

Protective Effect of Epicatechin on Survival of PC12 Neurons Exposed to Valproic Acid

Mohammad Shokrzadeh¹,
Abbas Mohammad pour²,
Zahra Tajik³,
Maryam Alizadeh⁴,
Shaghayegh Aghajanshakeri⁵

¹ Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Sana University, Sari, Iran

³ MSc Student in Genetics, Faculty of Pharmacy, Sana University, Sari, Iran

⁴ MSc in Applied Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ PhD in Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Abstract

Background and purpose: It is well established that valproic acid (VPA) is teratogenic associated with oxidative stress in humans and in all animal species tested. In this study, considering the chemical composition of catechins, we investigated its protective effect on the survival of PC12 nerve cells exposed to valproic acid.

Materials and methods: The protective effects of epicatechin (EC) at different concentrations (10, 50, 100, 500, 1000 µg/ml) on survival and viability of PC12 neuronal cells exposed to valproic acid were measured by MTT assay and oxidative stress tests (GPx, SOD, ROS, and lipid peroxidation). All data were analyzed in GraphPad Prism 8.0 using one-way ANOVA and Tukey post-test.

Results: According to findings, EC reduced the cytotoxic effects of valproic acid at 500 and 1000 µg/ml ($P < 0.0001$). EC significantly reduced the oxidative stress induced by valproic acid via decreasing reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) production ($P < 0.001$ and $P < 0.0001$, respectively).

Conclusion: The present study showed that epicatechin could increase antioxidant potential and exhibits significant cytoprotective effect against valproic acid toxicity in PC12 cells.

Keywords: oxidative stress, epicatechin, valproic acid, PC12

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (220): 31-42 (Persian).

Corresponding Author: Shaghayegh Aghajanshakeri - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: Shaghayegh.aghajanshakeri@gmail.com)

اثر حفاظتی اپی کاتچین بر زنده مانی سلول عصبی PC12 مواجهه شده با داروی والپروئیک اسید

محمد شکرزاده¹
عباس محمدپور²
زهره تاجیک³
مریم علیزاده⁴
شقایق آقاجان شاکری⁵

چکیده

سابقه و هدف: به خوبی ثابت شده است که داروی ضد تشنج والپروئیک اسید با ایجاد استرس اکسیداتیو در انسان و در تمام گونه‌های حیوانی مورد آزمایش، تراتوژنیک است. در این مطالعه، با توجه به ترکیب شیمیایی کاتچین‌ها، اثر محافظتی آن بر زنده مانی سلول‌های عصبی PC12 مواجهه شده با داروی والپروئیک اسید بررسی شد.

مواد و روش‌ها: اثرات محافظتی اپی کاتچین (دوز 10-50-100-500-1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر سمیت ناشی از داروی والپروئیک اسید بر بقا و زنده مانی سلول عصبی PC12 توسط تست MTT و تست‌های استرس اکسیداتیو شامل (ارزیابی میزان ROS، SOD، GPx و پراکسیداسیون لیپیدی) بررسی شد. تمامی داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه one-way ANOVA و تست Tukey توسط GraphPad Prism 8 تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: با توجه به نتایج، اپی کاتچین اثرات سیتوتوکسیک اسید والپروئیک را در غلظت‌های 500 و 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش داد ($P < 0/0001$). اپی کاتچین به طور معنی‌داری استرس اکسیداتیو ناشی از والپروئیک اسید را از طریق کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و مالون دی آلدهید (MDA) اعمال کرده است ($P < 0/0001$ و $P < 0/001$).

استنتاج: مطالعه حاضر نشان داد که مصرف اپی کاتچین می‌تواند پتانسیل آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد. هم‌چنین، EC محافظت سلولی قابل توجهی را در برابر سمیت اسید والپروئیک در سلول‌های PC12 نشان داد.

واژه‌های کلیدی: استرس اکسیداتیو، اپی کاتچین، والپروئیک اسید، PC12

مقدمه

سدیم والپروات، یک داروی وسیع‌الطیف است و به عنوان یکی از داروهای رایج ضد تشنج مورد استفاده قرار می‌گیرد (1). والپروئیک اسید (VPA) یک زنجیره کوتاه از اسید چرب می‌باشد تا مدت‌های طولانی تصور بر

این بود که مکانیسم عمل این دارو در ارتباط با مسیرهای انتقال دهنده‌های عصبی می‌باشد، اما شواهدی وجود دارد که نشان‌دهنده اثر این دارو بر روی رشد، تمایز و آپوپتوزیس سلول‌ها می‌باشد (2). اسید والپروئیک در

E-mail: Shaghayegh.aghajanshakeri@gmail.com

مؤلف مسئول: شقایق آقاجان شاکری - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی

1. استاد، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. استادیار، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه غیر انتفاعی سنا، ساری، ایران

3. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی ژنتیک، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه غیر انتفاعی سنا، ساری، ایران

4. کارشناسی ارشد شیمی کاربردی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

5. دکترای تخصصی سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1401/6/13 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/7/17 تاریخ تصویب: 1402/12/22

مدل‌های حیوانی باعث رشد زواید عصبی، بازآرایی آکسونی و نورون‌زایی در هیپوکامپ می‌شود (3). فرمولاسیون‌های متعدد این دارو، قابلیت جذب خوبی دارد و به پروتئین‌های پلاسما به میزان بالایی باند می‌شود. نیمه عمر آن بین 9-18 ساعت است و متابولیزه شدن آن در بدن وسیع می‌باشد. سدیم والپروات همانند سایر داروهای ضد تشنج، دارای عوارض دارویی است که این عوارض شامل عوارض گذرا و غیر خطرناک نظیر افزایش وزن، خواب‌آلودگی گذرا، ریزش مو، لرزش در حین فعالیت و استراحت، ترومبوسیتوپنی برگشت‌پذیر و افزایش متوسط تا حدود 3 برابری گاماگلوتامیل ترانسفراز و عوارض خطرناکی مانند هپاتوتوکسیسیته، انسفالوپاتی، اختلالات انعقادی، پانکراتیت و سرکوب مغز استخوان می‌باشد (4). اثرات جانبی ناشی از مصرف دارو، یکی از علت‌های مهم جمع‌آوری دارو از بازار می‌باشد. از این جهت شناسایی اثرات جانبی دارو و مکانیسم‌های درگیر در آن اهمیت به‌سزایی دارد (5). صرع و داروهای ضد صرع در تشکیل رادیکال‌های آزاد نقش دارند، بنابراین می‌توانند منجر به استرس اکسیداتیو شوند (6). سیستم عصبی به دلیل فراوانی بالای اسیدهای چرب غیراشباع در برابر استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیر و مستعد تشکیل لیپید پراکسیداسیون می‌باشد. بنابراین افزایش رادیکال‌های آزاد می‌تواند باعث تخریب نورون‌ها شود (7). امروزه شناخت، مدیریت و مهار سمیت عصبی مرتبط با دارو، به مسئله‌ای مهمی در انتخاب درمان تبدیل شده است. ترکیبات طبیعی مانند پلی‌فنل‌ها برای جلوگیری و درمان سمیت عصبی وابسته به دارو به کار می‌روند (8). مهم‌ترین فلاونوئید در چای فلاونول یا همان کاتچین‌ها (کتچین‌ها) می‌باشند (9). کاتچین‌ها دارای اثر آنتی‌اکسیدانی و مفیدی در بدن می‌باشند و در چای سبز شش کاتچین موجود می‌باشد (10). اپی‌گالوکاتچین گالات، مهم‌ترین ترکیب پلی‌فنولی برگ چای سبز است که از جمله مهم‌ترین گروه از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است (11). اپی‌گالوکاتچین گالات مهم‌ترین ترکیب پلی‌فنولی

برگ چای سبز است که از جمله مهم‌ترین گروه از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است و بسیار از خواص آنتی‌اکسیدانی چای سبز به آن نسبت داده می‌شود (12). هم‌چنین اثرات ضد التهاب و محافظت‌کننده عصبی دارد (13). کاتچین‌ها فلاونوئیدهای پلی‌فنولی مشتق شده از کاتچو هستند. چای سبز، یکی از پر مصرف‌ترین نوشیدنی‌ها در سراسر جهان که از جوانه‌ها و برگ‌های گیاه *Camellia sinensis* به‌دست می‌آید، منبع شناخته شده‌ای است. علاوه بر این، کاتچین‌ها در انواع غذاها و گیاهان از جمله شراب، سیب، خرمالو، کاکائو، انگور، انواع توت‌ها و محصولات مبتنی بر کاکائو یافت می‌شوند. با توجه به گروه‌های هیدروکسیل متعدد، کاتچین‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و شلاته‌کننده فلزی قوی هستند که در مطالعات آزمایشگاهی و بالینی تأیید شده‌اند (14). برخی از کارها بر روی استفاده از کاتچین در اختلالات نورودژنراتیو متمرکز شده‌اند، به عنوان مثال، بیماری آلزایمر و بیماری پارکینسون از این دسته‌اند (15). استرس اکسیداتیو با فعال کردن آبشارهای سیگنالینگ درون سلولی که در آپوپتوز، خودایمی خارج سلولی نقش دارند، نقش اصلی را در انعطاط نورون‌ها ایفا می‌کند (16). کاتچین به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با کاهش استرس اکسیداتیو، حذف ROS و بهبود آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آسیب عصبی را کاهش می‌دهد (17). آسیب اکسیداتیو به مولکول‌های حیاتی در نهایت منجر به بروز بیماری‌های مزمن از قبیل بیماری‌های قلبی، سرطان، دیابت، آلزایمر، پارکینسون، آرتریت و ناباروری می‌شود. استرس اکسیداتیو زمانی ایجاد می‌شود که عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و توانایی بدن برای سم‌زدایی آثار مخرب آن‌ها توسط آنتی‌اکسیدان‌ها وجود دارد (18). سلول‌های PC12 به عنوان مدلی مناسب برای مطالعه اثرات تمایزی فاکتورهای متعدد به کار می‌روند و به‌طور گسترده در سلول درمانی برای بیماری‌های عصبی مانند پارکینسون و آلزایمر مورد استفاده قرار می‌گیرند (19). رده سلولی PC12 به عنوان یکی از انواع

سلول‌های چندتوانه به عنوان یک مدل بسیار مناسب برای مطالعات نوروبیولوژیک و نوروشیمیایی در طی سال‌های اخیر، مورد استفاده قرار گرفته است (20). از آنجایی که تاکنون اثرات حفاظتی اپی کاتچین بر زنده مانی سلول عصبی PC12 بررسی نشده، بنابراین در این مطالعه اثر حفاظتی اپی کاتچین بر زنده مانی سلول‌های عصبی PC12 مواجه شده با داروی والپروئیک اسید مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

عصاره گیری کاتچین

برای استخراج عصاره از روش Arakawa و Bakhshi استفاده شد به این ترتیب که به 0/5 گرم از پودر نمونه خشک شده چای به 3 میلی‌لیتر حلال استخراج شامل متانول و استیک اسید به نسبت (85 به 15) اضافه شد و به مدت 24 ساعت در یخچال نگهداری شد پس از آن، لوله‌های آزمایش حاوی نمونه، در سانتریفیوژ مدل (14-1، شرکت Sigma، آلمان) قرار گرفتند و به مدت 10 دقیقه با سرعت 1000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند محلول رویی شناور که حاوی عصاره گیاه بود برای اندازه گیری میزان فنل، فلاونول، فلاونوئید، آنتوسیانین و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل با دقت توسط سمپلر جدا و در میکروتیوب ریخته شد (21).

تعیین مقدار کاتچین کل یا فلاونول

میزان فلاونول کل براساس رنگ سنجی کلرید آلومینیوم و بر حسب روتین اندازه گیری شد. برای این منظور، به 1 میلی‌لیتر از عصاره، 2 میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم 2 درصد، 6 میلی‌لیتر استات سدیم 5 درصد و 1 میلی‌لیتر حلال استخراج اضافه شد سپس، میزان جذب نمونه‌ها پس از 2/5 ساعت قرار گرفتن در دمای اتاق در طول موج 445 نانومتر خوانده شد برای رسم نمودار استاندارد از روتین استفاده شد (22).

تعیین مقدار فنل کل

برای سنجش میزان فنل کل، معرف فولین دنیز-سیکالتو و استاندارد گالیک اسید استفاده شد و نتایج به صورت میلی گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک بیان شد به این ترتیب که به 125 میکرولیتر از عصاره، 375 میکرولیتر آب مقطر، 2/5 میلی لیتر فولین 10 درصد و پس از 6 دقیقه 2 میلی لیتر محلول کربنات سدیم 7/5 درصد در تاریکی اضافه شد. پس از 1/5 ساعت قرار گرفتن در تاریکی جذب نمونه‌ها در طول موج 763 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV-Visible (مدل 3000 Ultrospec شرکت CamSpec، چین) خوانده شد (23).

تهیه داروی والپروئیک اسید

داروی والپروئیک اسید با خلوص بالا از شرکت سیگما آلد ریچ خریداری شد.

کشت سلول

رده سلولی عصبی PC12، رده‌ای مشتق شده از فئوکروموسیتوم مدولای فوق کلیوی رت دارای منشأ جنینی و تاج عصبی (مخلوطی از سلول‌های نوروبلاستیک و سلول‌های ائوزینوفیلیک) می‌باشد. رده سلولی ذکر شده در مطالعه حاضر، از بانک سلولی ذخایر ملی ژنتیک تهیه شد و استفاده گردید. سلول‌های PC12 در DMEM/High Glc سرم جنین به همراه استریتومايسين در انکوباتور در دمای 37/5 درجه سانتی گراد، 5 درصد CO₂ و رطوبت کافی نگهداری شدند و هر دو الی سه روز یک بار میزان رشد و عدم آلودگی در زیر میکروسکوپ بررسی گردید. زمانی که سلول‌ها به 70 درصد رشد خود رسیدند، سلول‌ها توسط تریپسین (EDTA) از ته فلاسک جدا و با دور 1500 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ انجام شد و رسوب سلولی (پلت) ایجاد شده را به حالت سوسپانسیون تهیه و درصد زنده ماندن سلول‌ها از رنگ تریان بلو و لام همو سایتومتر توسط میکروسکوپ نوری استفاده شد (23).

ارزیابی سمیت سلولی تست MTT

بررسی زنده بودن سلول‌ها توسط تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. روش MTT یک روش کمی اسپکتروفتومتری است که طی آن نمک تترازولیوم که محلول در آب است و زمانی که در محیط کشت فاقد فنول رد یا بافر PBS آماده‌سازی می‌شود، محلول زردرنگی ایجاد می‌کند، توسط آنزیم دهیدروژناز میتوکندری سلول‌های فعال احیا شده و به کریستال‌های نامحلول و ارغوانی رنگ فورمازان تبدیل می‌شوند. جذب نوری این کریستال‌ها پس از حل شدن در حلال DMSO توسط دستگاه الایزا ریدر قابل اندازه‌گیری است. هرچه میزان زنده بودن سلول‌ها پس از تیمار بیش‌تر باشد میزان جذب نوری که با دستگاه خوانده می‌شود بیش‌تر است، زیرا میزان رنگ ایجاد شده توسط سلول‌های زنده بیش‌تر است. 24 ساعت پس از کشت سلول‌های عصبی PC12، اپی‌کاتچین در غلظت‌های (10-50-100-500-1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پس از گذشت 24 ساعت دیگر، داروی والپروئیک اسید در غلظت IC_{50} به سلول‌ها اضافه شدند. تست MTT 24 ساعت پس از مجموع افزودن اپی‌کاتچین و والپروئیک اسید (Pre-treatment) صورت گرفت. جهت انجام تست MTT، به میزان 0/45 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در هر چاهک به عنوان رفرنس در محلول PBS رقیق شد و سپس با فیلتر استریل شد، 10 میکرولیتر از نمک MTT به تمامی چاهک‌ها اضافه شد و در انکوباتور CO_2 دار قرار داده شدند. پس از گذشت 4 ساعت، پلیت‌ها از انکوباتور خارج شد، محیط حاوی MTT نیز خارج شد و به هر خانه مقدار 150 میکرولیتر DMSO اضافه شد. بعد از گذشت حدود 10 دقیقه میزان جذب کریستال‌های تشکیل شده توسط دستگاه Elisa Reader در طول موج 570 نانومتر خوانده شد (24).

اندازه‌گیری میزان ROS

اندازه‌گیری ROS با فلوریمتری و با استفاده از معرف DCFH-DA انجام شد. 20 میکرولیتر DCFH-DA

به 2000 میکرولیتر از نمونه سلولی اضافه شد و در 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه نگهداری شد. سپس جذب در طول موج تحریکی 312 نانومتر و نشری 420 نانومتر توسط دستگاه فلوریمتری اندازه‌گیری شد (25).

اندازه‌گیری میزان گلوتاتیون (GSH)

این روش براساس تشکیل رنگ زرد در هنگام واکنش 5,50-dithiobis-2-Nitrobenzoic acid (DTNB) به‌عنوان شاخص با ترکیبات حاوی گروه‌های سولفیدریل است. به‌طور خلاصه، محتویات سلولی درون میکروتیوب‌ها را، از طریق سانتریفیوژ با TCA پروتونه می‌کنیم. پس از انکوباسیون، مایع رویی برای سنجش سطح GSH آنالیز می‌شود. سپس، 2/3 میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (0/2 مولار، 7/6 PH) را به 0/2 میلی‌لیتر از مایع رویی سلولی و سپس، 0/5 میلی‌لیتر DTNB (0/001 مولار) را اضافه می‌کنیم. جذب محصولات (رنگ زرد ایجاد شده) پس از 5 دقیقه در طول موج 412 نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد (26).

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی (LPO)

0/25 میلی‌لیتر اسیدفسفریک (0/05 مولار) را به 0/2 میلی‌لیتر از نمونه با افزودن 0/3 میلی‌لیتر TBA 0/2 درصد اضافه کردیم. تمامی نمونه‌ها را به مدت 30 دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. در پایان، لوله‌ها به حمام یخ منتقل شد و 0/4 میلی‌لیتر n-بوتانول به هر لوله اضافه شد. سپس با سرعت 3500 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شدند. مقدار MDA تشکیل شده در هر یک از نمونه‌ها، از طریق اندازه‌گیری جذب مایع رویی در طول موج 532 نانومتر با دستگاه الایزایدر ارزیابی شد. محتوای MDA به‌صورت $\mu\text{mol/mg protein}$ بیان شد (27).

اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

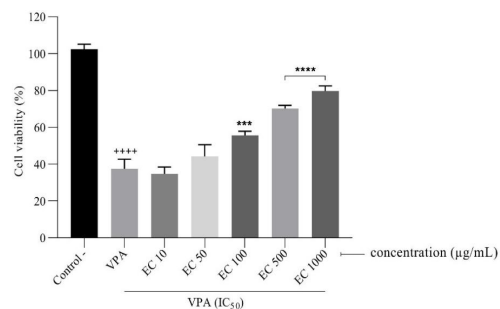
با استفاده از SOD assay kit شرکت نوند سلامت انجام شد (28).

روش محاسبه IC_{50}

درصد سلول‌های زنده مانده از هر یک از رده‌های سلولی عصبی PC12 پس از مواجهه با والپروئیک اسید به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. زیرا یک ترکیب سایتوتوکسیک می‌باشد. بعد از انجام تست MTT با استفاده از نرم‌افزار Prism Ver. 8 محاسبه شد. $P < 0/05$ به عنوان مبنای معنی‌داری در نظر گرفته شد.

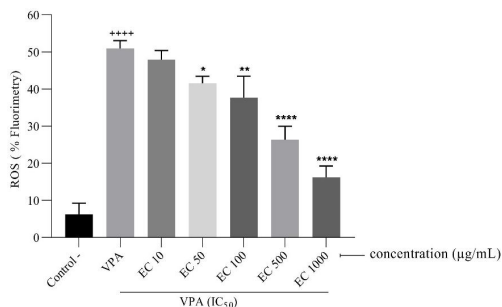
یافته‌ها

اثر حفاظتی اپی کاتچین بر زنده ماندن سلول عصبی PC12
مواجهه شده با داروی والپروئیک اسید (VPA) در تست MTT همان‌طور که در نمودار شماره 1 نشان داده شده است، سلول‌های عصبی PC12 مواجهه شده با VPA در غلظت IC_{50} باعث کاهش رشد شده است. با تیمار سلول‌های PC12 با اپی کاتچین در غلظت‌های از پیش تعیین شده، باعث مهار سمیت VPA و افزایش رشد سلول‌های نرمال شده است به طوری که این تأثیر وابسته به دوز بوده است. در مقایسه آماری با گروه کنترل مثبت مشخص شد که، غلظت 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت‌های 500 و 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای اختلاف معنی‌داری بودند که به ترتیب $P < 0/001$ و $P < 0/0001$ می‌باشد.



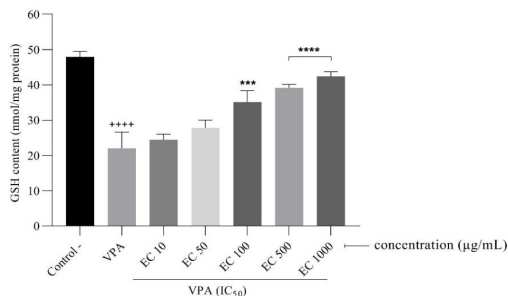
نمودار شماره 1: اثرات محافظتی اپی کاتچین (EC) در غلظت‌های مختلف (10-50-100-500-1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همراه والپروئیک اسید (VPA) در غلظت IC_{50} بر رشد سلول‌های عصبی PC12
*** $P < 0/001$ EC (100 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
**** $P < 0/0001$ EC (500 and 1000 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
**** $P < 0/0001$ VPA (IC_{50}) vs. Negative control group;

اثر حفاظتی اپی کاتچین به همراه داروی والپروئیک اسید (VPA) بر سلول‌های PC12 با بررسی پارامتر ROS در نمودار شماره 2 نشان داده شده است که VPA در غلظت IC_{50} باعث افزایش میزان ROS در سلول‌های عصبی شده است. از طرفی دیگر در تیمار سلول‌ها در غلظت‌های تعیین شده اپی کاتچین به همراه داروی والپروئیک اسید میزان ROS به طور معناداری کاهش پیدا کرده است. از نظر مقایسه آماری در غلظت‌های 500 و 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر اپی کاتچین به همراه والپروئیک اسید تفاوت معنی‌داری با گروه والپروئیک اسید به تنهایی $P < 0/0001$ نشان داده است.



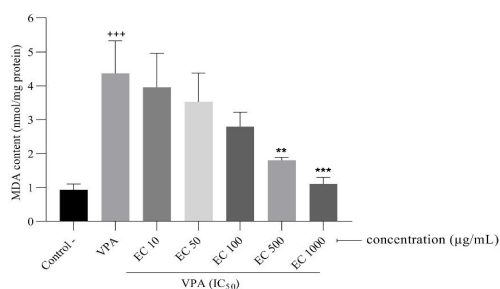
نمودار شماره 2: اثرات محافظتی اپی کاتچین (EC) در غلظت‌های مختلف (10-50-100-500-1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همراه والپروئیک اسید (VPA) در غلظت IC_{50} بر میزان استرس اکسیداتیو در سلول‌های عصبی PC12
* $P < 0/05$ EC (50 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
** $P < 0/01$ EC (100 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
*** $P < 0/0001$ EC (500 and 1000 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
**** $P < 0/0001$ VPA (IC_{50}) vs. Negative control group;

اثر حفاظتی اپی کاتچین به همراه داروی والپروئیک اسید (VPA) بر ذخایر آنتی‌اکسیدانی GSH بر سلول‌های PC12
در نمودار شماره 3 نشان داده شده است بررسی محتوای گلو تاتیون در غلظت 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت‌های 500 و 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر اپی کاتچین به همراه والپروئیک اسید دارای اختلاف معنی‌داری با گروه VPA بودند که به ترتیب $P < 0/001$ و $P < 0/0001$ می‌باشد و در غلظت‌های 10 و 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر به همراه والپروئیک اسید تفاوت معنی‌داری



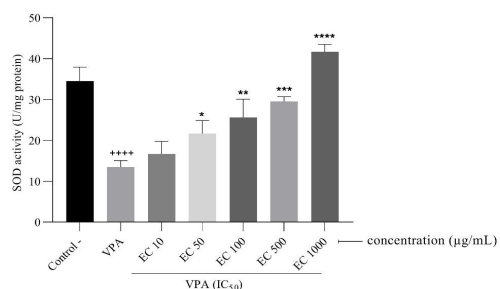
نمودار شماره 3: اثرات محافظتی اپی کاتچین (EC) در غلظت‌های مختلف (10-50-100-500-1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همراه والپروئیک اسید (VPA) در غلظت IC_{50} بر میزان گلو تاتیون (GSH) در سلول‌های عصبی PC12

*** $P < 0.001$ EC (100 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
 **** $P < 0.0001$ EC (500 and 1000 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
 **** $P < 0.0001$ VPA (IC_{50}) vs. Negative control group;



نمودار شماره 4: اثرات محافظتی اپی کاتچین (EC) در غلظت‌های مختلف (10-50-100-500-1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همراه والپروئیک اسید (VPA) در غلظت IC_{50} بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) در سلول‌های عصبی PC12

** $P < 0.01$ EC (500 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
 *** $P < 0.001$ EC (1000 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
 *** $P < 0.001$ VPA (IC_{50}) vs. Negative control group;



نمودار شماره 5: اثرات محافظتی اپی کاتچین (EC) در غلظت‌های مختلف (10-50-100-500-1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همراه والپروئیک اسید (VPA) در غلظت IC_{50} بر میزان سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در سلول‌های عصبی PC12

* $P < 0.05$ EC (50 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
 ** $P < 0.01$ EC (100 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
 *** $P < 0.001$ EC (500 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
 **** $P < 0.0001$ EC (1000 µg/mL) + VPA (IC_{50}) vs. VPA group;
 **** $P < 0.0001$ VPA (IC_{50}) vs. Negative control group;

با گروه VPA به تنهایی دیده نشده است. هرچه غلظت اپی کاتچین بالاتر می‌رود، سطح GSH افزایش پیدا کرده که نشان‌دهنده اثر محافظتی اپی کاتچین بر سمیت والپروئیک اسید بر سلول‌های عصبی PC12 می‌باشد.

اثر محافظتی اپی کاتچین به همراه داروی والپروئیک اسید (VPA) بر پراکسیداسیون لیپیدی MDA بر سلول‌های PC12: در نمودار شماره 4 در تست LPO از نظر مقایسه فاکتور کنترل‌کننده تست مالون دی‌الدهید محتویات MDA در غلظت 500 و 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر اپی کاتچین به همراه والپروئیک اسید به ترتیب تفاوت معنی‌داری $P < 0/001$ ، $P < 0/01$ با گروه VPA به تنهایی دیده شده است. در غلظت‌های 10 و 50 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر به همراه والپروئیک اسید تفاوت معنی‌داری دیده نشده است. با افزایش غلظت اپی کاتچین، میزان پراکسیداسیون لیپیدی کاهش پیدا کرده و اثر محافظتی اپی کاتچین بر سمیت والپروئیک اسید بر سلول‌های عصبی PC12 افزایش می‌یابد.

اثرات اپی کاتچین به همراه داروی والپروئیک اسید (VPA) بر میزان سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بر سلول‌های PC12: در نمودار شماره 5 نشان داده شده است در غلظت‌های 500 و 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر اپی کاتچین به همراه داروی والپروئیک اسید دارای اختلاف معنی‌داری با گروه VPA بودند $P < 0/001$ و $P < 0/0001$. در غلظت‌های 100 و 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر اپی کاتچین به همراه والپروئیک اسید تفاوت معنی‌داری در افزایش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به ترتیب، $P < 0/01$ و $P < 0/05$ دیده شده است. در غلظت 10 میکروگرم بر میلی‌لیتر اپی کاتچین تفاوت معنی‌داری دیده نشده است. هرچه غلظت اپی کاتچین بالاتر می‌رود، سطح SOD افزایش می‌یابد که اثر محافظتی اپی کاتچین بر سمیت والپروئیک اسید بر سلول‌های عصبی PC12 افزایش می‌یابد.

بحث

هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات سایتوپروتکتیو و آنتی اکسیدانی اپی کاتچین بر سلول‌های مدل PC12 مواجهه شده با داروی والپروئیک اسید بود. در این مطالعه، سلول‌های عصبی PC12 در غلظت IC_{50} به همراه اپی کاتچین در غلظت‌های مختلف (10-50-100-500-1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر) تربیت شدند. میزان سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو بر روی این رده‌ی سلولی عصبی مورد بررسی قرار گرفت. طبق اطلاعات به دست آمده از نمودارها، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های در معرض والپروئیک اسید و گروه کنترل منفی مشاهده شد؛ که این امر در مطالعه‌ی ما، سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو در سلول‌های عصبی PC12 را در مواجهه با دوز IC_{50} والپروئیک اسید نشان می‌دهد.

مطالعات نقش استرس اکسیداتیو را در ارتباط با برخی بیماری‌ها مثل دیابت، سرطان، مالاریا، سندرم خستگی مزمن، آرتروز روماتوئید و بیماری‌های نورودژنراتیو مثل پارکینسون و آلزایمر نشان می‌دهد. مطالعات صورت گرفته با سنجش بیومارکرهایی مثل ROS، NOS و دفاع آنتی اکسیدانی نشان می‌دهد که آسیب اکسیداتیو ممکن است در پاتوژنز این بیماری‌ها نقش داشته باشد (29). داروی ضد تشنج والپروات سدیم که برای درمان انواع مختلف صرع استفاده می‌شود، در انسان و حیوانات دارای اثرات تراتوژنیک شامل نقایص لوله‌ی عصبی و ناهنجاری‌های مادرزادی می‌باشد (29). مواد و داروهایی با آسیب به غشاهای سلولی نظیر جفت و سلول‌های در حال تمایز و تکثیر جنین، می‌توانند با ایجاد عدم تعادل بین دفاع آنتی اکسیدانی همانند آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و منابعی مثل گلوکاتایون و استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد، موجب ناهنجاری‌های جنینی مانند ناهنجاری‌های اسکلتی شوند. یکی از مکانیسم‌های تراتوژنی والپروئیک اسید، ایجاد رادیکال‌های آزاد و افزایش استرس اکسیداتیو می‌باشد (30). در مطالعه حاضر میزان سمیت والپروئیک اسید بر حیات

رده‌های سلولی کاهش معنی‌داری در روند رشد سلول‌ها داشت، سلول‌های عصبی PC12 در مواجهه با والپروئیک اسید رشدشان کاهش یافت که این بیانگر سمیت سلولی والپروئیک اسید است. مانند بیماری‌های نورودژنراتیو با از دست دادن پیش رونده تجمع سلول‌های عصبی ویژه توام با تجمع پروتئین‌ها می‌باشد. یک شکل شایع این بیماری‌ها آسیب اکسیداتیو نورون‌هاست که ممکن است مسئول اختلال عملکرد سلول عصبی یا مرگ سلول عصبی باشد که در پاتوژنز این بیماری‌ها نقش دارد (31). در مطالعه دیگر Renno و همکاران نشان دادند که ترکیب پلی فنول اپی گالوکاتچین گالات جای سبز با خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی خود می‌تواند در بهبود آسیب عصب سیاتیک موش‌های صحرایی مؤثر باشد. آنان نشان دادند که تجویز اپی گالوکاتچین گالات به حیوانات باعث افزایش ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم می‌شود. علاوه بر این میزان فاکتور التهابی اینترلوکین-6 سرمی نیز در حیوانات تیمار شده با اپی گالوکاتچین گالات کاهش یافته بود (32). در این رابطه He و همکاران در مطالعه‌ای در سال 2017 نشان دادند که پلی فنول اپی گالوکاتچین گالات جای سبز می‌تواند از نورون‌های کورتکس مغز موش‌های صحرایی در مقابل اثرات سمی آکریل آمید محافظت کند. آنان نشان دادند که تجویز اپی گالوکاتچین گالات باعث کاهش استرس اکسیداتیو و همچنین کاهش آپوپتوز در نورون‌های کورتکس موش‌های صحرایی تیمار شده با آکریل آمید می‌شود (33). مطالعات نشان می‌دهند استفاده از آنتی اکسیدان بر روی موش‌های ترانس ژنیک موجب کاهش استرس اکسیداتیو و سطح الیگومر بتا آمیلوئید در مغز موش‌های مورد مطالعه می‌شود. بنابراین مطالعه اخیر نشان می‌دهد که نقش استرس اکسیداتیو و واکنش‌های التهابی در پیشرفت بیماری و اختلال حافظه‌ی مربوط به آن بسیار مهم است (34). مطالعه دیگری که توسط Hritcu و همکارانش بر روی مدل بیماری آلزایمر انجام گرفت، نشان داد که در مقایسه با موش‌های صحرایی کنترل، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

آماري معنی داری $P < 0/05$ به شکل وابسته به دوز مشاهده شد و منجر به کاهش سمیت سلولی والپروئیک اسید شد و حیات سلول های عصبی PC12 را افزایش داد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد والپروئیک اسید در دوز IC_{50} خود باعث ایجاد سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو در سلول های عصبی PC12 می شود و اپی کاتچین به عنوان یک آنتی اکسیدان، با تقویت دفاع آنتی اکسیدانی (افزایش سطوح گلو تاتیون و سوپر اکسید دیسموتاز) و مهار رادیکال های آزاد، سمیت سلولی و استرس اکسیداتیو ناشی از والپروئیک اسید در سلول های عصبی PC12 را کاهش می دهد. یافته های مطالعه حاضر نشان داد مصرف منابع اپی کاتچین، می تواند منجر به افزایش فعالیت و توان آنتی اکسیدانی شود و در پی آن باعث حفاظت سلول از آسیب ناشی از والپروئیک اسید در سلول های عصبی PC12 می شود. با درمان آنتی اکسیدانی مثل اپی کاتچین این امکان وجود دارد که بتوانیم شرایط اکسیداتیو را تنظیم نموده و بیماری ها را پیشگیری یا درمان نماییم.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر دارای تاییدیه کمیته اخلاق معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران (کد اخلاق: IR.MAZUMS.RIB.REC.1400.033) می باشد.

سوپراکسید دیسموتاز، گلو تاتیون پراکسیداز و کاتالاز و سطح گلو تاتیون احیاء کاهش و میزان MDA افزایش یافته است (35). در طول سه دهه گذشته، جای سبز به خاطر مزایای سلامتی، به ویژه اثرات ضدسرطانی آن بسیار مورد توجه بوده است. پلی فنول اپی گالوکاتچین گالات موجود در جای سبز از اجزای اصلی فعال بیولوژیکی محسوب می شود که احتمالاً در تولید آنزیم های مورد نیاز برای رشد سلول های سرطانی نقش ایفا می کند. علاوه بر این با سرکوب تشکیل عروق خونی در کنترل رشد تومورها موثر است (36). از این رو مطالعات انجام شده هم راستا با مطالعه حاضر می باشد. در این مطالعه نیز اپی کاتچین به عنوان ماده محافظتی و آنتی اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، با وجود این که هنوز در مورد نقش مؤثر استرس اکسیداتیو در برخی از بیماری های عصبی بحث وجود دارد، اما می توان در کنار انجام مطالعات بیش تر در مورد نقش استرس اکسیداتیو در بیماری های این بیماری ها، از درمان های آنتی اکسیدانی مانند اپی کاتچین به عنوان تعدیل کننده در این بیماری ها استفاده نمود. یافته های مطالعه حاضر نشان داد که اضافه کردن اپی کاتچین به رده سلول های عصبی PC12 دریافت کننده والپروئیک اسید، به ترتیب بیش ترین تعداد سلول های زنده در دوزهای بالا (500 و 1000 میکروگرم بر میلی لیتر) مشاهده شد و در دوزهای متوسط (50 و 100 میکروگرم بر میلی لیتر) اختلاف

References

1. Liampas I, Siokas V, Brotis A, Zintzaras E, Stefanidis I, Dardiotis E. Intravenous sodium valproate in status epilepticus: review and Meta-analysis. *Int J Neurosci* 2021; 131(1): 70-84.
2. Singh D, Gupta S, Verma I, Morsy MA, Nair AB, Ahmed A-SF. Hidden pharmacological activities of valproic acid: A new insight. *Biomed Pharmacother* 2021; 142: 112021.
3. Aranarochana A, Sirichoat A, Pannangrong W, Wigmore P, Welbat JU. Melatonin ameliorates valproic acid-induced neurogenesis impairment: the role of oxidative stress in adult rats. *Oxid Med Cell Longev* 2021; 2021: 9997582.
4. Sina F, Vafaei Shahi M, Soheilipour F, Mohagheghi P, Riahi A, Borqei N, et al. Study the effect of sodium valproate on

- weight, body mass index, uric acid, vitamin D3, blood insulin and serum lipid profile in children. *RJMS* 2021; 28(5): 49-59 (Persian).
5. Onakpoya IJ, Heneghan CJ, Aronson JK. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. *BMC Med* 2016; 14(1): 1-11.
 6. Martinc B, Grabnar I, Vovk T. Antioxidants as a preventive treatment for epileptic process: a review of the current status *Curr Neuropharmacol* 2014; 12(6): 527-550.
 7. Das A, Sarwar MS, Hossain MS, Karmakar P, Islam MS, Hussain ME, et al. Elevated serum lipid peroxidation and reduced vitamin C and trace element concentrations are correlated with epilepsy. *Clin EEG Neurosci* 2019; 50(1): 63-72.
 8. Haratizadeh S, Nazm Bojnordi M, Ebrahimizadeh MH, Ahmadi Moghaddam K, Goodarzi G, Ghasemi Hamidabadi H. Evaluation proliferative effect of nettle leaf extract on neural stem cell in oxidative stress condition. *Journal of Cell & Tissue* 2018; 9(4): 333-343.
 9. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci* 2016; 8: 33-42.
 10. Narmada IB, Sarasati A, Wicaksono S, Rezkita F, Wibawa KGP, Hayaza S. Phytochemical screening, antioxidant activity, functional groups and chemical element characterization analysis of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in East Javanese Green Tea methanolic extract: an experimental in vitro study. *Sys Rev Pharm* 2020; 11(5): 511-519.
 11. Zhang Y, Lin H, Liu C, Huang J, Liu Z. A review for physiological activities of EGCG and the role in improving fertility in humans/ mammals. *Biomed Pharmacother* 2020; 127: 110186.
 12. Tang G, Xu Y, Zhang C, Wang N, Li H, Feng Y. Green tea and epigallocatechin gallate (EGCG) for the management of nonalcoholic fatty liver diseases (NAFLD): Insights into the role of oxidative stress and antioxidant mechanism. *Antioxidants* 2021; 10(7): 1076.
 13. Truong V-L, Jeong W-S. Antioxidant and anti-inflammatory roles of tea polyphenols in inflammatory bowel diseases. *Food Sci Hum Wellness* 2022; 11(3): 502-511.
 14. Bernatoniene J, Kopustinskiene DM. The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. *Molecules* 2018; 23(4): 965.
 15. Ide K, Matsuoka N, Yamada H, Furushima D, Kawakami K. Effects of tea catechins on Alzheimer's disease: Recent updates and perspectives. *Molecules* 2018; 23(9): 2357.
 16. Suryavanshi SV, Kulkarni YA. NF- κ B: a potential target in the management of vascular complications of diabetes. *Front Pharmacol* 2017; 8: 798.
 17. He J, Xu L, Yang L, Wang X. Epigallocatechin gallate is the most effective catechin against antioxidant stress via hydrogen peroxide and radical scavenging activity. *Med Sci Monit* 2018; 24: 8198-8206.
 18. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2021; 20(9): 689-709.
 19. Delavar MR, Baghi M, Safaeinejad Z, Kiani-Esfahani A, Ghaedi K, Nasr-Esfahani MH. Differential expression of miR-34a, miR-141, and miR-9 in MPP+-treated differentiated PC12 cells as a model of Parkinson's disease. *Gene* 2018; 662: 54-65.
 20. Zhang J, An S, Hu W, Teng M, Wang X, Qu Y, et al. The neuroprotective properties of

- Heridium erinaceus in glutamate-damaged differentiated PC12 cells and an Alzheimer's disease mouse model. *Int J Mol Sci* 2016; 17(11): 1810.
21. Ghorbani E, Bakhshi D, Ghasemnezhad M, Arakawa O, Hajnajari H, Papachatzis A, editors. Evaluation of phenolic compounds and antioxidant activity of some native and imported apple cultivars in Iran. *ISHS Acta Horticulturae* 981: II Balkan Symposium on Fruit Growing. 2011.
 22. Miliauskas G, Venskutonis P, Van Beek T. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 2004; 85(2): 231-237.
 23. Arab-Nozari M, Mohammadi E, Shokrzadeh M, Ahangar N, Amiri FT, Shaki F. Co-exposure to non-toxic levels of cadmium and fluoride induces hepatotoxicity in rats via triggering mitochondrial oxidative damage, apoptosis, and NF-kB pathways. *Environ Sci Pollut Res Int* 2020; 27: 24048-24058.
 24. Kuhestani S, Shokrzadeh M, Aghajanshakeri S, Shokrzadeh S. Protective Effects of Simvastatin on Cytotoxicity and Oxidative Stress in Human Gingival Fibroblasts Cells Exposed to Venlafaxine. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2022; 31(205): 81-88 (Persian).
 25. Shokrzadeh M, Ghassemi-Barghi N. Melatonin loading chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: Application in attenuating etoposide-induced genotoxicity in HepG2 cells. *Pharmacology* 2018; 102(1-2): 74-80.
 26. Dong Y, Hou Q, Lei J, Wolf PG, Ayansola H, Zhang B. Quercetin alleviates intestinal oxidative damage induced by H₂O₂ via modulation of GSH: in vitro screening and in vivo evaluation in a colitis model of mice. *ACS Omega* 2020; 5(14): 8334-8346.
 27. Islam S. In Vitro Antioxidant And Toxicological Evaluation Of Herbal Health Supplements, Claimed As Antioxidant Boosters, From Local Markets Of Lahore, Pakistan. *Pak J Sci* 2021; 73(1): 96.
 28. Azari A, Shokrzadeh M, Zamani E, Amani N, Shaki F. Cerium oxide nanoparticles protects against acrylamide induced toxicity in HepG2 cells through modulation of oxidative stress. *Drug Chem Toxicol* 2019; 42(1): 54-59.
 29. Manthou ME, Meditskou S, Lykartsis C, Sapalidis K, Sorkou K, Emmanouil-Nikoloussi E-N. The role of neuronal apoptosis in Valproic Acid brain-related teratogenesis: A histochemical and immunohistochemical study in BALB/c mice. *Rom J Morphol Embryol* 2020; 61(3): 813.
 30. Lloyd KA. A scientific review: mechanisms of valproate-mediated teratogenesis. *Int J Stud Res* 2013; 6.
 31. Castelli V, Benedetti E, Antonosante A, Catanesi M, Pitari G, Ippoliti R, et al. Neuronal cells rearrangement during aging and neurodegenerative disease: metabolism, oxidative stress and organelles dynamic. *Front Mol Neurosci* 2019; 12: 132.
 32. Renno WM, Benov L, Khan KM. Possible role of antioxidative capacity of (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment in morphological and neurobehavioral recovery after sciatic nerve crush injury. *J Neurosurg Spine* 2017; 27(5): 593-613.
 33. He Y, Tan D, Bai B, Wu Z, Ji S. Epigallocatechin-3-gallate attenuates acrylamide-induced apoptosis and astrogliosis in rat cerebral cortex. *Toxicol Mech Methods* 2017; 27(4): 298-306.
 34. Wang S-w, Yang S-g, Liu W, Zhang Y-x, Xu P-x, Wang T, et al. Alpha-tocopherol quinine ameliorates spatial memory deficits by reducing

- beta-amyloid oligomers, neuroinflammation and oxidative stress in transgenic mice with Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 2016; 296: 109-117.
35. Hritcu L, Stefan M, Brandsch R, Mihasan M. Enhanced behavioral response by decreasing brain oxidative stress to 6-hydroxy-l-nicotine in Alzheimer's disease rat model. *Neurosci Lett* 2015; 591: 41-47.
36. Cheng Z, Zhang Z, Han Y, Wang J, Wang Y, Chen X, et al. A review on anti-cancer effect of green tea catechins. *JFF* 2020; 74: 104172.