زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره چهارم، تابستان ۱۴۰۲، صفحات ۳۰۶- ۲۹۵

مقاله پژوهشی

بررسی اثر مقایسه ای سیمواستاتین با عصاره متانولی و هیوسیاموزید استخراجی از گیاه بذرالبنج بر بیان ژن APO A در رت‌های نر آترواسکلروزیس نژاد ویستار

رویاک عبدالمحمدی، مریم بنانج*، مریم خسروی، هنگامه علی بیک

گروه زیست شناسی، واحد شمال تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: bananejmaryam@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۸

DOI: 10.22034/ascij.2023.1916190.1214

چکیده

آترواسکلروز به عنوان یک بیماری التهابی مزمن سرخرگی است که عمدتاً با ضخیم شدگی دیواره سرخرگی شناخته می‌شود. استفاده از گیاهان دارویی با حداقل عوارض جانبی در درمان هیپر کلسترولمی و حذف پلاک آترواسکلروزی از اهمیت خاصی برخوردار است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی سیمواستاتین با عصاره متانولی و هیوسیاموزید استخراجی از گیاه بذرالبنج بر بیان ژن *APO A* در رت‌های نر آترواسکلروزی نژاد ویستار می‌باشد. تعداد ۴۰ سر رت نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۸۰ گرم (در شروع آزمایش) به صورت تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی (کنترل، شم، تجربی ۱، ۲ و ۳) تقسیم بندی شدند. تمام گروه‌ها (به جز کنترل) علاوه بر گاواژ کلسترول ۲ درصد، غذای چرب (۱ درصد کلسترولی) به مدت ۴۰ روز دریافت کردند (دریافت آب سالین روزانه ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم توسط گروه کنترل طی این مدت). سپس، گروه‌های تجربی سه گانه، روزانه به ترتیب با ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم داروی سیموستاتین، ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم هیوسیاموزید و ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره متانولی گیاه بذرالبنج طی مدت ۲۸ روز تیمار شدند. طی مدت تیمار، گروه شم روزانه ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم آب سالین دریافت کرد. در پایان از رت‌های نر نژاد ویستار خونگیری و بیان ژن *APO A* توسط تکنیک Real-time PCR بررسی شد. همچنین، میزان لیپیدهای سرم به روش فتومتریک اندازه‌گیری گردید. عصاره متانولی و هیوسیاموزید استخراجی از گیاه بذرالبنج و سیمواستاتین موجب افزایش بیان ژن *APO A* در هر سه گروه تجربی نسبت به گروه شم گردیدند. همچنین عصاره متانولی در افزایش بیان ژن مذکور مؤثرتر از فرآورده‌های دیگر بود. عصاره متانولی گیاه بذرالبنج و هیوسیاموزید استخراجی دارای یک اثر افزایشی بر بیان ژن *APO A* و افزایش سطح سرمی HDL می‌باشند.

کلمات کلیدی: آترواسکلروز، ژن *Apo A*، لیپیدهای سرم، سیمواستاتین، هیوسیاموزید.

مقدمه

آتروما (Atheroma)، ضخیم شدن غیرقرینه انتیما (Intima) یعنی درونی‌ترین لایه رگ‌های متوسط و بزرگ است. مجرای درون رگ با ضخیم شدن لایه انتیما تنگ می‌شود (۱۳). تصلب شرائین، شایعترین بیماری قلبی، تجمع غیر طبیعی، اکسیداسیون و اصلاح چربی است که بیشتر باعث التهاب مزمن در دیواره عروق، تنگی عروق و انسداد لومن می‌شود و جریان خون در عضله میوکارد را کاهش می‌دهد. عوامل زیادی می‌توانند در ایجاد تصلب شرائین مانند

هایپرکلسترولمی، دیابت، سیگار کشیدن، چاقی، فشار خون بالا و عدم تحرک نقش داشته باشند (۹، ۲۶، ۲۸). در کشورهای پیشرفته و همچنین در بیشتر کشورهای درحال پیشرفت، این بیماری‌ها عامل حدود نیمی از مرگ‌های بزرگسالان هستند. مرگ و میر زودرس مردان ۲/۵ برابر بیشتر از زنان است (۱۷، ۲۹). هیپرکلسترولمی همراه با فعالیت سیتوکین‌های التهابی ناشی از لنفوسیتT، ماکروفاژها و ماست‌سل‌ها در محل ضایعه موجب فعال شدن موضعی سلول‌های اندوتلیوم در شریان می‌شود. احتباس و اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها به ویژه LDL توسط ماکروفاژ، عامل اصلی در تشکیل آتروم می‌باشد (۳۸). Ox-LDL (oxidized low- density Lipoprotein) خود محرک واکنش‌های التهابی بوده و موجب جذب مونوسیت-های خون و ازدیاد و تکثیر ماکروفاژها می‌گردد. این واکنش‌های التهابی برای از بین بردن LDL های اکسید شده پدید می‌آید. پاسخ‌های التهابی که برای خنثی کردن اثر LDL های اکسیده شده آغاز می‌شوند، در حضور هیپرکلسترولمی نمی‌توانند عملکرد خود را کامل کنند و در عوض سبب اکسید شدن لیپوپروتئین-ها و بروز التهاب بیشتر می‌گردند (۲۴، ۳۲). آپولیپوپروتئین A1 پروتئینی است که در انسان توسط ژن APOA1 کدگذاری می‌شود. آپولیپوپروتئین A جز ترکیبات پروتئینی اصلی ذرات HDL در پلاسما است (۴، ۳۳). همچنین آپوپروتئین A، شاخص آنزیم لیسیتین–کلسترول آسیل ترانسفراز می‌باشد که مسئول تشکیل بیشتر استرهای کلسترول پلاسما است. همچنین، *APO A1* به عنوان یک عامل تثبیت کننده پروستاسیکلین (PGI2) می‌باشد و بنابراین ممکن است اثر ضد تشکیل پلاک داشته باشد. همچنین نسبت *APO B* به *APO A* به عنوان نسبت دو عامل ایجاد کننده و ضد ایجاد کننده تصلب شرائین، شاخص موثری در پیش‌بینی بیماری قلبی عروقی است. نقص در ژن رمزگذار آن با کمبود HDL، از جمله بیماری تانژیر و با آمیلوئیدوز سیستمیک غیر نوروپاتیک همراه می‌باشد (۱۴، ۲۷، ۳۶). رگه‌های چرب یکی از اولین آسیب های تصلب شرائین است. بسیاری از این رگه‌های چرب از بین می‌روند، اما برخی از آن ها به پلاک هایی تبدیل می‌شوند که لومن را باریک و رگ را سفت می‌کند. جریان خون در مناطق شریانی حساس به تصلب شرائین به حدی است که سلول‌های اندوتلیوم را زخمی می‌نمایند. این امر منجر به افزایش مولکول‌ها (مولکول‌های چسبندگی) در سطح سلول اندوتلیوم می‌شوند که توانایی سلول‌ها برای پیوستن به محیط و سلول‌های دیگر را افزایش می‌دهند. همچنین، مولکول‌های التهابی بیشتری در این محیط با فشار بالا توسط سلول‌های اندوتلیال تولید می‌شوند. به این ترتیب، فشارهای همودینامیکی و افزایش لیپوپروتئین های خون چرخه معیوب را فعال کرده و بیماری را پیشرفت می‌دهد و باعث آنوریسم، ترومبوز، ایسکمی و حتی سکته قلبی می‌شود (۱۴، ۲۵). استفاده از داروهای گیاهی در درمان تصلب شرائین و اثرات آن مانند کاهش عناصر چربی و جلوگیری از فعالیت عوامل استرس اکسیداتیو بسیار مورد توجه است که نقش درمانی در تصلب شرائین دارند. فلاونوئیدها، به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌توانند کلسترول را کاهش دهند و به طور موثری از تشکیل پلاک در لایه انتهایی عروق جلوگیری کنند (۱۱، ۳۱).

داروی سیمواستاتین (Simvastatin) از گروه داروهای استاتین است و دیگر داروهای گروه استاتین باعث کاهش کلسترول خون می‌شوند که شامل لووستاتین، آترواستاتین، فلوواستاتین و روزواستاتین است. مکانیسم عملکرد ضد لیپیدی سیمواستاتین، مهار آنزیم HMG - GoA ردوکتاز را که یک آنزیم کبدی در مرحله اول مسیر سنتز کلسترول است، می‌باشد.

همچنین برای کاهش خطر مشکلات قلبی در افرادی که در معرض خطر هستند، استفاده می‌گردد (۱۸، ۲۱). بذالبنج (به عنوان یک گیاه علفی دو ساله) ساقه استوانه ای شکل خمیده در ناحیه راس به ارتفاع ۸۰- ۶۰ سانتی متر است. ریشه راست، دراز و نسبتاً ضخیم و برگ های آن متناوب و مثلثی شکل، نوک تیز و در قسمت انتهائی ساقه معمولاً عاری از دمبرگ و منقسم به لوب‌های نامساوی و نوک تیز می‌باشد. عصاره متانولی بذرالبنج حاوی ترکیبات آنتی اکسیدان قوی همچون ترپن و تانن می‌باشد. از دیگر ترکیبات موجود در دانه ی بذرالبنج که به تازگی به روش فیزیکی- شیمیایی استخراج شده‌اند گلیکوزیدهای استروئیدی (هیوسیاموزید) است که ۱۷ نوع بوده و تفاوت آنها در ساختار قندی و زنجیره گلیکوساکاریدی است. این گلیکوزیدها شامل A1.B1.B2.C.C1.D.D1 (hyoscyamozides) مشتق از tigogenin و هیوسیاموزید b3 مشتق از disgenin و هیوسیاموزید E.E1.f.f1.G.G1 که از forestan مشتق شده‌اند، می‌باشد. هیوسیاموزید جزء خانواده گلیکوزیدهای استروئیدی یا فیتو پروژسترون (که دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ترمیم کننده بافتی، ضد فشار خون بالا و بهبود عملکرد تنفسی) طبقه‌بندی می‌شوند. شایان ذکر است که هیوسیاموزید استخراجی از بذرالبنج از خانواده فلاونوئیدهای این گیاه بوده و با فرآورده‌های دارویی قبلی استخراجی از بذرالبنج شامل هیوسیامین، هیوسین و اسکوپولامین که جزء خانواده آلکالوئیدهای گیاه می‌باشند متفاوت می‌باشد (۷). در تحقیقات Benhouda و همکاران مشخص شد که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به عصاره متانولی بذرالبنج بخاطر وجود ترکیبات پلی‌فنل‌ها و تانن مرتبط دانستند و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی بره موم ۷۶ درصد ثبت گردید (۸). مطالعات درون آزمایشگاهی (*In vitro*) در مورد بره موم (۶) و هیوسیاموزید به شکل قابل توجهی انجام شده است. از طرفی این ترکیبات در رفرنس‌های اصلی فارماکوگنوزی نیز کاملا شناخته شده است (۷). یکی از مطالعات در چین تحت عنوان گلیکوزیدهای استروئیدی دانه‌ی *Hyoscyamus niger* بر روی سلول‌های سرطان ریه در مدل انسانی در شرایط *In vitro* نشان می‌دهد که هیوسیاموزیدهای استخراجی از بذرالبنج باعث از بین رفتن سلول‌های سرطانی گردید (۳۸). بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر مقایسه‌ای داروی سیمواستاتین با عصاره متانولی و هیوسیاموزید استخراجی از گیاه بذرالبنج بر بیان ژن *APO A* و انقباض آئورتی در رت‌های نر آترواسکلرزیس نر نژاد ویستار می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ۴۰ سر رت نر نژاد ویستار به وزن تقریبی ۱۸۰ گرم به صورت تصادفی در ۵ گروه هشت تایی تقسیم‌بندی شدند. شرایط استاندارد نور، دما، تاریکی و روشنایی بر طبق دستورالعمل و ضوابط اخلاقی وزارت بهداشت در گروه‌های مورد مطالعه رعایت شد. گروه اول حیواناتی هستند که در شرایط معمولی آزمایشگاه نگهداری می‌شوند و همزمان با تیمار سایر گروه‌ها روزانه ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم سالین دریافت می‌کنند (گروه کنترل). گروه دوم شامل حیواناتی هستند که طی ۲۰ روز با دریافت کلسترول ۲ درصد به صورت گاواژ، مبتلا به آترواسکلروز شده و به مدت ۲۸ روز، روزانه ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم سالین دریافت می‌کنند (گروه شم) (۲۲). گروه سوم دربرگیرنده ی حیواناتی هستند که طی ۲۰ روز با دریافت کلسترول ۲ درصد به صورت گاواژ به آترواسکلروز مبتلا شده و بلافاصله به مدت ۲۸ روز ، روزانه ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در روز داروی سیموستاتین به صورت گاواژ دریافت می‌کنند. گروه

چهارم شامل حیواناتی هستند که طی ۲۰ روز با دریافت کلسترول ۲ درصد به صورت گاواژ به آترواسکلروز مبتلا شده و بلافاصله به مدت ۲۸ روز، روزانه ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم در روز فرآورده هیوسیاموزید به صورت گاواژ دریافت می کنند (۲۳). گروه پنجم حیواناتی هستند که طی ۲۰ روز با دریافت کلسترول ۲ درصد به صورت گاواژ به آترواسکلروز مبتلا شده و بلافاصله به مدت ۲۸ روز، روزانه ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم در روز عصاره متانولی بذرالبنج را به صورت گاواژ دریافت می‌کنند (۳۷).

هیپر کلسترولمی کردن: برای هیپر کلسترولمی کردن در رت نر بالغ از گاواژ کلسترول ۲ درصد به مدت ٤٠ روز استفاده شد. غذای حیوانات طی این ٤٠ روز شامل کلسترول ۲ درصد، ٤٠ درصد کربوهیدرات، ۱۵ درصد چربی، ٤٠ درصد پروتئین و ۳ تا ٤ درصد فیبر بود (۲۱).

استخراج عصاره متانولی و هیوسیاموزید از گیاه بذرالبنج: بذر گیاه بذرالبنج (Hyoscyamus niger) با کد هرباریومی 68 14 (IMPH) از سازمان مراتع و جنگل های تهران تهیه گردید. ٤٠ گرم برگ گیاه گلدر بصورت پودر درآمده و در دستگاه سوکسیله حاوی متانول ٦٠ درصد قرار داده شد. به مدت ۱۸ ساعت چرخش متانول و آب بر روی پودر برگ گیاه (که در قسمت ستونی سوکسیله قرار داشت) انجام گرفت و عصاره متانولی استخراج و به کمک دستگاه روتاری خشک گردید. سپس ۱/۵ درصد استات سرب به ۵۰۰ سی‌سی از محلول عصاره متانولی حاصله از دستگاه سوکسیله جهت جداسازی ترپن وتانن اضافه شد و پس از ۵ دقیقه به کمک کاغذ صافی عصاره متانولی فاقد ترپن و تانن حاصله با ٦٠٠ سی‌سی ایزوپرانول و ۹۰ سی سی کلروفرم دکانته گردید. محلول بدست آمده که فاقد کلروفرم می‌باشد به کمک دکانتور جداسازی و جهت خشک کردن به دستگاه روتاری منتقل گردید (۲۲).

میزان بیان APO A به روش Real Time PCR: پنج سی سی خون رت نر نژاد ویستار در لوله آزمایش حاوی EDTA سرد ریخته شد. سرم خون به وسیله ی دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱٤۰۰g طی ۸ دقیقه جداسازی و جهت سنجش پارامترهای بیوشیمیایی (TC، LDL و HDL) استفاده شد. برای خالص‌سازی لکوسیت‌ها از بخش سلولی باقیمانده، طی دو مرحله لایزیز بافر (Lysis buffer) شامل (NH4CL 8/02 g و NAHCO3 0/84g و EDTA 0/37g و H2O 1000cc) به خون اضافه گردید و در هر مرحله، ۸ دقیقه در دستگاه Shaker گذاشته و سپس از دستگاه سانتریفیوژ با دمای ٤ درجه سانتیگراد با دور ١٦٠٠g به مدت ۸ دقیقه استفاده شد. در انتها رسوب لکوسیت‌ها با میزان کمی لایزیز بافر از ته لوله آزمایش شستشو داده و به میکروتیوب منتقل و جهت ته نشینی لکوسیت‌ها از دور ۷۰۰۰g سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه استفاده و در انتها لایزیز بافر از میکروتیوب‌ها خالی شد (۲۳). سپس RNA طبق پروتکل کیت RNx plus (شرکت سینا ژن، ساخت ایران)، از لکوسیت‌ها استخراج و غلظت آن بوسیله اسپکتروفوتومتر نانودراپ اندازه گیری گردید (۲۷). پس از تعیین میزان RNA از کیت سنتز cDNA (شرکت پارس توس- ساخت ایران) شامل: ۱ میکرولیتر Oligo (dt) و DEPC-treated water و ۱۰ میکرولیتر RT premix به همراه ۱ میکروگرم Template RNA برای سنتز cDNA طبق پروتکل کیت استفاده شد. برای افزایش سنتز cDNA، میکروتیوب‌ها به PCR وارد شده و در طول دوره‌های مختلف cDNA سنتز شد و سپس باند بیان ژن نمونه‌ها بر روی ژل الکتروفورز مشاهده گردید. جهت سنجش میزان بیان ژن Apo A به کمک دستگاه Real Tim PCR(Bio-Rad) از۲۰ میکرولیتر محلول شامل ۱۰

میکرولیتر Master mix 2x، ۰/٤ میکرولیتر ROX dye 50x، یک میلی‌لیتر پرایمر پیشرو (Forward primer) و ۱ میلی‌لیتر پرایمر پرو (Reverse primer)، Template DNA و Sterilized D.W به روش Real Tim PCR SYBR Green استفاده گردید. کیفیت مراحل آزمون در دمای ۵۹/۵ درجه سلسیوس در زمان دو ساعت و پنج دقیقه شامل سه فاز خطی، نمایی و کفه (The liner exponential phase and plateau phase, phase) در ۵۲ سیکل ثبت گردید. از ژن GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphatdehydrogenase) برای house keeping استفاده شد. آنالیز داده‌های حاصله بصورت ΔΔCT است. پرایمرهای پیشرو و پسرو به صورت زیر طراحی شدند (۲۸) (جدول ۱).

سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی TC و LDL و HD: پارامترهای بیوشیمیایی (TC، LDL و HDL) با استفاده از کیت‌های تشخیص کمی (شرکت پارس آزمون–ساخت ایران) به روش فتومتریک به کمک دستگاه اتوآنالایزر آلفا اندازه‌گیری شد. جهت سنجش لیپیدی، مخلوط ۱۰ میکرولیتر استاندارد، ۱۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف بلانک به همراه ۱۰۰۰ میکرولیتر نمونه را در دمای ۲۵ درجه به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه و سپس سنجش در طول موج ٥٤٦ نانومتر انجام گرفت. فتومتر با بلانک روی صفر تنظیم شده بود.

آنالیز آماری: برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه با تست تعقیبی توکی استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 در سطح خطای ۵ درصد تحلیل شدند.

جدول۱- پرایمرهای پیشرو و پسرو مربوط به ژن Apo A.

طول	توالی (3→5)	پرایمر
۱۸۹	AACCCTCACCCTAACCCCGG	پرایمر پیشرو
۱۸۹	AACCCTCACCCTAAGGCGCG	پرایمر پسرو

نتایج

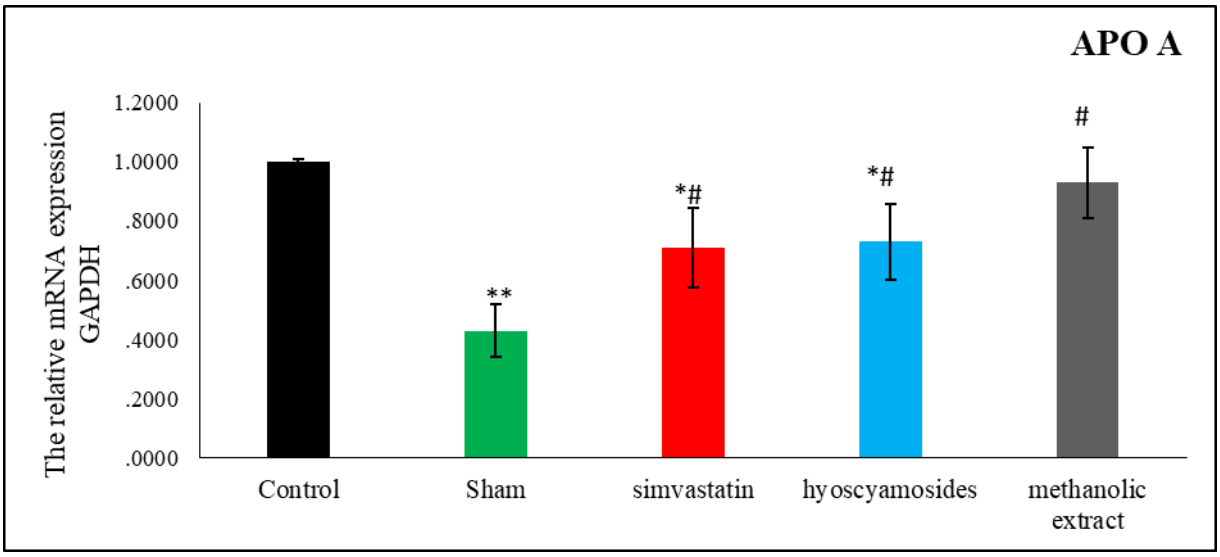
در این مطالعه، اثر مقایسه‌ای هیوسیاموزید و عصاره متانولی استخراجی از گیاه بذرالبنج با داروی سیموستاتین بر روی بیان ژن *APO A* در مدل رت نر نژاد ویستار انجام گرفت. نتایج نشان داد که تفاوت معناداری در بیان ژن *APO A* (در سطح mRNA) در گروه‌های تجربی، شم و کنترل مشاهده شد. به طوری که بیان ژن *APO A* درگروه‌های تجربی (مصرف کننده سیموستاتین، هیوسیاموزید و عصاره متانولی) به طور معنا داری نسبت به گروه کاهش افزایش نشان داد (p <۰/۰۵). بیان این ژن در گروه شم نسبت به گروه کنترل افزایش داشت (p < ۰/۰۵). تجزیه و تحلیل منحنی ذوب نشان داد که کیفیت مراحل آزمون در دمای ٦۲/۵ درجه سلسیوس در زمان دو ساعت و پنج دقیقه با سه فاز خطی، نمایی و کفه (The liner exponential phase and plateau phase، phase) در ۵۲ سیکل ثبت گردید. گروه شم افزایش معنی‌داری در سطح توتال کلسترول (TC) و لیپوپروتئین کم دانسیته (LDL) سرم (p < ۰/۰۱) و کاهش معنی‌داری در میزان HDL (p < ۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل نشان داد. آتورواستاتین و کوئرستین با (p < ۰/۰۱) و عصاره متانولی با (p <۰/۰۵) باعث کاهش سطح توتال کلسترول (TC) و لیپوپروتئین کم دانسیته (LDL) سرم نسبت به گروه شم شدند. تأثیر سیموستاتین بر کاهش LDL سرم نسبت به هیوسیاموزید و عصاره متانولی بیشتر بود (p <۰/۰۵). هیوسیاموزید و عصاره متانولی موجب افزایش سطح

HDL سرم نسبت به گروه‌های شم وکنترل شدند (p <۰/۰۵). افزایش سطح HDL در گروه مصرف کننده سیموستاتین معنی‌دار نبود (جدول ۲).

جدول ۲- اثرات سیموستاتین، هیوسیاموزید و عصاره متانولی بر لیپیدهای سرم

گروه‌ها/پارامترها	کنترل	شم	سیموستاتین	هیوسیاموزید	عصاره متانولی
TC (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۸۱/۲۳ ± ٤/٥٥	۱۷٦/٥ ± ۱٦/۱۰**	۹۱/۱۸ ± ۳/۹٦*#	۸۹/٦٤ ± ۲/۱٥ *#	۹۲/٥ ± ۲/۳٥*#
LDL (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	٦٤/۲۲ ± ۳/۸٦	۱۲۷/٦۱ ±۱۰/٤۹**	۸۰/٥۳ ± ۲/۰٥*#	۸٦/٤۷ ± ۲/٦٤*#	۸۱/۰۲ ± ۷/۱۱*#
HDL(میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	٦۸/۹٦ ± ٦/۳٦	٤۹/۳٥ ± ٦/۰۹*	٥۸/۳٥ ± ۷/۰٦ #	٦۱/۱۳ ± ٤/۸۹ #	٦٦/۰۰ ± ٥/۲۱ #

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف از استاندارد بیان شده‌اند. *p <۰/٥ و **p <۰/۰۱ مقایسه با گروه کنترل؛ #p <۰/۰٥ و ##p ۰/۰۱ > مقایسه با گروه شم.



نمودار ۱- تغییرات بیان ژن *APO A* بعد از ۲۸ روز تیمار. * p <۰/۰٥ مقایسه با گروه کنترل؛ ** p <۰/۰۱ مقایسه با گروه کنترل؛ # p <۰/۰۱ مقایسه با گروه شم.

بحث

نتیجه تشکیل پلاک‌های فیبری-چربی (آتروما) بوده که با افزایش سن رفته رفته ازدیاد می‌یابد و موجب تنگی رگ (استنوزیس) می‌گردد در افراد دچار تنگی عروق قلبی (عروق کرونر)، در شرایطی که قلب نیازمند اکسیژن بیشتر است (۵) و در آترواسکلروزیس سخت شدن دیواره و تنگی مجرای شریان‌ها با رسوب لیپید و کلسترول کم‌چگال بر روی لایه اینتیما - مدیای آنها مشهود است. هیپرکلسترولمی سلول‌های اندوتلیال را در شریان فعال می‌کند که باعث حبس لیپوپروتئین‌ها به خصوص لیپوپروتئین های کم چگال به عنوان عامل اصلی در فرآیند تشکیل پلاک می‌گردد. همچنین، باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو می‌شود و علاوه بر این مسئول افزایش فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو است که نهایتاً سبب آسیب سلولی می‌شوند (۲).

در مطالعه ما اثر عصاره متانولی و هیوسیاموزید استخراجی از گیاه بذرالبنج در مقایسه با داروی سیموستاتین بر بیان ژن *APO A* در رت‌های نر نژاد ویستار که ٤۰ روز با کلسترول ۲ درصد و غذای پرچرب هیپرکلسترولمی شدند مورد بررسی

قرارگرفت و معلوم شد که هر سه ماده بیان این ژن را در سطح mRNA کاهش داد. در این مطالعه نتایج گروه دوم (گروه شم) در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که بیان ژن *APO A* و سطح HDL سرم کاهش یافته و سطوح TC و LDL افزایش پیدا کرد. افزایش بیان ژن *APO A* منجر به افزایش سطح سرمی LDL می‌شود و این موضوع یک عامل اساسی در تداوم هیپرکلسترولمی وافزایش ضایعات آترواسکلروزی است. کاهش در بیان ژن *APO A* معمولا منجر به هیپرکلسترولمی ناشی از کاهش تشکیل HDL پلاسمایی و در نتیجه افزایش بروز آترواسکلروز می‌گردد. سطوح پایین HDL-C و سطوح بالای LDL-C فاکتورهای خطر مهمی برای بیماری قلبی عروقی آترواسکلروتیک می‌باشند.

در مطالعه ما مصرف کلسترول ۲ درصد و غذای پرچرب موجب افزایش غلظت لیپیدهای پلاسمایی از جمله کلسترول، LDL و کاهش HDL در گروه شم شده که به نظر می رسد به تبع آن میزان ox-LDL هم افزایش یافته و احتمالاً این موضوع باعث کاهش بیان ژن *APO A* در این گروه و درنتیجه تداوم هیپرکلسترولمی‌باشد. در حضور هیپرکلسترولمی، پاسخ‌های التهابی که برای خنثی کردن اثر LDL های اکسیده شده آغاز می‌شوند نمی‌توانند عملکرد خود را کامل کنند و در عوض چرخه التهاب، اکسیده شدن لیپوپروتئین‌ها و بروز التهاب بیشتر در انتیما باقی می‌ماند. لنفوسیت‌های T که از مراحل اولیه در ضایعه آترواسکلروتیک حضور دارند واکنش‌های التهابی را به صورت یک چرخه معیوب تشدید می‌کنند (۲۵، ۳۵).

نتایج گروه سوم در مقایسه با گروه شم و کنترل نشان داد که سیموستاتین، موجب افزایش بیان ژن *APO A* شده و کاهش معنی‌دار در سطوح TC و LDL را سبب گردید. توتال کلسترول و LDL فاکتورهای خطر در بروز بیماری ایسکمی قلبی (IHD) بوده و سطوح آنها از طریق دارو درمانی با استاتین‌ها کاهش می‌یابد. استاتین ها از طریق کاهش سطح کلسترول و مالونیل دی آلدئید (MDA) دارای اثرات محافظت کنندگی از رگ ها در رت‌ها می‌باشد (۱، ۳۰). استاتین‌ها سبب کاهش LDL و جلوگیری از بروز ترومبوز، ایسکمی و توسعه آترواسکلروز می‌شوند. این داروها بیان ترانسپورترهای کلسترول از جمله ABC A1، ABC G1در کبد؛ روده، بافت چربی و پوست را افزایش می‌دهند. همچنین موجب بیان APO A1 در هپاتوسیت‌ها می‌شود. افزایش بیان ABC A1 و ABC G1 منجر به انتقال بیشتر کلسترول به APO A1 می‌شود که آن هم به نوبه خود موجب تشکیل بیشتر ذرات HDL شده و بدین ترتیب انتقال معکوس کلسترول از طریق HDL به کبد افزایش می‌یابد و کلسترول لازم برای سنتز اسیدهای صفراوی در کبد فراهم می‌گردد. Ahmadi و همکاران در سال ۲۰۱۷ بیان کرده‌اند که استاتین‌ها از جمله آتوراستاتین موجب القاء افزایش بیان اجزاء دخیل در فرایند انتقال معکوس کلسترول از جمله ABC A1, APO-A1 وABC G1 می‌شوند (۱). همچنین موجب افزایش بیان رسپتور LDL در هپاتوسیت‌ها شده و بنابراین مقدار LDL-C را درگردش خون می‌کاهند. علاوه بر این، آنزیم اصلی مسیر بیوسنتز کلسترول یعنی هیدروکسیل متیل گلوتاریل کوآنزیم A رودوکتاز (HMG CR) را در هپاتوسیت‌ها مهار می‌نماید (۳، ۷).

گروه چهارم که فرآورده هیوسیاموزید استخراجی از گیاه بذرالبنج را دریافت کردند، افزایش معنی‌داری در بیان ژن *APO A* و افزایش سطح HDL و کاهش معنی‌دار در سطوح TC و LDL سرم نشان دادند. در گروه پنجم عصاره متانولی گیاه بذرالبنج را دریافت کردند، بیشترین افزایش معنی‌داری در سطح بیان ژن

APO A مشاهده گردید که با افزایش معنی‌دار سطح HDL و کاهش معنی‌دار سطح TC وLDL سرم این گروه همراه بود. Douandishan M و همکاران در سال ۲۰۱٤ گزارش کرده‌اند که عصاره آبی گلدر موجب کاهش مؤثر در سطوح LDL و توتال کلسترول خون در رت‌های نر دیابتی نژاد ویستار می‌شود عصاره متانولی این گیاه دارای خاصیت محافظت کنندگی از کبد بوده و با کاهش مالونیل دی آلدئید مهار کننده استرس اکسیداتیو در رت‌ها می‌باشد (۱۵، ۳٤).

Vasu Keshetty و همکاران در تحقیقی بیان کرده‌اند که عصاره متانولی سیر موجب کاهش معنی‌دار در توتال کلسترول، تری گلیسرید، لیپوپروتئین کم دانسیته و گلوکز در رت‌های آلبینوی ماده هیپرلیپیدمیک دیابتی می‌شود (۲۰). دراین مطالعه، هیوسیاموزید و عصاره متانولی گیاه گلدر موجب با افزایش معنی‌دارسطح HDL و کاهش معنی‌دار توتال کلسترول و LDL سرم خون در رت‌های نر نژاد ویستار شد که به نظر می‌رسد نتیجه افزایش معنی‌دار در بیان ژن *APO A* باشد. با توجه به مطالعات مذکور چنین برمی آید که افزایش بیان ژن *APO A* از طریق پمپ نمودن کلسترول سلولی به APO A1 منجر به افزایش HDL پلاسمایی (به عنوان فاکتوری آنتی آتروژنیک) می‌گردد و بدین ترتیب در انتقال معکوس کلسترول و جلوگیری از هیپرکلسترولمی و ایجادآترواسکلروز ایفای نقش می نماید. چنین استنباط می‌گردد که عصاره الکلی گیاه بذرالبنج و هیوسیاموزید استخراجی از آن از طریق افزایش بیان ژن *APO A* موجب کاهش کلسترول و دیگر لیپیدهای خون شده و دارای خاصیت آنتی-آترواسکلرتیک است، پس لازم است در مطالعات دیگر مکانیسم مولکولی آن مورد بررسی قرار گیرد. در مطالعه ما نشان داده شد که هیوسیاموزید استخراجی و عصاره الکلی گیاه بذرالبنج بیان mRNA ی مربوط به ژن *APO A* را افزایش داده که احتمالاً به تبع آن بیان ترانسپورتر ABC A1 هم برای انتقال معکوس کلسترول کاهش یافته است.

نتیجه‌گیری

سیموستاتین، عصاره متانولی گیاه بذرالبنج و هیوسیاموزید استخراجی از آن دارای اثرات مثبتی بر بیان ژن *APO A* در لکوسیت‌ها هستند که در این میان تأثیر عصاره متانولی بر بیان ژن مذکور بطور معنی‌داری از سیموستاتین هم بیشتر می‌باشد. پروتئین حاصل از بیان mRNA ی این ژن احتمالاً با افزایش انتقال معکوس کلسترول از سلول‌ها به کبد و از طرفی افزایش سطح HDL پلاسما از ایجاد هیپرکلسترولمی و شکل‌گیری پلاک آترواسکلروزی جلوگیری می‌نماید.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از رساله مقطع دکترا است. از کلیه کسانی که در انجام این پژوهش با ما همکاری نمودند کمال امتنان را داریم.

منابع

1. Ahmadi Y., Ghorbanihaghjo A., Argani H. 2017. The effect of statins on the organs: similar or contradictory? *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*, 9(2):64.

2. Amna B., Uzma S., Umme H., Farha A., Ambreen M. 2016. Hyperlipidemia and hypertension; cardiovascular risk factors, various induction methods and their management by ethnomedicines. *International Research Journal of Pharmacy*, 7(11):1-9.

3. Argmann C.A ,.Edwards J.Y., Sawyez C.G., O'Neil C.H., Hegele R.A., Pickering J.G., Huff M.W. 2005. Regulation of macrophage cholesterol efflux through hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibition a role for RhoA in ABCA1-mediated Cholesterol efflux. *Journal of*

Persian medicine. *Der Pharmacia Lettre*, 8(5):58-66.

12. Diao S.-L., Sun J.-W., Ma B.-X., Li X.-M., Wang D. 2018. Influence of crocetin on high-cholesterol diet induced atherosclerosis in rats via anti-oxidant activity together with inhibition of inflammatory response and p38 MAPK signaling pathway. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(3):493-499.

13. Dod H.S., Bhardwaj R., Sajja V., Weidner G., Hobbs G.R., Konat G.W., Manivannan S., Gharib W., Warden B.E., Nanda N.C. 2010. Effect of intensive lifestyle changes on endothelial function and on inflammatory markers of atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*, 105(3):362-367.

14. Dron J.S., Hegele R.A. 2016. Genetics of lipid and lipoprotein disorders and traits. *Current genetic medicine reports*, 4(3):130-141.

15. El-Sayed M.-I.K., Al-Massarani S., El Gamal A., El-Shaibany A., Al-Mahbashi H.M., 2020. Mechanism of antidiabetic effects of Plicosepalus Acaciae flower in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats, as complementary and alternative therapy. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1):1-15.

16. Hamidinia M., Boroujerdnia M.G., Talaiezadeh A., Solgi G., Roshani R., Iranprast S., Khodadadi A. 2015. Increased P-35, EBI3 transcripts and other treg markers in peripheral blood mononuclear cells of breast cancer patients with different clinical stages. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(2):261.

17. Herrington W., Lacey B., Sherliker P., Armitage J., Lewington S. 2016. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease. *Circulation Research*, 118(4):535-546.

18. Inzucchi S.E., Bergenstal R.M., Buse J.B., Diamant M., Ferrannini E., Nauck M., *Biological Chemistry*, 280(23):22212-22221.

4. Arinami T., Hirano T., Kobayashi K., Yamanouchi Y., Hamaguchi H. 1990. Assignment of the apolipoprotein AI gene to 11q23 based on RFLP in a case with a partial deletion of chromosome 11, del (11)(q23. 3→ qter). *Human Genetics*, 85(1):39-40.

5. Aziz M., Yadav K.. 2016. Pathogenesis of atherosclerosis a review. *Medical and Clinical Reviews*, 2(3):1-6.

6. Bachevski D., Damevska K., Simeonovski V., Dimova M ,.2020. Back to the basics: Propolis and COVID-19. *Dermatologic Therapy*, 33(4):e13780.

7. Bandarian F., Hedayati M., Daneshpour M.S., Naseri M., Azizi F. 2013. Genetic polymorphisms in the APOA1 gene and their relationship with serum HDL cholesterol levels. *Lipids*, 48(12):1207-1216.

8. Benhouda A., Yahia M., Benhouda D., Bousnane N ,.Benbia S., Hannachi N., Ghecham A. 2014. Antimicrobial and Antioxidant activities of various extracts of Hyoscyamus albus L. and Umbilicus rupestris L. leaves. *Algerian Journal of Natural Products*, 2:14-17.

9. Bentzon J.F., Falk E. 2003. Pathology of stable and acute coronary syndromes. Theroux P, Ed Acute Coronary Syndromes: a Companion To Braunwald's Heart Disease: WB Saunders Company, p. 3327-3229.

10. Boyd M., Tennant S., Melendez J., Toema D., Galen J., Geddes C., Levine M. 2015. Adaptation of red blood cell lysis represents a fundamental breakthrough that improves the sensitivity of S almonella detection in blood. *Journal of Applied Microbiology*, 118(5):1199-1209.

11. Cheraghi M., Asadi-Samani M. 2016. Atherosclerosis: Pathophysiology and promising herbal remedies in traditional

during atherosclerosis. *Cell Research*, 27(3):352-372.

25. Maguire E.M., Pearce S.W., Xiao Q. 2019. Foam cell formation: A new target for fighting atherosclerosis and cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology*, 112:54-71.

26. Mathur R.K. 2010. Role of diabetes, hypertension, and cigarette smoking on atherosclerosis. *Journal of Cardiovascular Disease Research*, 1(2):64-68.

27. O'donnell M.J., Xavier D., Liu L., Zhang H., Chin S.L., Rao-Melacini P., Rangarajan S., Islam S., Pais P., McQueen M.J. 2010. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *The Lancet*, 376(9735):112-123.

28. Patrono C., García Rodríguez L.A., Landolfi R., Baigent C. 2005. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *New England Journal of Medicine*, 353(22):2373-2383.

29. Rodríguez-Saldaña J., Rodriguez-Flores M., Cantú-Brito C., Aguirre-Garcia J. 2014. A pathological study of the epidemiology of atherosclerosis in Mexico city. *Cardiology Research and Practice*, 2014.

30. Su X.M., Wei Y., Wang Y., Zhang W. 2015. ABCA1 mRNA expression and cholesterol outflow in U937 cells. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(3):3116.

31. Tripathi S., Srivastava S., Tripathi Y.B. 2019. Role of herbal nutraceuticals in prevention and treatment of atherosclerosis. *Exploratory Animal and Medical Research*, 9(1):15-23.

32. Valledor A.F., Lloberas J., Celada A. 2015. Macrophage foam cells. *eLS*:1-10.

33. Van der Vorst E.P. 2020. High-density Lipoproteins and Apolipoprotein

Peters A.L., Tsapas A., Wender R., Matthews D.R. 2015. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*, 38(1):140-149.

19. Karkhaneh L., Yaghmaei P., Parivar K., Sadeghizadeh M., Ebrahim-Habibi A. 2016. Effect of trans-chalcone on atheroma plaque formation, liver fibrosis and adiponectin gene expression in cholesterol-fed NMRI mice. *Pharmacological Reports*, 68(4):720-727.

20. Keshetty V., Pabba S., Gudipati R., Kandukuri J.M., Allenki V. 2009. Antihyperlipidemic activity of methanolic extract of garlic (Allium sativum L.) in triton X-100 induced hyperlipidemic rats. *Journal of Pharmaceutical Research*, 2(5):23-31.

21. Kishore S.P., Blank E., Heller D.J., Patel A., Peters A., Price M., Vidula M., Fuster V., Onuma O., Huffman M.D. 2018. Modernizing the World Health Organization list of essential medicines for preventing and controlling cardiovascular diseases. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(5):564-574.

22. Kosari M., Hasanpour M.R., Nuredini M., Safarpour Kachalpour E., Ahmadi R., Kosari M. 2013. Effect of methanol extract and hyoscyamuzides extracted hyoscyamous niger on blood pressure in Wistar rats. *Journal of Nurse and Physition whitin War*, 2013: 20-24.

23. Lekar A., Borisenko S., Vetrova E., Sushkova S., Borisenko N., 2014. Extraction of quercetin from Polygonum hydropiper L. by subcritical water. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 9(1):1.

24. Luo Y., Duan H., Qian Y., Feng L., Wu Z ,.Wang F., Feng J., Yang D., Qin Z., Yan X. 2017. Macrophagic CD146 promotes foam cell formation and retention

A1. Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins: Springer, p: 399-420.

34. Verma P.K., Raina R., Sultana M., Singh M. 2016. Modulatory effect of Calendula officinalis on altered antioxidant status and renal parameters in diabetic rats. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 2(4):52-64.

35. Veseli B.E., Perrotta P., De Meyer G.R., Roth L., Van der Donckt C., Martinet W., De Meyer G.R. 2017. Animal models of atherosclerosis. *European Journal of pharmacology*, 816:3-13.

36. Yui Y., Aoyama T., Morishita H., Takahashi M., Takatsu Y., Kawai C. 1988. Serum prostacyclin stabilizing factor is identical to apolipoprotein AI (Apo AI .(A novel function of Apo AI. *The Journal of Clinical Investigation*, 82(3):803-807.

37. Zarei A., Ashtiyani S.C., Taheri S., Rasekh F. 2014. Comparison between effects of different doses of Melissa officinalis and atorvastatin on the activity of liver enzymes in hypercholesterolemia rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4(1):15-23.

38. Zhang W., Zhang W., Luo J., Kong L. 2013. A new steroidal glycoside from the seeds of Hyoscyamus niger. *Natural Product Research*, 27(21):1971-1974.

Comparative Effect of Simvastatin with Methanolic Extract and Hyoscyamoside Extracted from *Hyoscyamus niger* Plant on *APO A* Gene Expression in Wistar Atherosclerosis Male Rats

Ronak Abdolmohammadi, Maryam Bananej*, Maryam Khosravi, Hengameh Alibeik

Department Biology, North-Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of the artery that is mainly known by arterial wall thickening. The use of medicine herbs with minimal side effects in hypercholesterolemia treatment and removal of atherosclerotic plaque is important. The aim of the present study was to investigate the comparative effect of simvastatin with methanolic extract and hyoscyamoside extracted from *Hyoscyamus niger* plant on *APO A* gene expression in Wistar atherosclerosis male rats.Forty Wistar male rats weighing approximately 180 gr (at the beginning of the experiment) were prepared and randomly divided into 5 groups including 8 (control, sham, experimental 1, 2 and 3). All groups (except control) received fatty foods (1% cholesterol) in addition to 2% cholesterol for 40 days (receiving saline water 1 mg/kg daily by control group during this period). Then, the three experimental groups were treated daily with 40 mg/kg of simvastatin, 25 mg/kg of hyoscyamoside and 25 mg/kg of methanolic extract of *Hyoscyamus niger* plant for 28 days, respectively. During the treatment, sham group received 1 mg/kg saline water daily. Finally, *APO A* gene expression was determined by blood sampling with real-time PCR tecnique in leukocytes. Also, serum lipid levels were measured by photometric method. Methanolic extract and *Hyoscyamus niger* plant extracted-hyoscyamoside and simvastatin were caused a significant increase in *APO A* gene expression in all three experimental groups compared to sham group. Also, methanolic extract was more effective than other products in increasing this gene expression. Methanolic extract of *Hyoscyamus niger* plant and extracted hyoscyamoside have an additive effect on *APO A* gene expression and increase serum HDL levels.

Keywords: Atherosclerosis, Serum lipids, Apo A gene, Contractile tone; Simvastatin, Hyoscyamoside.