از بانک سلولی انستیتو رویان تهیه شد و در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum; FBS) و پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر) / استرپتومایسین (۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر) کشت داده شده و سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ (LEEC Automatic CO₂ Incubator, UK) نگهداری شد. پس از پاساژ سلولی جهت تست 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند.

جهت انجام آزمایش‌ها، سلول‌ها به میزان ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت که سلول‌ها به کف پلیت متصل شدند محیط کشت قبلی با محیط کشت تازه حاوی عصاره گیاهی (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲ میکروگرم در میلی لیتر) تعویض گردید (۱۱). درصد سلول‌های زنده با استفاده از رنگ MTT ارزیابی گردید. این رنگ با نفوذ به غشاء سلول‌های زنده که دارای فعالیت میتوکندریایی هستند، به رنگ بنفش کریستال‌های فورمازان تبدیل می‌شود. حل کردن کریستال‌های رنگی فورمازان در DMSO باعث امکان اندازه‌گیری آن با دستگاه اسپکتروفتومتری (Spekol-1500, Germany) می‌شود. بنابراین، می‌توان انتظار داشت هرچه سلول‌های زنده در محیط بیشتر باشد رنگ بنفش حاصله بیشتر باشد. هم اکنون از تست MTT به منظور ارزیابی سمیت سلولی و یافتن سلول‌های زنده به طور گسترده استفاده می‌شود (۲۳). در این مطالعه ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر) به هر کدام از خانه‌های ۹۶ تایی اضافه شد و سلول‌ها به مدت سه ساعت در انکوباتور در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پس از این‌که محیط سلول‌ها دور ریخته شد به رسوب

چرب غیراشباع متناسب است (۲۵). لذا اندازه‌گیری MDA شاخص مناسبی برای پراکسیداسیون لیپید می‌باشد.

به این منظور سلول‌ها در پلیت ۶ خانه کشت داده شدند (۱۰^۶ × ۱/۵)، سپس سلول‌ها با ۲ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید (Trichloroacetic acid; TCA) اسکراب شد و به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ (bh-1200، شرکت بهداد، ایران) شدند. پس از انجام مراحل بالا، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و همراه با ۴۰۰ میکرولیتر از محلول TCA و ۸۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۷ درصد تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituric acid; TBA) به ویال ۵ میلی‌لیتری اضافه شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و سپس به آن ۳ میلی‌لیتر n-بوتانل اضافه شد. پس از ورتکس، ۲۰۰ میکرولیتر از آن به پلیت ۹۶ خانه منتقل شد و جذب آن در طول موج تحریک ۵۳۰ نانومتر و نشر ۵۵۰ نانومتر خوانده شد (۲۶).

قطعه قطعه شدن DNA (DNA Fragmentation)، از جمله رخدادهایی است که در آپوپتوز رخ می‌دهد و طی آن قطعات مونو و الیگونوکلیئوزومال DNA تشکیل می‌گردند. در صورت نفوذپذیر کردن سلول توسط محلول هیپوتونیک (سدیم سترات ۰/۱ درصد و تریتون ایکس صد ۰/۱ درصد) قطعات DNA با وزن مولکولی کم (Low Molecular Weight DNA) از سلول خارج می‌گردند و در نتیجه سلول‌های آپوپتوتیک، محتوای DNA کمتری دارند و در رنگ‌آمیزی با رنگ PI (Iodide Propidium) در سلول‌های آپوپتوتیک قبل از G₁ Peak، پیک دیگری دیده می‌شود که نشان دهنده درصد آپوپتوز می‌باشد (۲۷).

جهت بررسی آپوپتوز، سلول‌ها به سه گروه شامل کنترل، عصاره (۲۵-۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و H₂O₂ (۲۰۰ میکرومولار) تقسیم شدند. در این روش سلول‌ها در پلیت ۲۴ خانه به میزان ۱۰۰،۰۰۰ سلول در هر خانه کشت شدند. سلول‌ها به مدت ۲۴

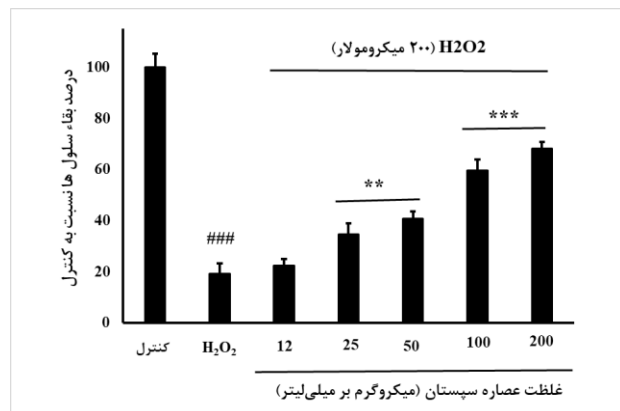
(سلول‌ها و بلورهای حاصله از محلول) ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه Stat FAX 303 plate reader (ایالات متحده آمریکا، همیار طب کالا) اندازه‌گیری شد (۲۳). با این روش میزان زنده‌مانی سلول‌های اندوتلیال در برابر سمیت ناشی از H₂O₂ مورد ارزیابی قرار گرفت. گروه‌های مورد مطالعه شامل کنترل، عصاره و H₂O₂ بودند. در گروه کنترل به همان میزان که در گروه عصاره DMSO اضافه شده بود، اضافه گردید تا شرایط مشابه باشد و ضمناً از عدم سمیت حلال اطمینان حاصل شود. ابتدا سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره میوه سپستان با غلظت ۱۲-۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفتند، بعد از ۲۴ ساعت، ۲۰۰ میکرومولار از H₂O₂ بر اساس مطالعات قبلی (۲۴) افزوده شد و پس از نیم‌ساعت ارزیابی زنده‌مانی انجام گرفت.

برای سنجش میزان رادیکال‌های آزاد توسط فلوسایتومتری، سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند و طبق پروتکل‌های گفته شده، مراحل آماده‌سازی سلول‌ها انجام شد. سپس با پروب دی‌کلرودی‌فلئورسین دی‌استات (Dichlorodifluorescein diacetate; DCFDA) با غلظت ۲۰ میکرومولار به مدت ۳۰ دقیقه و در تاریکی انکوبه شدند. بعد از آن ابتدا با بافر فسفات سالین (Phosphate Buffer Saline; PBS) شسته شدند و شدت فلورسنت حاصل در طول موج تحریک ۴۸۵ نانومتر و طول موج نشر ۵۳۵ نانومتر با استفاده از دستگاه فلوریمتر fluorescence Victor X5 2030 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Shelton, Connecticut) اندازه‌گیری گردید (۲۴).

برای ارزیابی میزان پراکسیداسیون چربی‌ها در سلول‌های BAE-1 از روش سنجش میزان ترکیبات واکنش‌دهنده با تیوباربیتوریک اسید استفاده شد. MDA از پراکسیداسیون لیپیدها تولید می‌شود و میزان تولید آن با شکست و تفکیک اسیدهای

میزان تام ترکیبات فنولی در عصاره هیدروالکی گیاه معادل ۳۸ میلی گرم در هر گرم از عصاره خشک بود. میزان ترکیبات فلاونویدی در عصاره هیدروالکی گیاه معادل ۶ میلی گرم در هر گرم از عصاره خشک بود.

سلول‌های BAE-1 با دوزهای مختلف عصاره میوه گیاه سپستان (۲۰۰-۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۲۴ ساعت پیش تیمار شدند، سپس H_2O_2 اضافه شد و پس از گذشت نیم ساعت، درصد سلول‌های زنده با آزمون MTT تعیین گردید. همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، با افزایش دوز عصاره سپستان، میزان بقاء سلول‌ها افزایش می‌یابد و میزان بقاء در تمامی دوزها به جزء ۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر، تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه پراکسید هیدروژن داشتند ($P < 0.05$).



نمودار ۱- اثر پیش تیمار غلظت‌های مختلف عصاره میوه سپستان بر درصد زنده ماندن سلول‌های BAE-1 در برابر سمیت ناشی از پراکسید هیدروژن. آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey، نمودار به صورت "انحراف استاندارد میانگین $\pm$ میانگین" گزارش شده است. ($P < 0.001$) و ($P < 0.001$) اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه پراکسید هیدروژن، ($P < 0.001$) اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل.

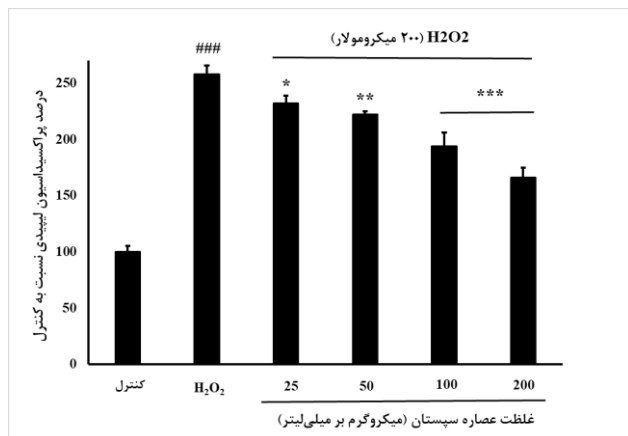
نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره میوه سپستان بر میزان ROS تولید شده ناشی از پراکسید هیدروژن در سلول‌های BAE-1 در نمودار ۲ نمایش داده شده است. H_2O_2 باعث افزایش معنی‌دار میزان ROS در سلول‌های BAE-1 نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.001$). غلظت‌های مختلف عصاره میوه سپستان به صورت

ساعت با غلظت‌های مختلف عصاره سپستان (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) که در تست MTT توانستند سمیت H_2O_2 را کاهش دهند، مواجه شده و سپس در معرض پراکسید هیدروژن با غلظت ۲۰۰ میکرومولار به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس سلول‌ها به میکروتیوب‌های ۲ میلی لیتری منتقل و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی خارج شد و به هر چاهک ۵۰۰ میکرولیتر از بافر Propidium Iodide اضافه شد و پس از گذشت سی دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، میکروتیوب‌ها در دمای ۴ درجه و به دور از نور، به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند و سپس سنجش با فلوسیتومتری (FAC scan flow cytometer) انجام گرفت. بررسی Sub-G₁ Peak در دستگاه فلوسیتومتری (بی دی بیوساینس، ایالات متحده آمریکا) انجام شد و توسط نرم افزار فلوجو آنالیز گردید (۲۸).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های این مطالعه توسط نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۸ انجام شد و منحنی‌های مربوطه توسط این نرم افزار رسم شدند. نتایج به صورت "انحراف استاندارد میانگین $\pm$ میانگین" گزارش شده است و جهت مقایسه نتایج مربوط به زنده ماندن سلول‌ها، آپوپتوز، پراکسیداسیون لیپیدی و رادیکال‌های آزاد در گروه‌های مختلف (غلظت‌های مختلف عصاره، کنترل و H_2O_2) از آنالیز واریانس یک طرفه به همراه آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. پیش فرض‌های آنالیز واریانس که شامل نرمال بودن توزیع خطاها و همگنی واریانس خطاها می‌باشد به ترتیب به کمک آزمون‌های Kolmogorov-Smirnov و Levene مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن‌ها معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

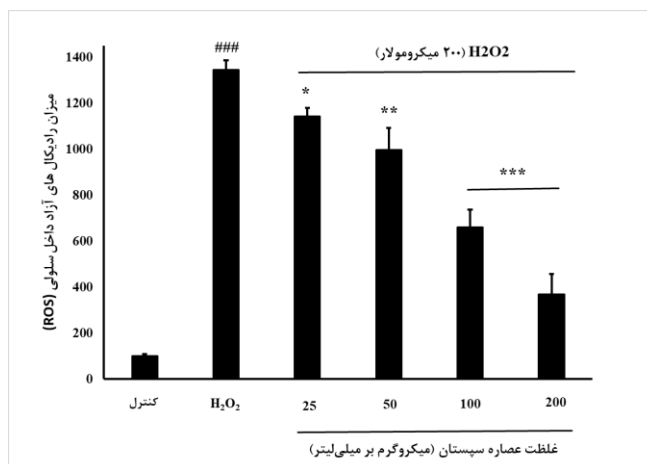
وابسته به دوز باعث کاهش معنی‌دار میزان MDA نسبت به گروه H_2O_2 شده است.



نمودار ۳- اثر پیش تیمار غلظت‌های مختلف عصاره میوه سپستان بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از پراکسید هیدروژن. آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey. نمودار به صورت "انحراف استاندارد میانگین $\pm$ میانگین" گزارش شده است. ($P < 0.05$), ($P < 0.01$) و ($P < 0.001$) اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل ($P < 0.001$) اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل

تصویر ۱، هیستوگرام‌های مربوط به فلوسایتومتری در بررسی اثر عصاره میوه سپستان بر میزان آپوپتوز ناشی از پراکسید هیدروژن در سلول‌های BAE-1 را نشان می‌دهد. همان‌طور که نشان داده شده، پراکسید هیدروژن باعث افزایش معنی‌دار میزان آپوپتوز در سلول‌های BAE-1 نسبت به گروه کنترل شده است. عصاره میوه سپستان به‌صورت وابسته به دوز باعث کاهش میزان آپوپتوز نسبت به گروه پراکسید هیدروژن شد ($P < 0.01$) (نمودار ۴).

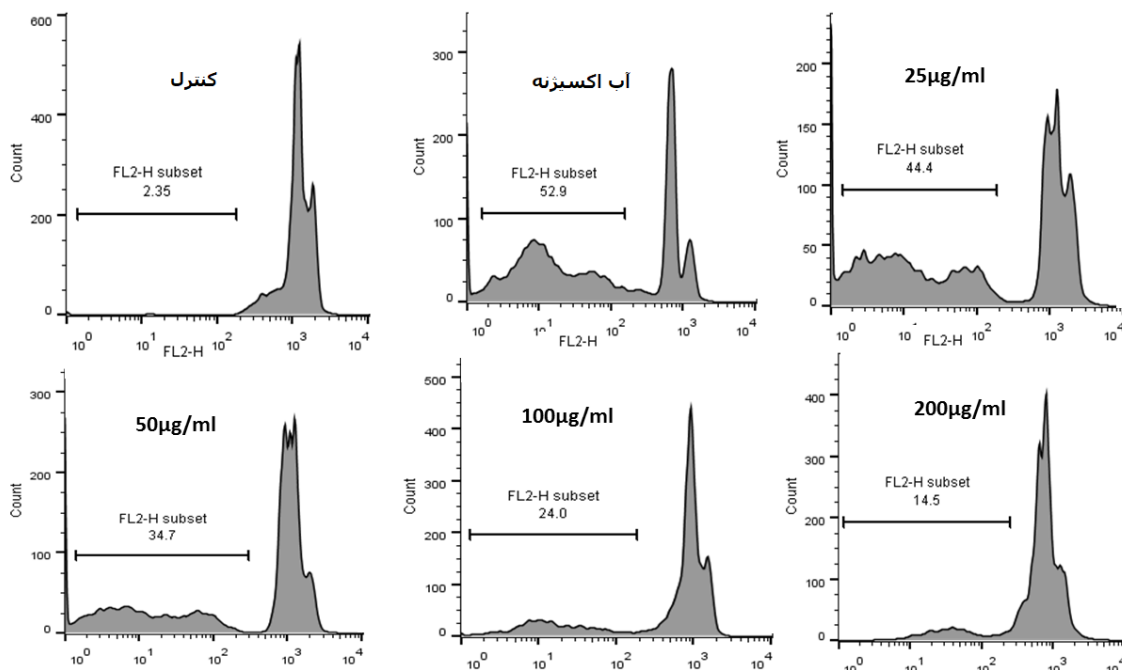
وابسته به دوز و در تمامی گروه‌ها (۲۵-۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) باعث کاهش معنی‌دار میزان ROS در مقایسه با گروه H_2O_2 گردید. بین اثر محافظتی دوزهای ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با هم اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($P > 0.05$)



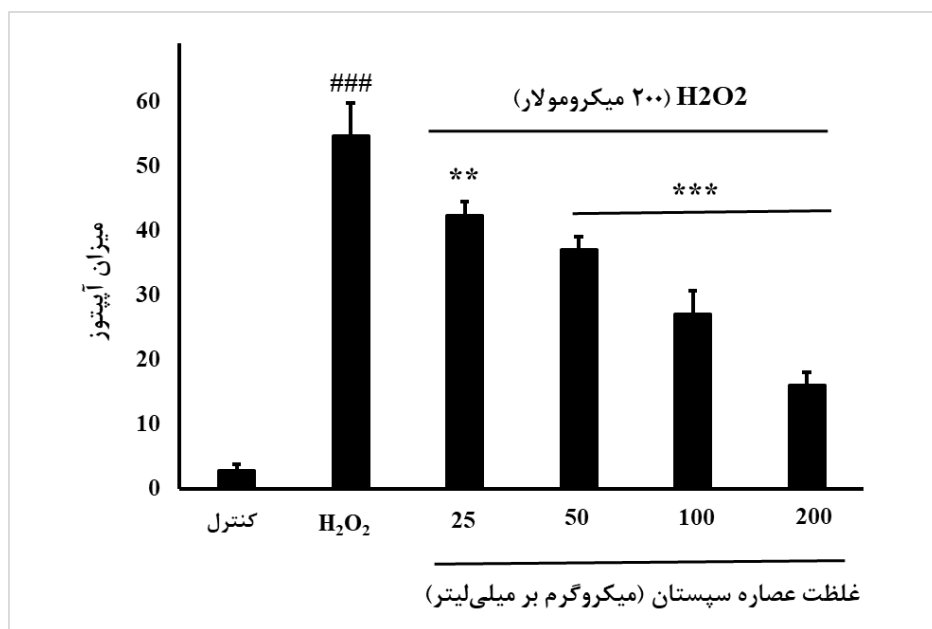
نمودار ۲- اثر پیش تیمار غلظت‌های مختلف عصاره میوه سپستان بر میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از پراکسید هیدروژن. آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey. نمودار به صورت "انحراف استاندارد میانگین $\pm$ میانگین" گزارش شده است. ($P < 0.05$), ($P < 0.01$) و ($P < 0.001$) اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه پراکسید هیدروژن، ($P < 0.001$) اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل.

نمودار ۳، نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره میوه سپستان بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از پراکسید هیدروژن در سلول‌های BAE-1 را نشان می‌دهد. همان‌طور که قابل مشاهده است، H_2O_2 باعث افزایش

معنی‌دار میزان MDA در سلول‌های BAE-1 نسبت به گروه کنترل شده است ($P < 0.01$) و عصاره میوه سپستان به صورت



تصویر ۱- هیستوگرام‌های مربوط به درصد آپتوز سلول‌های BAE-1 پیش تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره میوه سپستان و تیمار شده با پراکسید هیدروژن



نمودار ۲- اثر پیش تیمار غلظت‌های مختلف عصاره میوه سپستان بر میزان آپتوز ناشی از پراکسید هیدروژن. آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey. نمودار به صورت "انحراف استاندارد میانگین $\pm$ میانگین" گزارش شده است. ($P < 0.01$) و ($P < 0.001$) اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه پراکسید هیدروژن، ($P < 0.001$) اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل

مواجه شده با H_2O_2 کاهش می‌دهد و از طریق این اثرات آنتی‌اکسیدانی موجب کاهش معنی‌دار در میزان آپتوز این سلول‌ها می‌شود.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که عصاره میوه سپستان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی را در سلول‌های اندوتلیال

امروزه مطالعات متعددی جهت بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی به‌عنوان یک استراتژی جهت پیش‌گیری و یا درمان بهتر بیماری‌های مرتبط با رادیکال‌های آزاد صورت گرفته است. در فرهنگ‌های بومی و طب سنتی، گیاهان دارویی و ترکیبات مشتق از آن‌ها به طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرند و امروزه به عنوان جایگزین‌های طبیعی به جای درمان‌های شیمیایی مورد استقبال مردم قرار گرفته‌اند (۲۹).

مطالعات مختلف نشان داده است ترکیبات آنتی‌اکسیدان طبیعی ممکن است داروهای مناسبی برای بیماری‌های قلبی-عروقی باشند. از آنجایی که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز این دسته از بیماری‌ها بازی می‌کند، در نتیجه ترکیبات آنتی‌اکسیدان ممکن است راه جدیدی را در درمان این بیماری‌ها باز کنند (۳۰).

تاکنون مطالعه‌ای بر روی اثر محافظتی *C. myxa* بر سمیت ناشی از پراکسید هیدروژن در سلول‌های اندوتلیال انجام نشده است، لذا در این مطالعه اثر عصاره میوه گیاه سپستان بر سمیت ناشی از پراکسید هیدروژن در سلول‌های BAE-1 مورد بررسی قرار گرفت. پیش‌تیمار با عصاره میوه سپستان به‌صورت وابسته به دوز باعث افزایش بقاء و کاهش آپوپتوز سلول‌های در معرض پراکسید هیدروژن شد. در مطالعات مختلف نشان داده شده که پراکسید هیدروژن با غلظت ۲۰۰-۱۰۰ میکرومولار باعث سمیت قابل ملاحظه می‌گردد و مواد دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌توانند میزان سمیت آن را کاهش دهند. در مطالعه قبلی Hosseini و همکارش در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که عصاره ریشه رثوم‌تورکستانیکوم توانست استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 را در سلول‌های اندوتلیال کاهش دهد (۲۴). در مطالعه دیگری، عصاره گیاه *Rheum tanguticum* سمیت ناشی از H_2O_2 را به میزان قابل توجهی کاهش داد (۳۱). مطالعه دیگری نشان داد که عصاره برگ *Malus doumeri* میزان زنده‌مانی سلول‌های کاردیومیوسیت در

برابر استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 را افزایش داد (۳۲). بنابراین، گیاهان به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و کاهش رادیکال‌های آزاد می‌توانند استرس اکسیداتیو را تا حدودی کاهش دهند.

در مطالعه Keshani-Dokht و همکاران، نشان داده شد که با افزایش غلظت عصاره سپستان، درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (Diphenyl-2-Picryl-Hydrazyl) افزایش می‌یابد. بر این اساس، می‌توان دریافت که *C. myxa* یک ترکیب دهنده الکترون بوده که می‌تواند با رادیکال‌های آزاد واکنش نشان دهد و در نتیجه محصولات با پایداری بالا تولید کند. اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای Phenol در *C. myxa* نشان‌دهنده نقش مؤثر فنول‌ها مانند گالیک اسید، کاتچین، کلروژنیک‌اسید، والنیک‌اسید، پی-کوماریک، روتین و کامفرول در توانایی آنتی‌اکسیدانی *C. myxa* است (۳۳). همچنین، در مطالعه‌ای فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره *C. myxa* با استفاده از روش DPPH اندازه‌گیری و با اسیدآسکوربیک مقایسه شد که یک میلی‌گرم عصاره خام معادل ۱۵ میکروگرم اسیدآسکوربیک برآورد شد (۳۴). در مطالعه Singh و همکاران، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی دانه‌ها و برگ‌های *C. dichotoma* بررسی شد. استفاده از ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی دانه به ترتیب باعث مهار ۸۱/۲۴ درصد و ۸۸/۵ درصد رادیکال‌های آزاد DPPH و H_2O_2 شد، در حالی که ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره متانولی برگ به ترتیب ۸۵/۴۶ و ۸۸/۶ درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و H_2O_2 را باعث شد که طبق آن مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌ها از دانه قوی‌تر بود (۳۵). مطالعه دیگری نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره میوه سپستان را در محیط برون‌تنی نشان داد (۳۶).

مطالعه Ashour و همکارانش، اثرات عصاره متانولی *C. myxa* در برابر سمیت ناشی از دوکسوروبیسین (doxorubicin; DOX)

پراکسید هیدروژن در سلول‌های اندوتلیال ورید جفتی انسان (Human umbilical vein endothelial cells; HUVE) انجام شده بود، نشان داده شد که این گیاه به دلیل اثرات آنتی اکسیدانی می‌تواند از سلول‌های HUVEC در مقابل سمیت پراکسید هیدروژن محافظت کند (۸).

در یک مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی *C. myxa* مبتنی بر کاهش DPPH که یک رادیکال آزاد پایدار است، بررسی شد. این مطالعه نشان داد که عصاره تهیه شده از میوه تازه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدان قوی‌تری نسبت به عصاره میوه خشک است و این خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی است که می‌تواند مسئول فعالیت آنتی‌فیبروتیک آن در برابر فیبروز ناشی از کربن‌تتراکلراید یا استامید باشد (۴۰). در مطالعه Ashour و همکاران، عصاره سپستان در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ دارای فعالیت آنتی-اکسیدانی بسیار خوبی بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی حتی از اسید آسکوربیک نیز فراتر بوده و محافظت خوبی در برابر کاهش GSH (Glutathione Reduced Form) ناشی از دوکسوروبیسین، تجمع MDA و افزایش فعالیت‌های نشانگرهای سرمی وجود داشت (۱۶). یافته‌های مطالعه حاضر همسو با نتایج آزمایش‌های Al-Awadi و همکاران (۴۱) در تقویت وضعیت آنتی‌اکسیدانی در مدل موشی کولیت و Afzal و همکاران (۳۴) در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی *C. myxa* در شرایط *in vitro* و اثرات محافظت‌کننده کبدی است. MDA در استرس اکسیداتیو به عنوان یک نشانگر پراکسیداسیون لیپیدی در نظر گرفته می‌شود و میزان آن با شکست و تفکیک اسیدهای چرب غیراشباع متناسب است (۴۲). در مطالعه حاضر پراکسید هیدروژن باعث افزایش معنی‌دار میزان MDA به دنبال لیپید پراکسیداسیون ناشی از استرس اکسیداتیو در سلول‌های BAE-1 نسبت به گروه کنترل شده است. در مطالعه Inas و همکاران، عصاره گیاه سپستان موجب مهار استرس اکسیداتیو و باعث کاهش سطح MDA در سلول‌های موکوزال

در موش‌ها را مورد بررسی قرار داد. در این مطالعه عصاره سپستان در شرایط آزمایشگاهی ویژگی آنتی‌اکسیدانی قوی نشان داد که به‌طور قابل توجهی در برابر تغییرات ناشی از DOX در نشانگرهای استرس اکسیداتیو (GSH و MDA) و نشانگرهای سرم قلبی (فعالیت‌های CK-MB و LDH) محافظت می‌کند (۱۶). در این مطالعه اثر عصاره میوه سپستان بر سمیت پراکسید هیدروژن در سلول‌های BAE-1 بررسی شد و مشاهده شد که با افزایش دوز عصاره سپستان، میزان بقاء سلول‌ها به‌صورت وابسته به دوز افزایش می‌یابد و میزان بقاء در تمامی دوزها به‌جز ۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر، تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه پراکسید هیدروژن داشته است. همچنین با افزایش دوز عصاره از ۱۰۰ به ۲۰۰، تفاوت معنی‌داری در افزایش بقاء سلولی مشاهده نشد. رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) مولکول‌های فعالی نظیر سوپراکسیدها، پراکسیدها و رادیکال هیدروکسیل هستند که در مواجهه با عوامل استرس‌زا بر مقدار آن‌ها افزوده شده و موجب آسیب به اجزای سلولی می‌شوند (۳۷).

عوامل بر هم‌زننده تعادل بین سیستم اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی در سیستم‌های بیولوژیک قادر به ایجاد استرس اکسیداتیو خواهند بود (۳۸). داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد غلظت‌های مختلف عصاره میوه سپستان به‌صورت وابسته به دوز و در تمامی گروه‌ها ۲۵-۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث کاهش معنی‌دار میزان ROS در مقایسه با گروه H_2O_2 می‌گردد. پراکسید هیدروژن باعث افزایش میزان ROS می‌شود. بنابراین، ترکیباتی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند از طریق به دام‌انداختن رادیکال‌های آزاد در کاهش سمیت ناشی از پراکسید هیدروژن نقش دارند. به عنوان مثال ماده مؤثره زعفران با کاهش قابل توجه میزان ROS، سمیت پراکسید هیدروژن را کاهش داد (۳۹). همچنین، در مطالعه‌ای که برای بررسی اثر محافظتی عصاره گیاه بادرنبویه (*Melissa officinalis*) در مقابل سمیت ناشی از

پراکسید هیدروژن شد. در مطالعه قبلی که توسط Hosseini و همکارش انجام گردید، نشان داده شد که پراکسید هیدروژن میزان آپوپتوز در سلول‌های اندوتلیال را افزایش داد، در حالی که عصاره رثوم‌تورکستانیکوم میزان آپوپتوز ناشی از پراکسید هیدروژن را کاهش داد (۲۴). با توجه به اثرات دیده شده از گیاه سپستان می‌توان قسمتی از نتایج را ناشی از حضور ترکیبات فنولی مانند کوئرستین، گالیک اسید، کامفرول و غیره در این گیاه دانست.

در مطالعه قبلی نشان داده شد که کوئرستین به عنوان یک ماده مؤثره توانست استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 را از طریق کاهش رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی در سلول‌های اندوتلیال کاهش دهد (۲۴). مطالعه دیگری نشان داد که فسفریلاسیون کاوئولین می‌تواند سبب افزایش آسیب عروق به دنبال استرس اکسیداتیو شود که کوئرستین از طریق کاهش فسفریلاسیون این آنزیم منجر به اثر حفاظتی سلول‌های اندوتلیال گردید (۴۶). کامفرول به عنوان یکی دیگر از ترکیبات فنولی موجود در گیاه سپستان اثرات استرس اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن را در سلول‌های PC12 کاهش داد (۴۷). هم‌چنین، گالیک اسید و مشتقات آن استرس اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از پراکسید هیدروژن را در سلول‌های PC12 کاهش دادند (۴۸). بنابراین، قسمتی از اثرات مشاهده شده را می‌توان به حضور این ترکیبات در گیاه سپستان نسبت داد.

این تحقیق دارای محدودیت‌هایی می‌باشد که شامل عدم بررسی مسیرهای سیگنالینگ و فاکتورهای التهابی به دنبال تحریک استرس اکسیداتیو است. در تحقیقات آینده بهتر است مسیرهای سیگنالینگ و میزان بیان پروتئین‌های دخیل در آپوپتوز به روش وسترن بلات در سطح سلولی بررسی گردد تا مکانیسم دقیق آن مشخص گردد.

معده در معرض ایندومتاسین شد که اثر آن در کاهش پراکسیداسیون لیپیدی را نشان داد (۴۳). هم‌چنین، در مطالعه Thirupathi و همکاران نشان داده شد عصاره *C. dichotoma* با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فعالیت محافظت کبدی در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از کربن‌تتراکلرید ایجاد می‌کند و عملکرد آن نیز ممکن است به دلیل مهار تشکیل پراکسید لیپید باشد و به طرز معنی‌داری باعث کاهش سطح MDA می‌گردد. هم‌چنین، سطح فعالیت آنتی‌اکسیدان کل را تا حدی افزایش می‌دهد. در این مطالعه نشان داده شده عمل محافظت کبدی همراه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ممکن است یک اثر هم‌افزایی در جلوگیری از شروع و پیشرفت بیماری‌های سلول کبدی داشته باشد (۴۴). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داده است عصاره میوه سپستان به صورت وابسته به دوز باعث کاهش معنی‌دار میزان MDA نسبت به گروه H_2O_2 شده است.

قطعه قطعه شدن DNA (DNA Fragmentation)، از جمله رخدادهایی است که در آپوپتوز رخ می‌دهد و طی آن قطعات مونو و الیگونوکلوئوزومال DNA تشکیل می‌گردند. تجمع بیش از حد پراکسید هیدروژن باعث افزایش تولید نیتریک اکساید در سلول‌های اندوتلیال می‌شود. مقادیر زیاد نیتریک اکساید سبب فعال شدن آبشار کاسپاز می‌شود و در نتیجه سبب اختلال در هموستاز کلسیم داخل سلولی، آپوپتوز سلول‌های عروقی و افزایش پیش‌رونده در نفوذپذیری عروق کوچک می‌شود. بنابراین، پراکسید هیدروژن از طریق آسیب غشاء سلولی باعث مرگ سلول‌های اندوتلیالی می‌گردد (۴۵). داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد پراکسید هیدروژن باعث افزایش معنی‌دار میزان آپوپتوز در سلول‌های BAE-1 نسبت به گروه کنترل شده است. هم‌چنین، پیش‌تیمار سلول‌های اندوتلیال با عصاره میوه سپستان به صورت وابسته به دوز باعث کاهش میزان آپوپتوز نسبت به گروه

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر نشان داده شد که تیمار سلول‌های BAE-1 با عصاره میوه گیاه سپستان به صورت وابسته به دوز باعث افزایش بقاء سلول‌های اندوتلیال در معرض پراکسید هیدروژن شده و سبب کاهش پارامترهای استرس اکسیداتیو مانند MDA و ROS می‌شود. علاوه بر این، عصاره میوه گیاه سپستان سبب کاهش درصد سلول‌های آپوپتوتیک ناشی از سمیت با پراکسید هیدروژن گردید. بنابراین، استفاده از عصاره‌های گیاهی همچون سپستان می‌تواند استرس اکسیداتیو را کاهش دهند و از این رو ممکن است بتوان در مطالعات بالینی از آن‌ها به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان جهت بهبود عملکرد قلب و عروق استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان از تمامی همکاران مرکز تحقیقات فارماکولوژیک گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که ما را در این مسیر یاری نمودند و همچنین از معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد که بودجه این طرح را تأمین نمودند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض در منافع: نویسندگان این مقاله اظهار می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

حامی مالی: هزینه‌های انجام این طرح توسط معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد تأمین شده است.

ملاحظات اخلاقی (کد اخلاق): این مطالعه بر اساس پروتکل‌ها و دستورالعمل‌های توصیه شده، انجام شد و دارای کد اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی مشهد به شماره IR.MUMS.MEDICAL.REC.1398.239 می‌باشد.

مشارکت نویسندگان

- طراحی ایده: آذر حسینی
- روش کار: آذر حسینی، سحر فنودی
- جمع‌آوری داده‌ها: سحر فنودی
- تجزیه و تحلیل داده‌ها: سحر فنودی
- نظارت: آذر حسینی
- مدیریت پروژه: آذر حسینی
- نگارش - پیش‌نویس اصلی: سحر فنودی
- نگارش - بررسی و ویرایش: آذر حسینی، سحر فنودی.

References

1. Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. *Biomed Res International* 2014; 2014.
2. Maack C, Dabew ER, Hohl M, Schäfers H-J, Böhm M. Endogenous activation of mitochondrial KATP channels protects human failing myocardium from hydroxyl radical-induced stunning. *Circulation Res* 2009; 105(8): 811-7.
3. K Jain A, K Mehra N, K Swarnakar N. Role of antioxidants for the treatment of cardiovascular diseases: challenges and opportunities. *Current Pharmaceutical Design* 2015; 21(30): 4441-55.
4. Huang H, Geng Q, Yao H, Shen Z, Wu Z, Miao X, et al. Protective effect of scutellarin on myocardial infarction induced by isoprenaline in rats. *Iranian J Basic Med Sci* 2018; 21(3): 267.

5. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovascular Res* 2005; 68(1): 26-36.
6. Rahiman N, Akaberi M, Sahebkar A, Emami SA, Tayaran-Najaran Z. Protective effects of saffron and its active components against oxidative stress and apoptosis in endothelial cells. *Microvascular Res* 2018; 118: 82-9.
7. Wongpradabchai S, Chularojmontri L, Phornchirasilp S, Wattanapitayakul SK. Protective effect of Phyllanthus emblica fruit extract against hydrogen peroxide-induced endothelial cell death. *J Med Assoc Thai* 2013; 96(Suppl 1): 40-8.
8. Safaeian L, Sajjadi SE, Javanmard SH, Montazeri H, Samani F. Protective effect of Melissa officinalis extract against H₂O₂-induced oxidative stress in human vascular endothelial cells. *Res Pharmaceutical Sci* 2016; 11(5): 383.
9. Ciampi F, Gandy J, Ciliberti MG, Sevi A, Albenzio M, Santillo A. Pomegranate (Punica granatum) By-Product Extract Influences the Oxylipids Profile in Primary Bovine Aortic Endothelial Cells in a Model of Oxidative Stress. *Frontiers in Animal Sci* 2022; 3: 837279.
10. Mollazadeh H, Hosseinzadeh H. The protective effect of Nigella sativa against liver injury: a review. *Iranian J Basic Med Sci* 2014; 17(12): 958.
11. Al-Musawi MH, Ibrahim KM, Albukhaty S. In vitro study of antioxidant, antibacterial, and cytotoxicity properties of Cordia myxa fruit extract. *Iranian J Microbiol* 2022; 14(1): 97.
12. El-Massry KF, Farouk A, Mahmoud KF, El-Ghorab AH, Musa A, Mostafa EM, et al. Chemical characteristics and targeted encapsulated Cordia myxa fruits extracts nanoparticles for antioxidant and cytotoxicity potentials. *Saudi J Biological Sci* 2021; 28(9): 5349-58.
13. Mohtasham N, Zarei Ahmadi A, Alisamir M, Shakiba Maram N, Larki A. Preparation of Sepestan Anti-cough Syrup and Comparison of its Effectiveness With Diphenhydramine Syrup in Treating Cough in Children With Upper Respiratory Tract Infection: A Double-blind Randomized Clinical Trial. *Jundishapur Sci Med J* 2022; 21(4): 574-85.
14. Al-Snafi AE. The Pharmacological and therapeutic importance of Cordia myxa-A review. *IOSR J Pharmacy* 2016; 6(6): 47-57.
15. Al-Khafaji SA, Alsaadawi MA, Al-Yasari AM, Al-Saadawe MA. Article review: Cordia myxa L.: The gift of the nature, A Review. *Basrah J Agricultural Sci* 2021; 34(2): 267-77.
16. Ashour OM, Abdel-Naim AB, Abdallah HM, Nagy AA, Mohamadin AM, Abdel-Sattar EA. Evaluation of the potential cardioprotective activity of some Saudi plants against doxorubicin toxicity. *Zeitschrift Für Naturforschung C* 2012; 67(5-6): 297-307.
17. Chang X, Zhang T, Zhang W, Zhao Z, Sun J. Natural drugs as a treatment strategy for cardiovascular disease through

- the regulation of oxidative stress. *Oxidative Med and Cellular Longevity* 2020; 2020(1): 5430407.
18. Zhang Q-W, Lin L-G, Ye W-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Med* 2018; 13: 1-26.
 19. Hooshmand S, Mahdinezhad MR, Taraz Jamshidi S, Soukhtanloo M, Mirzavi F, Iranshahi M, et al. Morus nigra L. extract prolongs survival of rats with hepatocellular carcinoma. *Phytotherapy Res* 2021; 35(6): 3365-76.
 20. Bhaigayabati T, Devi PG, Bag G. Total flavonoid content and antioxidant activity of aqueous rhizome extract of three hedychium species of Manipur valley. *Res J Pharmaceutical Biological and Chemical Sci* 2014; 5(5): 970-6.
 21. Baba SA, Malik SA. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of Arisaema jacquemontii Blume. *J Taibah Univ for Sci* 2015; 9(4): 449-54.
 22. Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2002; 25(12): 1600-3.
 23. Alavi MS, Fanoudi S, Hosseini A, Jalili-Nik M, Bagheri A, Sadeghnia HR. Everolimus attenuates glutamate-induced PC12 cells death. *International J Neuroscience* 2023; 133(4): 457-66.
 24. Hosseini A, Rajabian A. Protective effect of Rheum turkestanikum root against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2016; 26: 347-51.
 25. Ghani MA, Barril C, Bedgood Jr DR, Prenzler PD. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chemistry* 2017; 230: 195-207.
 26. Ghorbani A, Sadeghnia HR, Asadpour E. Mechanism of protective effect of lettuce against glucose/serum deprivation-induced neurotoxicity. *Nutritional Neuroscience* 2015; 18(3): 103-9.
 27. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols* 2006; 1(3): 1458-61.
 28. Sadeghnia HR, Ghorbani Hesari T, Mortazavian SM, Mousavi SH, Tayarani-Najaran Z, Ghorbani A. Viola tricolor induces apoptosis in cancer cells and exhibits antiangiogenic activity on chicken chorioallantoic membrane. *BioMed Res Int* 2014; 2014.
 29. Yu M, Gouvinhas I, Rocha J, Barros AI. Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. *Scientific Reports* 2021; 11(1): 10041.
 30. Thomson MJ, Puntmann V, Kaski J-C. Atherosclerosis and oxidant stress: the end of the road for antioxidant vitamin treatment?. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 2007; 21: 195-210.

31. Liu L-N, Mei Q-B, Liu L, Zhang F, Liu Z-G, Wang Z-P, et al. Protective effects of Rheum tanguticum polysaccharide against hydrogen peroxide-induced intestinal epithelial cell injury. *World J Gastroenterology: WJG* 2005; 11(10): 1503.
32. Shen Y, Shen Z, Li P, Chen Z, Wei B, Liu D, et al. Protective activity of Malus doumeri leaf extract on H₂O₂-induced oxidative injury in H9C2 rat cardiomyocytes. *Frontiers in Cardiovascular Med* 2022; 9: 1005306.
33. Keshani-Dokht S, Emam-Djomeh Z, Yarmand M-S, Fathi M. Extraction, chemical composition, rheological behavior, antioxidant activity and functional properties of Cordia myxa mucilage. *Int J Biol Macromolecules* 2018; 118: 485-93.
34. Afzal M, Obuekwe C, Khan A, Barakat H. Antioxidant Activity of Cordia Myxa L. and Its Hepatoprotective Potential. *Electronic J Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 2007; 6(6).
35. Singh R, Lawania RD, Mishra A, Gupta R. Role of Cordia dichotoma seeds and leaves extract in degenerative disorders. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2010; 2(1): 21-4.
36. Almosa AHAS. Investigation of Anti-Bacterial, Antioxidant (Peroxynitrite scavenging and Hydroxyl radical scavenging) Activity of Cordia myxa and Screening of Its Functional Groups Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy Technique. *Clinical Images and Case Reports* 2024; 2(7): 7-14.
37. Parween T, Jan S, Mahmooduzzafar S, Fatma T, Siddiqui ZH. Selective effect of pesticides on plant—A review. *Critical Reviews in Food Sci and Nutrition* 2016; 56(1): 160-79.
38. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Sci* 2002; 7(9): 405-10.
39. Rafieipour F, Hadipour E, Emami SA, Asili J, Tayarani-Najaran Z. Safranal protects against beta-amyloid peptide-induced cell toxicity in PC12 cells via MAPK and PI3 K pathways. *Metabolic Brain Disease* 2019; 34: 165-72.
40. Afzal M, Obuekwe C, Khan A, Barakat H. Antioxidant activity of Cordia myxa L. and its hepatoprotective potential. *Electronic J Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 2007; 6(8): 2236-42.
41. Al-Awadi FM, Srikumar T, Anim J, Khan I. Antiinflammatory effects of Cordia myxa fruit on experimentally induced colitis in rats. *Nutrition* 2001; 17(5): 391-6.
42. Lovrić J, Mesić M, Macan M, Koprivanac M, Kelava M, Bradamante V. Measurement of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods. *Periodicum Biol* 2008; 110(1): 63-8.
43. Inas Z, Hala A, Gehan HH. Gastroprotective effect of Cordia myxa L. fruit extract against indomethacin-induced gastric ulceration in rats. *Life Sci J* 2011; 8(3): 433-45.

44. Thirupathi K, Kumar SS, Goverdhan P, Ravikumar B, Krishna D, Mohan GK. Hepatoprotective action of *Cordia dichotoma* against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Nigerian J Nat Products and Med* 2007; 11: 37-40.
45. Zhou X, Yuan D, Wang M, He P. H₂O₂-induced endothelial NO production contributes to vascular cell apoptosis and increased permeability in rat venules. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2013; 304(1): H82-H93.
46. Kondo-Kawai A, Sakai T, Terao J, Mukai R. Suppressive effects of quercetin on hydrogen peroxide-induced caveolin-1 phosphorylation in endothelial cells. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 2021; 69(1): 28-36.
47. Qu W, Fan L, Kim Y-c, Ishikawa S, Iguchi-Ariga SM, Pu X-P, et al. Kaempferol derivatives prevent oxidative stress-induced cell death in a DJ-1-dependent manner. *J Pharmacological Sci* 2009; 110(2): 191-200.
48. Crispo JA, Piché M, Ansell DR, Eibl JK, Tai IT, Kumar A, et al. Protective effects of methyl gallate on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Res Communications* 20; 393(4): 773-8.

Protective Effect of Hydroalcoholic Extract of Cordia Myxa Fruit in Decreasing H₂O₂-Induced Toxicity in Bovine Aortic Endothelial Cells (BAE-1): A Laboratory Study

Sahar Fanoudi¹, Azar Hosseini²

Received: 15/06/24

Sent for Revision: 14/07/24

Received Revised Manuscript: 19/10/24

Accepted: 20/10/24

Background and Objectives: Considering the negative impact of oxidative stress on the pathophysiology of cardiovascular diseases, the use of antioxidants such as medicinal plants can help reduce complications. This study was conducted with the aim of determining the protective effect of *Cordia myxa* (*C. myxa*) fruit against oxidative stress caused by hydrogen peroxide (H₂O₂) in bovine aortic endothelium cells (BAE-1).

Materials and Methods: In this laboratory study, hydro-alcoholic extract was prepared from the fruit of *C. myxa* plant. The cells were exposed to different concentrations of extract (25-200 µg/ml) for 24h, then H₂O₂ (200 µM) was added and after 30 min, various tests were carried out including cell viability, cell apoptosis (Flow cytometry technique), lipid peroxidation (Malondialdehyde [MDA]) assay, and evaluation of reactive oxygen species (ROS, by dichlorodifluorescein diacetate probe). Data analysis was done using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test.

Results: Different concentrations of the fruit extract significantly decreased ROS production and MDA level as compared to the H₂O₂ group in a dose-dependent manner (p<0.05). Also, pretreatment with *C. myxa* fruit extract significantly reduced the rate of apoptosis compared to the H₂O₂ group dose dependently (p<0.010).

Conclusion: Based on the findings of the present study, it appears that the use of the hydro-alcoholic extract of *C. myxa* fruit can reduce the oxidative damage and cytotoxicity induced by H₂O₂ in BAE-1 cells.

Keywords: Cordia myxa, Hydrogen peroxide, Oxidative stress, Endothelial cell

Funding: This study was funded by Mashhad University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical considerations: The Ethics Committee of Mashhad University of Medical Sciences approved the study (IR.MUMS.MEDICAL.REC.1398.239).

Authors' contributions:

- **Conceptualization:** Azar Hoseini
- **Methodology:** Azar Hoseini, Sahar Fanoudi
- **Data collection:** Sahar Fanoudi
- **Formal analysis:** Sahar Fanoudi
- **Supervision:** Azar Hoseini
- **Project administration:** Azar Hoseini
- **Writing – original draft:** Sahar Fanoudi
- **Writing – review & editing:** Azar Hoseini, Sahar Fanoudi

Citation: Fanoudi F, Hosseini A. Protective Effect of Hydroalcoholic Extract of Cordia Myxa Fruit in Decreasing H₂O₂-Induced Toxicity in Bovine Aortic Endothelial Cells (BAE-1): A Laboratory Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2024; 23 (7): 605-21. [Farsi]

1- Assistant Prof., PhD in Pharmacology, Dept. of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, Neyshabur University of Medical Sciences, Neyshabur, Iran

2- Associate Prof., PhD in Pharmacology, Dept. of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran, ORCID: 0000-0002-5842-6157

Associate Prof., PhD in Pharmacology, Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Corresponding Author) Tel: (051) 38002270, E-mail: hoseini.azar@mums.ac.ir