فصلنامه (علمی – پژوهشی)
زیست شناسی تکوینی
سال سیزدهم، شماره ۲، بهار ۱۴۰۰ ص. ۴۶-۳۹

مقاله پژوهشی

اثر عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه (*Cucumis melo* L.) بر بیان کبدی ژن‌های کد کننده *NADPH* اکسیداز و گلوتاتیون پراکسیداز در موش‌های صحرایی مسموم شده توسط اتیلن گلیکول

مهرنوش سادات‌حسینی[۱]، سیامک یوسفی‌سیاه‌کلرودی[۲*]، مریم عیدی[۲]

[۱] گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران
[۲] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران

*Email: siamakyousefi@iauvaramin.ac.ir

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۰

چکیده

مسمومیت کبدی همیشه با استرس اکسیداتیو و التهاب همراه است و آنتی‌اکسیدان‌ها موجب کاهش اثرات عوامل سمی بر کبد می‌شوند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان مکانیسم کلی است که توسط آن اکثر گیاهان از کبد محافظت می‌کنند. در مطالعه حاضر تاثیر عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه بر سطح بیان ژن‌های *Nox4* و *gpx1* در موش‌های مسموم‌شده با اتیلن‌گلیکول مورد ارزیابی قرار گرفت. در مطالعه حاضر در ابتدا عصاره دانه خربزه به روش خیساندن در اتانل ۸۰ درصد تهیه شد، موش‌ها در ۵ گروه ۶ تایی به‌صورت یک گروه کنترل سالم، یک گروه کنترل مسموم و سه گروه مسموم تجربی تقسیم شدند. به گروه مسموم تجربی غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه به‌صورت خوراکی خورانده شد. موش‌ها به‌مدت ۳۸ روز تیمار شده و سپس کبد موش‌ها خارج شده و سپس RNA کل استخراج شد. سپس cDNA ساخته شده و میزان بیان ژن‌های مورد نظر و همین‌طور ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن خانه‌دار با روش Real time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد تیمار روزانه خوراکی اتیلن گلیکول موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن کدکننده *nox4* و *gpx1* در گروه‌های مسموم نسبت به کنترل سالم می‌شود. افزایش بیان ژن *nox4* و *gpx1* نشان‌دهنده وقوع التهاب ناشی از مصرف اتیلن‌گلیکول و مسمومیت آن می‌باشد. تیمار عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنی‌دار بیان هر دو ژن در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل مسموم می‌شود. کاهش میزان بیان ژن *nox4* در مقایسه با گروه کنترل مسموم نشان می‌دهد مصرف عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه موجب کاهش التهاب ناشی از مسمومیت با اتیلن گلیکول شده است. با توجه به این‌که به‌دنبال مسمومیت کبدی ناشی از اتیلن گلیکول میزان H_2O_2 افزایش می‌یابد به‌همین دلیل میزان بیان ژن کدکننده گلوتاتیون‌پراکسیداز (*gpx*) افزایش می‌یابد.

به‌دنبال تیمار با عصاره هیدرواتانلی خربزه، میزان تولید H_2O_2 کاهش می‌یابد که این کاهش می‌تواند به‌دلیل اثرات ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره باشد. بنابراین به‌دلیل کاهش H_2O_2 عامل محرک بر افزایش بیان ژن گلوتاتیون‌پراکسیداز (*gpx*) وجود نداشته و بنابراین میزان بیان این ژن نیز کاهش می‌یابد. بنابراین، با توجه به کاهش میزان بیان هر دو ژن گلوتاتیون‌پراکسیداز (*gpx*) و *NADPH* اکسیداز (*nox4*) و ارتباط میزان بیان هر دو ژن با میزان H_2O_2، به‌نظر می‌رسد عصاره هیدروالکلی دانه خربزه به‌دلیل اثرات آنتی‌کسیدانتی موثر موجود در آن میزان H_2O_2 کاهش یافته و به‌همین دلیل میزان بیان این دو ژن نیز کاهش می‌یابد.

کلیدواژه‌ها: مسمومیت کبدی، اتیلن گلیکول، گلوتاتیون‌پراکسیداز، *NADPH* اکسیداز.

مقدمه

کبد در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی مهم مانند هموستاز گلوکز، تولید پروتئین‌های ضروری، تولید لیپوپروتئین و لیپیدها، تولید و ترشح اسیدهای صفراوی و ذخیره ویتامین نقش مهمی ایفا می‌کند. آسیب به کبد می‌تواند به‌دلیل سوء مصرف مزمن الکل، هپاتیت ویروسی، اختلال متابولیک ارثی و مواد شیمیایی ایجاد شود [۱].

اتیلن‌گلیکول مایعی بی‌رنگ، بی‌بو و نسبتاً غیرقابل اشتعال است که معمولاً به‌عنوان یک ماده شیمیایی صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آن‌جا که اتیلن‌گلیکول مزه شیرین دارد ممکن است مخصوصاً توسط کودکان به‌طور اتفاقی خورده شده یا توسط بزرگسالان به‌عنوان یک جایگزین اتانول و یا برای خودکشی مصرف شود. مسمومیت با اتیلن‌گلیکول می‌تواند عوارض و مرگ و میر بالایی داشته باشد [۲]. اتیلن گلیکول بعد از مصرف، به سرعت در دستگاه گوارش جذب شده و غلظت سرمی آن بلافاصله افزایش می‌یابد. حجم توزیع اتیلن‌گلیکول حدود ۰/۷ L/Kg است [۳]. متابولیسم اتیلن گلیکول مانند اتانول و متانول، توسط آنزیم الکل دهیدروژناز موجود در مخاط معده شروع می‌شود، سپس در کبد به گلی اکسیلیک تبدیل می‌شود. گلی اکسیلیک اسید ماده اولیه اگزالیک اسید است که موجب نفروتوکسیک متابولیت[1] می‌شود [۴و۵]. هنگامی که الکل دهیدروژناز مهار شده باشد، اتیلن گلیکول متابولیزه نشده و به این ترتیب تجزیه آن وابسته به کلیه بوده و در نتیجه نیمه‌عمر اتیلن‌گلیکول به ۱۰-۱۸ ساعت افزایش می‌یابد [۶].

سیستم‌های آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به‌صورت مؤثر، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) اضافی را برای حفظ هومئوستازی سلول‌های طبیعی کبد از بین می‌برند. در بیماری‌های مزمن کبدی، افزایش تولید ROS و هم‌چنین کاهش فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی رخ می‌دهد که منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود. این ویژگی معمولاً در بیماران مبتلا به سوء مصرف الکل (از جمله اتیلن گلیکول)، عفونت ویروس هپاتیت C، اضافه بار آهن یا کلستاز مزمن[2] و هم‌چنین در اکثر انواع فیبروژنز تجربی کبدی مشاهده می‌شود [۷]. در پاسخ به اندوتوکسین‌ها، ماکروفاژهای کبدی ساکن و سلول‌های کوپفر از طریق القاء تولید ROS توسط NOX1 و NOX2 فعال می‌شوند.

آنتی‌اکسیدان‌ها موجب کاهش اثرات عوامل سمی بر کبد می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در بسیاری از ترکیبات به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه طبقه‌بندی می‌شوند. پلی‌فنول‌ها (اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها) و ترپنوئیدها (کاروتنوئیدها) و مصرف غذاهای حاوی این ترکیبات به مقدار زیادی نقش مهمی در جلوگیری از بسیاری از بیماری‌ها دارند [۱]. خربزه دارای مقدار زیادی ویتامین A و C و سلولز است. خربزه اثر مدر دارد و از این نظر در دفع مواد زائد و رسوبات ادراري مؤثر واقع مي‌شود [۸].

با توجه به اثرات آنتی اکسیدانی موجود در خربزه و نقش مهم دو آنزیم NADPH اکسیداز و گلوتاتیون‌پراکسیداز در مهار مسمومیت کبدی، در تحقیق حاضر اثر عصاره دانه خربزه بر بیان کبدی ژن‌های کدکننده *NADPH* اکسیداز و

[1] nephrotoxic metabolite

[2] chronic cholestasis

گلوتاتیون‌پراکسیداز در موش‌های صحرایی نر مسموم شده با اتیلن گلیکول مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی- مقایسه‌ای، تاثیر عصاره هیدرواتانلی (۸۰ %) دانه خربزه بر بیان ژن‌های کدکننده *gpx1*، *nox4* و *GAPDH* در بافت کبد موش‌های صحرائی نر مسموم شده توسط اتیلن گلیکول مورد بررسی قرار گرفت.

تهیه عصاره هیدرواتانلی از دانه خربزه

دانه خربزه (*Cucumiss melo* L.) از منطقه ورامین خریداری شده، دانه‌ها جداسازی شد و پس از تایید توسط متخصص گیاه‌شناسی (کد هرباریومی ۱۱ ۳۵۷، موسسه تحقیقات اصلاح وتهیه نهال و بذر) در سایه و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد خشک شد. سپس دانه‌ها به‌وسیله آسیاب برقی خرد و پودر شدند. برای تهیه عصاره هیدرواتانلی مقدار ۳۰۰ گرم از پودر با ۲۵۰۰ میلی‌لیتر اتانل ۹۸ درصد مخلوط و به‌مدت ۷۲ ساعت در ظرف در بسته و در تاریکی نگه‌داری شد. سپس، مخلوط با استفاده از فیلتر کاغذی (کاغذ واتمن) صاف شد و حلال توسط روتاری جدا شد و برای خشک شدن کامل عصاره در بن ماری $50^{\circ}C$ قرارداده شد و تا زمان شروع آزمایشات در ظرف دربسته در دمای $-4^{\circ}C$ نگه‌داری شد.

حیوانات آزمایشگاهی

در این مطالعه ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار *wistar* با وزن ۲۰±۱۸۰ گرم مورد استفاده قرار گرفت. موش‌های صحرایی از انستیتو پاستور کرج تهیه شدند و برای سازگاری با شرایط به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایشات در محیط آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا نگه‌داری شدند. در تمام مدت آزمایش، موش‌های صحرایی در قفس‌های استاندارد، دمای ۲±۲۴ سانتی‌گراد، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و رطوبت ۴۰ درصد نگه‌داری شدند. در این مدت موش‌های صحرایی به‌صورت آزادانه به غذای استاندارد و آب دسترسی داشتند. تمامی مراحل آزمایش پس از دریافت مجوز مورد نیاز از کمیته ملي اخلاق در پژوهش‌هاي زيست پزشكي (IR.IAU.VARAMIN.REC.1398.021) اجرا شدند.

گروه‌های مورد مطالعه

رت‌های مورد مطالعه به‌صورت تصادفی در ۵ گروه ۶ تایی تقسیم بندی شده و به‌صورت ۳ تایی در قفس‌های مجزا نگه‌داری شدند. دوره تیمار ۳۸ روز اجرا شد. گروه‌های مورد مطالعه شامل موارد زیر بودند:

گروه کنترل سالم: که هیچ تیماری دریافت نکردند (n = ۶).

گروه کنترل مسموم: که به‌مدت ۳۸ اتیلن گلیکول (۰/۷۵ درصد) در آب آشامیدنی دریافت کردند (n = ۶).

گروه‌های مسموم تجربی: که علاوه بر دریافت اتیلن گلیکول (۰/۷۵ درصد) در آب آشامیدنی غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه به‌صورت خوراکی به‌مدت ۳۸ روز دریافت کردند (۰/۷۵ درصد).

نمونه‌گیری از حیوانات

برای انجام آنالیزهای مورد نیاز در این بررسی، ابتدا رت‌ها با استفاده از اتر بی‌هوش شده و سپس با ایجاد شکاف عرضی در ناحیه شکمی، اندام‌های داخلی خارج شده و دسترسی به کبد فراهم شد. سپس کبد رت‌ها برای مطالعه بیان ژن‌ها برداشته‌شد. سپس بافت‌های اضافی اطراف کبد مانند بافت چربی حذف شد. این نمونه‌ها بلافاصله بسته‌بندی شده و در تانک ازت قرارداده شد. پس از انتقال به آزمایشگاه نمونه‌ها بلافاصله در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرارداده شد.

استخراج RNA کل از نمونه‌های به‌دست آمده

استخراج RNA از بافت کبد موش‌ها، با استفاده از کیت GeneAll ساخت کشور کره و با توجه به دستورالعمل کیت انجام شد.

سپس به‌منظور حذف DNA ژنومی از RNA، تیمار با DNase انجام شد. جهت بررسی کمی RNA استخراج-شده از روش اسپکترومتری و با استفاده از دستگاه Nanodrop انجام شد. از نسبت جذب نمونه مورد نظر در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر برای تعیین درجه خلوص RNA استفاده شد. برای سنتز cDNA از کیت شرکت Genall استفاده شد. طبق دستورالعمل کیت، ۴۰۰ نانو گرم RNA کل با آب DNase and RNase free ترکیب گردید تا حجم نهایی ۱۰ μl برسد. سپس به‌مدت ۵ دقیقه در بن ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه میزان ۱۰ μl از Master Mix همراه با پرایمر Oligo dt به آن اضافه شده و به آرامی مخلوط و در دستگاه ترموسایکلر (BIO RAD) گذاشته شد [۱]. برای بررسی کیفیت cDNA و بهینه‌سازی دقیق تمام اجزا و شرایط واکنش، واکنشPCR طبق پروتکل کیت Amplicon (Germany) انجام شد.

جدول ۱: مراحل درجه حرارت و مدت زمان لازم و تعداد سیکل برای PCR

Temperature (°C)	Duration (s)	Cycles	Step
95	300	1	Initial denaturation
95	30	30	Denaturation
60	40		Annealing
72	30		Extention
72	300	1	final extention

طراحی پرایمر

پرایمرهای مورد نیاز برای اندازه‌گیری کمی بیان ژن‌های مورد با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی شدند. به این منظور ابتدا توالی mRNA ژن‌های مورد نظر از سایت NCBI[1] دریافت شدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer3 پرایمرها طراحی شدند. سپس بررسی اختصاصیت پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Blast NCBI ارزیابی شد. در نهایت برای بررسی تشکیل ساختارهای ثانویه در پرایمرها از نرم‌افزار Oligo analyzer (IDT) استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد نظر در ۲ مشخص شده است.

برای انجام Real-Time PCR از دستگاه Rotor-Gene-Q از شرکت Qiagene استفاده گردید. کیت مخصوص Quanti Nova SYBER Green PCR Kit استفاده شد. به‌ازای هر نمونه cDNA سه بار واکنش Real-Time PCR انجام شد. هم‌چنین، برای اطمینان از عدم آلودگی، برای هر ژن سه کنترل منفی در نظر گرفته شد که میزان الگوی مورد نظر (cDNA) با آب مقطر جایگزین گردید. به منظور انجام Real-Time PCR، مواد با هم ترکیب شده و سپس طبق جدول۳ در دستگاه Rotor-Gene-Q گذاشته شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های به‌دست آمده از روش real-time PCR با استفاده از نرم‌افزار Rest مورد آنالیز و ارزیابی آماری قرار گرفت. در این نرم‌افزار تغییرات بیان ژن‌های مورد نظر در نمونه‌های بافت کبدی نسبت به بافت سالم به‌صورت

جدول۲: توالی پرایمرهای طراحی شده

نام ژن		توالی (`5→3`)	اندازه (bp)	اندازه محصول PCR (bp)
gpx1	Forward	CTGGGCTCTGACTGCGCTAC	20	70
	Reverse	GAGCCGAGCAGCAGACATAC	20	
nox4	Forward	TACTGCCTCCATCAAGCCAA	20	147
	Reverse	CAATGCCTCCAGCCACACAC	20	
GAPDH	Forward	TGCCAGCCTCGTCTCATAG	19	197
	Reverse	ACTGTGCCGTTGAACTTGC	19	

[1] National Center for Biotechnology Research

جدول۳ : مراحل درجه حرارت و مدت زمان لازم و تعداد سیکل برای Real-Time PCR

Temperature (°C)	Duration (s)	Cycles	Step
95		1	Initial denaturation
95	30		Denaturation
60	60	40	Annealing
72	15		Extention
95	30	1	Hold

$2^{-\Delta\Delta ct}$ محاسبه شد. اختلافات و تفاوت‌های بین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ و تست ANOVA one-way تعیین گردید. با استفاده از این نرم‌افزار، سطح معنی‌داری و SD (Standard Deviation) داده‌ها، مشخص شده و نمودارها رسم شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزارExcel ترسیم شده‌اند.

نتایج

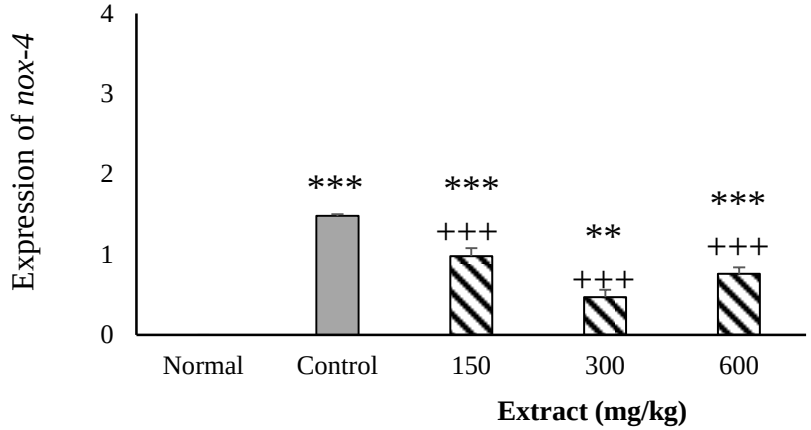
نتایج تحقیق حاضر نشان داد تیمار روزانه خوراکی اتیلن گلیکول موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن کدکننده *nox-4* در کبد گروه‌های مسموم نسبت به کنترل سالم (Normal) می‌شود ($p<0.001$). تیمار عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن کدکننده *nox-4* در کبد گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل مسموم (Control) (به‌میزان ۱/۱۶ برابر) می‌شود (نمودار ۱).

علاوه براین نتایج بررسی تغییرات بیان ژن *gpx-1* نشان داد تیمار روزانه خوراکی اتیلن گلیکول موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن کدکننده *gpx-1* در کبد گروه‌های مسموم نسبت به کنترل سالم (Normal) می‌شود ($p<0.001$). تیمار عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن کدکننده *gpx-1* در کبد گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل مسموم (Control) (به‌میزان ۱۰ برابر) می‌شود (نمودار ۲).

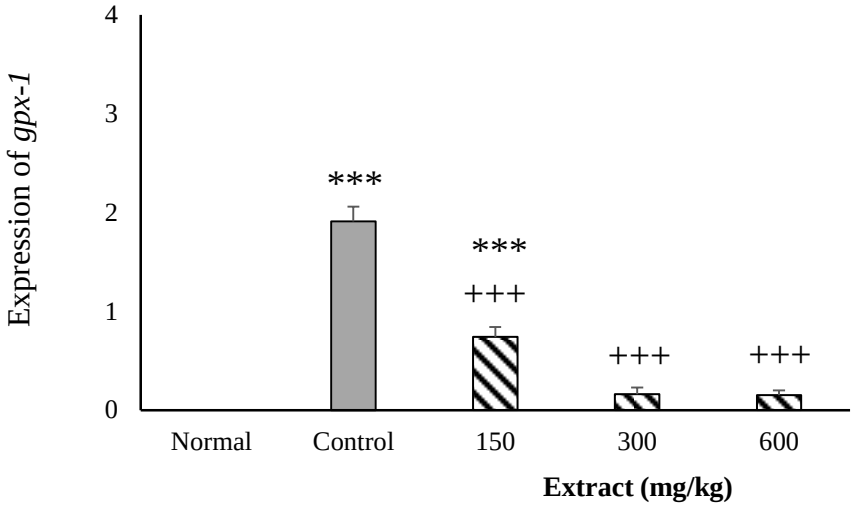
بحث و نتیجه‌گیری

کبد اندام اصلی مسئول متابولیسم داروها و مواد شیمیایی سمی است و هم‌چنین نخستین اندامی است که مواد شیمیایی برای متابولیزه شدن به آن وارد می‌شوند [۹]. پس از مصرف زیاد اتیلن‌گلیکول، بیمار علائم مسمومیت سیستم عصبی مرکزی (CNS) مشابه اتانول را نشان می‌دهد. این متابولیت‌ها باعث اسیدوز متابولیک شدید و افزایش شکاف آنیونی می‌شوند [۱۰]. آنتی‌اکسیدان‌ها موجب کاهش اثرات عوامل سمی بر کبد می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در بسیاری از ترکیبات به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه طبقه‌بندی می‌شوند [۱]. سمیت کبدی همیشه با استرس اکسیداتیو و التهاب همراه است و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان مکانیسم کلی است که توسط آن اکثر گیاهان از کبد محافظت می‌کنند [۱].

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد تیمار روزانه خوراکی اتیلن گلیکول موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن کدکننده *nox4* در گروه‌های مسموم نسبت به کنترل سالم می‌شود. از آن‌جا که در اغلب موارد بروز التهاب کبدی موجب افزایش بیان ژن *nox4* می‌شود بنابراین، افزایش بیان ژن *nox4* نشان‌دهنده وقوع التهاب ناشی از مصرف و مسمومیت با اتیلن‌گلیکول می‌باشد. تیمار عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن کدکننده *nox4* در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل مسموم (Control) می‌شود. کاهش میزان بیان ژن *nox4* در مقایسه با گروه کنترل مسموم نشان می‌دهد مصرف عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه موجب کاهش التهاب ناشی از مسمومیت با اتیلن گلیکول شده است. *nox4* یکی از همولوگ‌های NADPH اکسیداز محسوب می‌شود [۱۱]. آنزیم در اندامک‌های داخل سلولی منجر به آزاد شدن سوپراکسید به لومن اندامک‌ها می‌شود که در آن به سرعت به پراکسیدهیدروژن تبدیل می‌شود. پراکسید هیدروژن غیرقطبی



نمودار ۱: اثر تیمار خوراکی عصاره هیدرو اتانلی دانه خربزه در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۳۸ روز بر بیان ژن کدکننده *nox*-4 در کبد موش‌های صحرایی مسموم شده توسط اتیلن گلیکول. هر ستون Mean ± SD را برای ۶ سر موش صحرایی نشان می‌دهد. p<0.001 * ، p<0.01** نشان دهنده اختلاف از گروه کنترل سالم (Normal) و p<0.001+++ نشان‌دهنده اختلاف از گروه کنترل مسموم (Control) می‌باشد.**



نمودار ۲: اثر تیمار خوراکی عصاره هیدرو اتانلی دانه خربزه در غلظت های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۳۸ روز بر بیان ژن کدکننده *gpx*-1 در کبد موش‌های صحرایی مسموم شده توسط اتیلن گلیکول. هر ستون Mean ± SD را برای ۶ سر موش صحرایی نشان می‌دهد.
p<0.001*** نشان دهنده اختلاف از گروه کنترل سالم (Normal) و p<0.001+++ نشان دهنده اختلاف از گروه کنترل مسموم (Control) می‌باشد.

است به‌همین دلیل می‌تواند از طریق غشاها پخش شده و به فضای خارج سلول برسد [۱۲]. از طرفی، القاء استرس اکسیداتیو در کبد به‌دنبال مسمومیت الکلی ثابت شده است و نتیجه آن افزایش تولید ROS در کبد است. ROS می‌تواند موجب القاء مسیرهای سیگنالینگی شود که در نهایت کبد را به سمت فیبروز پیش می‌برند و یا این که از طریق تولید رادیکال‌های پراکسی‌نیتریت یا آلفا-هیدروکسی اتر نقش مستقیمی در مسمومیت کبدی داشته باشد (۱۱). بنابراین، افزایش میزان بیان ROS در سلول‌های کبدی به‌دنبال مسمومیت با اتیلن گلیکول می‌تواند در جهت فعال‌نمودن مسیرهای سیگنالینگ منجر به مرگ سلولی از طریق آپاپتوز باشد. از طرفی کاهش بیان این آنزیم نیز می‌تواند بیانگر اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه باشد که نه تنها میزان رادیکال‌های فعالی مانند پراکسید

هیدروژن را کاهش داده و در ادامه رونویسی از ژن کدکننده *nox4* نیز کاهش می‌یابد. به این ترتیب این عصاره علاوه بر نقش درمانی در کاهش اثرات مسمومیت کبدی، مانع از مرگ سلولی ناشی از آپاپتوز شود.

گلوتاتیون (GSH)، رادیکال هیدروکسیل و سوپراکسید را مستقیماً از بین می‌برد و در متابولیسم پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) و پراکسیدهای لیپیدی به‌عنوان یك کوفاکتور مؤثر برای آنزیم گلوتاتیون‌پراکسیداز (*gpx*) عمل می‌کند [۱۳]. علاوه براین، به‌واسطه عملکرد خانواده آنزیم‌های گلوتاتیون-S-ترانسفراز (GST)، GSH می‌تواند با انواع ترکیبات الکتروفیل درون‌زا و زنوبیوتیک، ترکیب‌شده و به‌صورت ایمن و کارآمد آن‌ها از بدن پاک‌سازی نماید [۱۴]. در مطالعه حاضر در مرحله اول تاثیر مسمومیت با الکل بر سطح بیان ژن کدکننده *gpx* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد تیمار روزانه خوراکی اتیلن گلیکول موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن کدکننده *gpx-1* در گروه‌های مسموم نسبت به کنترل سالم می‌شود. همان‌طورکه اشاره شد خانواده NOX از اکسیدازها تحت شرایط فیزیولوژیکی ROS را تولید می‌کنند که بخش عمده‌ای از ROS مرتبط با سیگنالینگ به‌واسطه گیرنده را تشکیل می‌دهند. با این‌حال، ROS معمولاً در شرایط عفونت، التهاب، زنوبیوتیک و استرس درون سلول افزایش می‌یابد [۱۵]. در میتوکندری سلول‌های کبدی کاتالاز وجود ندارد و بنابراین مهم‌ترین آنزیم از بین برنده H_2O_2، گلوتاتیون‌پراکسیداز (*gpx*) محسوب می‌شود. به‌همین دلیل مطابق نتایج مطالعه حاضر، میزان بیان گلوتاتیون‌پراکسیداز (*gpx*) به‌دنبال مسمومیت کبدی ناشی از اتیلن گلیکول افزایش یافته است تا افزایش تولید H_2O_2 را در این سلول‌ها تعدیل نماید. تیمار عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن کدکننده *gpx-1* در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل مسموم می‌شود. با توجه به این‌که به‌دنبال مسمومیت کبدی ناشی از اتیلن گلیکول میزان H_2O_2 افزایش می‌یابد به‌همین دلیل میزان بیان ژن کدکننده گلوتاتیون‌پراکسیداز (*gpx*) افزایش می‌یابد. به‌دنبال تیمار با عصاره هیدرواتانلی خربزه، میزان تولید H_2O_2 کاهش می‌یابد که این کاهش می‌تواند به‌دلیل اثرات ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره باشد. بنابراین به‌دلیل کاهش H_2O_2 عامل محرک بر افزایش بیان ژن گلوتاتیون‌پراکسیداز (*gpx*) وجود نداشته و بنابراین میزان بیان این ژن نیز کاهش می‌یابد.

در مطالعه‌ای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی عصاره آبی برگ *Thunbergia laurifolia* در برابر آسیب کبدی القاء شده توسط الکل در موش صحرایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره برگ *T. laurifolia* سطح MDA کبدی را کاهش داده و موجب بهبودی پاتولوژی کبد و کاهش بیان mRNA ژن‌های *cyp2e1*، *nadph* oxidase می‌شود. یعنی عصاره *T. Laurifolia* از طریق مکانیسم مربوط به مهار استرس اکسیداتیو و التهاب اثرات محافظت کننده در برابر آسیب کبدی ناشی از الکل نشان می‌دهد (۱۶). در تحقیق دیگری تأثیر عصاره هیدروالکلی قسمت‌هاي هوایی گیاه *Scropholaria striata* بر افزایش بیان ژن گلوکوکیناز در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیده شد. به‌طوری‌که موش‌هاي دیابتی کاهش چشمگیري در میزان بیان ژن آنزیم گلوکوکیناز کبدي نشان دادند، اما این سطوح پس از تیمار ۵ هفته‌اي با دوزهاي ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش یافت به‌نحوی‌که با افزایش غلظت این افزایش بیان ادامه داشت، یعنی مصرف ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی بخش‌هاي هوایی *S. striata* در مقایسه با گروه کنترل دیابتی سبب افزایش بیان ژن آنزیم گلوکوکیناز شد (۱۷). مقایسه نتایج بالا با یافته‌های مطالعه اخیر نشان می‌دهد که به‌طورکلی استفاده از گیاهان دارویی تا چه حد در میزان بیان ژن‌ها و درمان بیماری‌ها موثر است.

نتیجه‌گیری: با توجه به کاهش میزان بیان هر دو ژن گلوتاتیون‌پراکسیداز (*gpx*) و NADPH اکسیداز (*nox4*) و ارتباط میزان بیان هر دو ژن با میزان H_2O_2 ، به‌نظر می‌رسد عصاره هیدروالکلی دانه خربزه به‌دلیل اثرات آنتی‌کسیدانتی موثر موجود در آن میزان H_2O_2 کاهش یافته و احتمال دارد با کاهش التهاب و آسیب موجب کاهش میزان بیان این دو ژن شود.

منابع

[1] Abbaszadeh S, Andevari AN, Koohpayeh A, Naghdi N, Alizadeh M, Beyranvand F, et al. Folklore medicinal plants used in liver disease: A review. Int J Green Pharm. 2018;12(3):S463-72.

[2] Mowry JB, Spyker DA, Brooks DE, Zimmerman A, Schauben JL. 2015 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 33rd Annual Report. Clin Toxicol. 2016;54(10):924-1109.

[3] Jacobsen D, Hewlett TP, Webb R, Brown ST, Ordinario AT, McMartin KE. Ethylene glycol intoxication: Evaluation of kinetics and crystalluria. Am J Med [Internet]. 1988 Jan;84(1):145-52. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002934388900241

[4] Kraut JA, Mullins ME. Toxic Alcohols. Campion EW, editor. N Engl J Med [Internet]. 2018 Jan 18;378(3):270-80. Available from: http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1615295

[5] Ng PCY, Long BJ, Davis WT, Sessions DJ, Koyfman A. Toxic alcohol diagnosis and management: an emergency medicine review. Intern Emerg Med [Internet]. 2018 Apr 9;13(3):375-83. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11739-018-1799-9

[6] Sivilotti MLA, Burns MJ, McMartin KE, Brent J. Toxicokinetics of ethylene glycol during fomepizole therapy: Implications for management. Ann Emerg Med [Internet]. 2000 Aug;36(2):114-25. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196064400100976

[7] Kim KY, Choi I, Kim SS. Progression of hepatic stellate cell activation is associated with the level of oxidative stress rather than cytokines during CCl4-induced fibrogenesis. Mol Cells [Internet]. 2000 Jun 30;10(3):289-300. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10901167

[8] Zargari A. Medicinal Plants. Tehran: Tehran University Publication; 1996. 356 p.

[9] Garg U, Lowry J, Algren DA, Ethylene Glycol and Other Glycols, in: Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing. Elsevier, 2019; pp. 59-69. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815607-0.00005-8.

[10] Guo C, Cenac TA, Li Y, McMartin KE, Calcium oxalate, and not other metabolites, is responsible for the renal toxicity of ethylene glycol. Toxicol. Lett. 2007; 173(1): 8-16. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.06.010.

[11] Geiszt M, Kopp JB, Várnai P, Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2000 Jul 5;97(14):8010-4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869423.

[12] Bedard K, Krause K-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. Physiol Rev [Internet]. 2007 Jan;87(1):245-313. Available from: https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00044.2005.

[13] Chen Y, Dong H, Thompson DC, Shertzer HG, Nebert DW, Vasiliou V. Glutathione defense mechanism in liver injury: Insights from animal models. Food Chem Toxicol. 2013;60:38-44.

[14] Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. Biochem Pharmacol [Internet]. 2003 Oct 15;66(8):1499-503. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14555227.

[15] Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria J Med [Internet]. 2018;54(4):287-93. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001.

[16] Palipoch S, Koomhin P, Punsawad C, Suwannalert P, Effect of aqueous leaf extract of Thunbergia laurifolia on alcohol-induced liver injury in rats. Trop. J. Pharm. Res. 2019;18: 823-828.

[17] Bagrezaei F, Mahmoodi M, Rezaian M, Mirzaei MR, Nazari M, Khorramdel H, Hajizadeh MR, Mohammadian F. The study of Effect of hydroalcoholic Extract of Airial Parts of Scropholaria Striata on the Glucokinase Gene Expression in Type 1 Diabetic Rats. Community Health journal 2014;7(4): 45- 52.

Effect of hydro-ethanolic extract of *Cucumis melo* seeds on hepatic expression of genes encoding NADPH-oxidase and glutathione peroxidase in ethylene glycol-induced toxicity in male rats

Hoseinii M.S.[1], Yousefi Siahkalroodi S.[2]*, Eidi M.[2]

[1] Department of Genetic, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran

*Email: siamakyousefi@iauvaramin.ac.ir

Received: March 2021 Accepted: July. 2021

Abstract

effects of toxins on the liver. The antioxidant activity of plants is the general mechanism by which most plants protect the liver. In the present study, the effect of hydroanthanolic extract of melon seed on the expression level of NOX4 and GPx1 genes in ethylene glycol poisoned mice was evaluated. In the present study, melon seed extract was first prepared by soaking in 80% ethanol. Mice were divided into 5 groups in each group 6 rat: a healthy control group, a poisoned control group and three experimental poisoned groups. To the experimental poisoned group, concentrations of 150, 300 and 600 mg / kg of hydroethanolic extract of melon seed were fed orally. The mice were treated for 38 days and then the mice's liver was removed and then total RNA was extracted. Then cDNA was constructed and the expression of the desired genes as well as GAPDH gene as housewife gene was evaluated by Real time PCR. The results of the present study show that daily oral administration of ethylene glycol significantly increases the expression of genes encoding NOX4 and GPx1 in toxic groups compared to healthy controls. Increased expression of NOX4 and GPx1 genes indicates the occurrence of ethylene glycol-induced inflammation and toxicity. Treatment with hydroethanolic extract of melon seed at concentrations of 150, 300 and 600 mg / kg body weight significantly reduced the expression of NOX4 and GPx1 genes in the experimental groups compared with the control group. Decreased expression of NOX4 gene in comparison with the poisoned control group shows that administration of hydro-ethanolic extract of melon seed has reduced inflammation caused by ethylene glycol toxicity. Due to the fact that the amount of H_2O_2 increases following hepatotoxicity caused by ethylene glycol, the expression of the gene encoding glutathione peroxidase (GPx) increases. Following treatment with melon hydro-ethanolic extract, H_2O_2 production is reduced, which may be due to the effects of antioxidant compounds in the extract. Therefore, due to the decrease in H_2O_2, there is no stimulus for increasing the expression of glutathione peroxidase (GPx) gene, and therefore the expression of this gene also decreases. In addition, due to the decrease in the expression of both glutathione peroxidase (GPx) and NADPH oxidase (NOx4) genes and the relationship between the expression of both genes and H_2O_2, it seems that the hydro-ethanolic extract of melon seed decreased H2O2 due to its effective antioxidant effects and therefore the expression of these genes are reduced.

Keywords: hepaotoxicity, ethylene glycohol, glutathione peroxidase, NADPH oxidase.