

Inhibitory Effects of Resveratrol against Mitochondrial Toxicity Induced by Perfluorooctanoic Acid in Isolated Liver Mitochondria of Male Rats

Maloos Naderi¹,
Mozhdeh Seifi²,
Sholeh Akbari¹,
Fatemeh Shaki^{3,4}

¹ PhD Candidate in Toxicology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 24, 2021 ; Accepted June 25, 2022)

Abstract

Background and purpose: Resveratrol (RSV) is a naturally polyphenolic compound found in grapes and other plant sources. It has potent free radical scavenger and antioxidative properties. The aim of this study was to evaluate the protective effect of resveratrol against Perfluorooctanoic acid (PFOA) induced mitochondrial toxicity in isolated liver mitochondria.

Materials and methods: Mitochondria were isolated from fresh male rat's liver tissues using differential centrifugation technique. Then, the isolated mitochondria were divided into the following groups: control, PFOA (1mM), PFOA plus RSV (50, 100, and 200 μ M), and PFOA plus Vit C (positive control). The effects of PFOA were assessed on a series of mitochondrial parameters including mitochondrial function, reactive oxygen species (ROS) formation, lipid peroxidation (LPO), protein carbonyl, and glutathione (GSH) content. Data were analyzed using GraphPad Prism version 6.

Results: PFOA induced mitochondrial dysfunction in isolated liver mitochondria. Resveratrol markedly alleviated mitochondrial dysfunction-induced by PFOA in isolated liver mitochondria.

Conclusion: Resveratrol showed protective effect against PFOA induced hepatotoxicity which may be attributed to its antioxidant activity. So, it can be considered as an effective supplement against oxidative stress and mitochondrial dysfunction induced by PFOA exposure in isolated liver mitochondria.

Keywords: Resveratrol, Perfluorooctanoic acid, mitochondrial toxicity, oxidative stress

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (211): 1-12 (Persian).

Corresponding Author: Fatemeh Shaki - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
(E-mail: fshaki.tox@gmail.com)

بررسی اثرات مهاری رسوراترول در برابر آسیب میتوکندریایی ناشی از پرفلوئورواکتانویک اسید در میتوکندری های ایزوله شده از بافت کبد موش های صحرایی نر

ملوس نادری¹مژده سیفی²شعله اکبری¹فاطمه شکی^{3,4}

چکیده

سابقه و هدف: رسوراترول یک ترکیب طبیعی پلی فنلی است که در انگور و سایر منابع گیاهی یافت می شود و دارای خواص ضد رادیکال آزاد و آنتی اکسیدانی قوی است. هدف از این مطالعه بررسی اثر حفاظتی رسوراترول در برابر سمیت میتوکندریایی ناشی از پرفلوئورواکتانویک اسید در میتوکندری های جدا شده از کبد بود.

مواد و روش ها: میتوکندری ها با استفاده از روش سانتریفیوژ متعدد از بافت کبد تازه موش های صحرایی نر جدا شدند. سپس، میتوکندری های جدا شده به گروه های زیر تقسیم شدند: کنترل، پرفلوئورواکتانویک اسید (1 میلی مولار)، پرفلوئورواکتانویک اسید به علاوه رسوراترول (50، 100 و 200 میکرومولار) و پرفلوئورواکتانویک اسید به علاوه ویتامین ث (کنترل مثبت). سپس اثرات پرفلوئورواکتانویک اسید بر روی یک سری از پارامترهای میتوکندریایی از جمله فعالیت میتوکندری، تشکیل گونه های فعال اکسیژن، پراکسیداسیون لیپیدی، پروتئین کربونیل و محتوای گلوتاتیون ارزیابی شد. همه داده ها با استفاده از GraphPad Prism نسخه 6 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته ها: پرفلوئورواکتانویک اسید سبب اختلال در عملکرد میتوکندری های ایزوله شده در کبد رت شد. تجویز رسوراترول به طور قابل توجهی اختلال عملکرد میتوکندریایی ناشی از پرفلوئورواکتانویک اسید را در میتوکندری های جدا شده از کبد کاهش داد.

استنتاج: رسوراترول اثر محافظتی در برابر سمیت کبدی ناشی از پرفلوئورواکتانویک اسید نشان داد که ممکن است به فعالیت آنتی اکسیدانی آن نسبت داده شود. بنابراین، می توان آن را به عنوان یک مکمل موثر در برابر استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد میتوکندریایی ناشی از مواجهه پرفلوئورواکتانویک اسید در میتوکندری های جدا شده از کبد در نظر گرفت.

واژه های کلیدی: رسوراترول، پرفلوئورواکتانویک اسید، آسیب میتوکندریایی، استرس اکسیداتیو

مقدمه

پرفلوئورواکتانویک اسید PFOA یکی از اعضای خانواده perfluoroalkyl acid (PFAA) می باشد که به عنوان یک سورفاکتانت قوی به طور گسترده در ساخت روغن، تجهیزات پزشکی، پوشش های کاغذی و نساجی

E-mail: fshaki.tox@gmail.com

مؤلف مسئول: فاطمه شکی - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

1. دانشجوی دکتری تخصصی سم شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. دانشجوی دکتری عمومی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. دانشیار، گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، مؤسسه هموگلوبین پاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1401/1/24 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/2/20 تاریخ تصویب: 1401/4/4

مواد دافع کننده روغن، ائاثیه یا لوازم داخلی، جلا، پولیش، بسته بندی مواد غذایی و فوم های ضد آتش کاربرد دارد. این ماده با توجه به دارا بودن پیوندهای قوی کربن - فلئور در ساختار خود، عملاً غیر تخریب پذیر و بسیار پایدار در محیط زیست می باشد. منابع مواجهه با PFOA شامل مواد غذایی، بسته بندی مواد غذایی، محصولات مصرفی و آب آشامیدنی است (1،2). در مطالعات مختلفی نشان داده شده است که مواجهه شدن با پرفلورواکتانویک اسید می تواند باعث ایجاد هایپراورسمی (3)، بیماری های قلبی عروقی (4)، بیماری مزمن کلیه (5)، بیماری تیروئید (6) و آسیب های کبدی سلولی شود (7). همچنین در مطالعات متعددی اثبات شده است که مواجهه با PFOA با افزایش آسیب سلول های کبدی همراه است. اولین و مهم ترین مکانیسم سمیت PFOA در بافت کبد، استرس اکسیداتیو و سمیت ناشی از رادیکال های آزاد می باشد (1،8). استرس اکسیداتیو در واقع عدم تعادل بین میزان رادیکال های آزاد و آنتی اکسیدان ها می باشد. این اتفاق حاصل افزایش رادیکال های آزاد و عدم تعادل بین تولید و حذف گونه های فعال در بدن در نتیجه کاهش توان سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی می باشد (9). استرس اکسیداتیو نقش مهمی را در ایجاد انواع بیماری های کبدی بازی می کند. رادیکال های آزاد می توانند با حمله به ماکرومولکول های زیستی مانند پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدهای غشایی، آن ها را اکسید کرده و سبب ایجاد سمیت شوند (10). در مطالعه ای نشان داده شد که مواجهه با PFOA با افزایش تولید مالون دی آلدهید، پراکسید هیدروژن به عنوان شاخص های استرس اکسیداتیو و کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز در کبد موش های تحت مواجهه با PFOA همراه بوده است (11).

میتوکندری یکی از مهم ترین اندامک های سلولی می باشد که وظیفه تولید انرژی را برعهده دارد. مطالعات مختلف نشان داده اند که آسیب میتوکندری می تواند باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و فعال کردن مسیرهای آپوپتوز

و در نهایت مرگ سلولی شود (12،13). همچنین نشان داده شده است که مواجهه با PFOA با افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری و اختلال در زنجیره انتقال الکترون همراه است که منجر به افزایش آسیب اکسیداتیو در سلول های کبدی می شود (14). بنابراین شناسایی و بررسی اثرات ترکیباتی که بتوانند از ایجاد استرس اکسیداتیو و آثار سوئی ناشی از آن ممانعت کنند از اهمیت به سزائی برخوردار است. رسوراترول یک ترکیب پلی فنول طبیعی می باشد که در انگور و محصولات آن مانند شراب و سایر منابع گیاهی مانند بادام زمینی یافت می شود (15). این مولکول به صورت یک ترکیب فیتوالکسین پلی فنولی بوده و دارای اثرات آنتی اکسیدانی و جاروب کنندگی رادیکال های آزاد ناشی از فرآیندهای اکسیداتیو، اثرات ضد التهابی، تنظیم کننده سیستم ایمنی و مهار کننده کموتاکسی می باشد (16،17). مطالعات مختلفی به بررسی اثرات آنتی اکسیدانی رسوراترول پرداخته اند. رسوراترول از طریق مهار تجمع پلاکتی و افزایش HDL می تواند به عنوان یک عامل محافظتی قلبی عمل کند (18). نتایج حاصل از یک مطالعه نشان داد که افزایش بیان سوپراکسید دسموتاز میتوکندری توسط رسوراترول یک مکانیسم مهم برای محافظت از سلول های عصبی در برابر سمیت سلولی اکسیداتیو ناشی از استرس اکسیداتیو میتوکندری است (19). همچنین در مطالعه ای نشان داده شد که تجویز رسوراترول در موش های تحت مواجهه با بنزوپیرن با کاهش لیپید پراکسیداسیون و اکسیداسیون گلو تاتیون و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز همراه بوده است (20).

با توجه به این که مهم ترین مکانیسم سمیت PFOA در بافت کبد استرس اکسیداتیو و سمیت ناشی از رادیکال های آزاد می باشد. بنابراین، شناسایی و بررسی ترکیباتی که بتوانند از آسیب های اکسیداتیو جلوگیری کنند، می توانند از اختلال عملکرد میتوکندری ناشی از این ماده نیز ممانعت کنند. از این رو در این مطالعه اثرات محافظتی رسوراترول بر روی سمیت میتوکندریایی

ناشی از پرفلوئوروآکتانویک اسید در میتوکندری‌های ایزوله شده بافت کبد موش صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

رسوراترول از یکی از شرکت‌های داخلی، پرفلوئوروآکتانویک اسید و تیوباریتوریک اسید از شرکت Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) و بقیه مواد مورد استفاده از شرکت (Darmstadt, Germany) تهیه شد.

در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی از موش‌های صحرایی نر در محدوده وزنی 200-250 گرم که در شرایط استاندارد از نظر دسترسی به آب و غذا و سیکل 12 ساعته روشنایی و تاریکی نگهداری شدند، استفاده شد. حیوانات 24 ساعت قبل از انجام آزمایشات ناشتا نگه داشته می‌شدند. کلیه آزمایشات انجام شده، با توجه به دستورالعمل‌های ثبت شده در کمیته آزمایشات حیوانی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران صورت گرفت. موش‌ها را با اتر بیهوش کرده و بلافاصله بافت کبد را خارج کردیم. بافت‌های جداسازی شده ابتدا با نرمال سالین، سپس در بافر (0.25M sucrose, 10mM, Tris-HCl and 250µg BSA/ml) شستشو داده شدند. سپس بافت هموژن تهیه شد. بافت هموژن شده ابتدا با سرعت 2000xg به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس محلول رویی را با سرعت 10000xg به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را دور ریخته و رسوب ته لوله را که حاوی میتوکندری است در بافر هموژناسیون (0.25M sucrose, 10mM, Tris-HCl and 250µg BSA/ml) پراکنده کردیم.

تعیین غلظت پروتئین

اندازه‌گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد انجام شد (21). ابتدا محلول استوک کوماسی بلو (کوماسی بلو 50 میلی گرم، متانول 25 میلی گرم، اسید فسفریک 50 میلی لیتر و آب مقطر تا 200 میلی لیتر) ساخته که برای

کار روزانه محلول استوک با آب به نسبت 1 به 4 رقیق شد. در مرحله بعد غلظت‌های مختلفی از پروتئین استاندارد (آلبومین) در محدوده 200-2000mg/ml تهیه شد سپس 100 ماکرولیتر از استانداردها، نمونه، بافر (بلانک) در لوله‌های جداگانه و تمیز ریخته و 5 میلی لیتر معرف رنگی رقیق شده اضافه شد. نمونه‌ها با ورنکس مخلوط شد. در فاصله زمانی 15 دقیقه تا یک ساعت جذب در 595 نانومتر در مقابل بلانک خوانده شد. منحنی استاندارد رسم شده و غلظت‌های پروتئین سوسپانسیون میتوکندری از روی منحنی استاندارد به دست آورده شد و سوسپانسیون میتوکندری با بافر مورد نظر تا غلظت 1000 mg/ml رقیق شد.

ارزیابی عملکرد میتوکندری

برای اندازه‌گیری فعالیت میتوکندری از روش احیا رنگ (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) استفاده می‌کنیم. به این صورت که یک ساعت پس از تماس سم با میتوکندری‌ها، 100µL از سوسپانسیون میتوکندری در هر چاهک پلیت 96 خانه‌ای ریخته و سپس محلول MTT (0/4 درصد) به همراه سوکسینات (10mM) را به هر چاهک اضافه کرده و به دور از نور در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت نیم ساعت انکوبه می‌کنیم. کریستال‌های فورمازون تشکیل شده را با اضافه کردن 100µL DMSO حل کرده و سپس جذب نمونه‌ها را در 570nm با استفاده از الیزا ریدر خوانده می‌شود. درصد تغییر در فعالیت آنزیم را با سنجیدن جذب گروه‌ها در برابر جذب گروه کنترل محاسبه شد (22).

اندازه‌گیری میزان ROS با فلوریمتری

میزان ROS با استفاده از معرف DCFH-DA (dichlorodihydro-fluorescein diacetate) اندازه‌گیری شد. بعد از تعیین پروتئین سوسپانسیون میتوکندریایی، 20 µl DCFH-DA به 2000 µl از نمونه اضافه کرده و

در 4°C به مدت 15 دقیقه نگهداری کردیم. سپس جذب در طول موج تحریکی 312 nm و نشری 420 nm اندازه گیری شد (23).

اندازه گیری پراکسید/اسیون لیپیدی

بر اساس روش تیوبایتوریک اسید اندازه گیری شد. بدین ترتیب که به 0/2 ml از سوسپانسیون میتوکندریایی 0/1 ml از معرف thiobarbituric acid (TBA) شامل 0/5 HCl، 5% TCA و 0.3% TBA اضافه کرده و به خوبی مخلوط و در حمام آب گرم به مدت 30 دقیقه انکوبه کردیم. بعد از سرد شدن به آن 0/2 ml n-بوتانل اضافه کرده و خوب تکان داده و سپس در 3005 rpm به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ کرده، لایه n-بوتانل برای سنجش در طول موج 532 nm جدا شده و مقدار TBARS از روی منحنی استاندارد محاسبه شد (24).

تعیین میزان پروتئین کربونیل

میزان پروتئین کربونیل با استفاده از معرف 2,4-dinitrophenyl-hydrazine (DNPH) اندازه گیری می شود. بعد از تعیین پروتئین سوسپانسیون میتوکندریایی، 500 μl از تری کلرواستیک اسید (20% w/v) به 250 μg از نمونه اضافه کرده و در 4°C به مدت 15 دقیقه نگهداری کردیم. سپس پروتئین های رسوب داده شده با دور $6500 \times g$ به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب زیرین را کاملاً در 500 μl از 0.1 M NaOH پراکنده کرده و 500 μl از 10 mM DNPH حل شده در 2 M HCl را به نمونه ها اضافه کردیم. هم چنین یک بلانک با اضافه کردن 500 μl از 2 M HCl بدون DNPH به نمونه پروتئین تهیه شد. سپس نمونه ها به مدت نیم ساعت در دمای اتاق و به دور از نور انکوبه شده و 500 μl تری کلرواستیک اسید (20% w/v) اضافه شد. رسوب پروتئینی با سانتریفیوژ در $6500 \times g$ به مدت 10 دقیقه جمع آوری شد. رسوب زیرین با 1 میلی لیتر از مخلوط (v/v) 1:1 اتانول و اتیل استات ترکیب شده و مجدداً در $6500 \times g$ به مدت

10 دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب پروتئین نهایی را در 200 μl از محلول گوانین هیدروکلراید 6M پراکنده کردیم. میزان پروتئین کربونیل با خواندن جذب در 365 nm با ضریب جذب $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ارزیابی شد که به صورت nmol of DNPH per milligram of protein بیان می گردد (25).

اندازه گیری سطح گلو تاتیون

یک میلی لیتر از سوسپانسیون میتوکندریایی را برداشته و به آن 0/25 میلی لیتر تری کلرواستیک اسید 20 درصد اضافه کرده و بعد از ورتکس کردن به مدت 20 دقیقه در $1000 \times g$ سانتریفیوژ کردیم. یک میلی لیتر از محلول شفاف رویی را برداشته و به آن 2 میلی لیتر دی سدیم هیدروژن فسفات 0/3 مولار و 0/5 میلی لیتر 0.4% DTNB اضافه کرده و ورتکس کردیم. 15 دقیقه انکوبه انجام شد تا واکنش کامل شود. سپس میزان جذب را در طول موج 412 نانومتر خواندیم. غلظت گلو تاتیون را از روی منحنی استاندارد گلو تاتیون برحسب nmol/ml به دست آوردیم (26).

آنالیز آماری

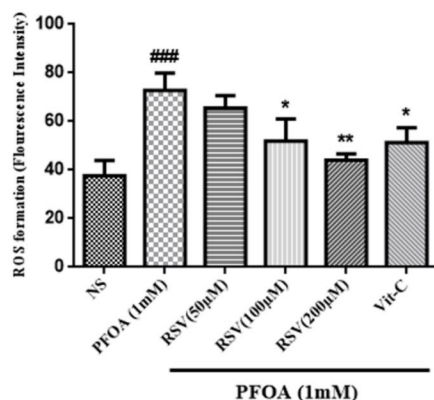
کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار آماری Prism مدل 6 و مقایسه داده ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با پست تست Tukey صورت خواهد گرفت. حد معنادار $P < 0/05$ تعریف شده است.

یافته ها

اثر رسوراترول بر روی سمیت میتوکندریایی ناشی از پرفلوئورواکتانوتیک اسید در میتوکندری های ایزوله کبد موش صحرایی نر

اثر محافظتی رسوراترول روی سمیت میتوکندریایی ناشی از پرفلوئورواکتانوتیک اسید در میتوکندری های ایزوله بافت کبد موش صحرایی نر بررسی شد که همان طور که در تصویر شماره 1 نشان داده شده است، میزان فعالیت

همراه پرفلوئورواکتانویک اسید به صورت وابسته به غلظت باعث کاهش میزان تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود که این اثر در غلظت‌های 100 و 200 میکرومولار از رسوراترول از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$).



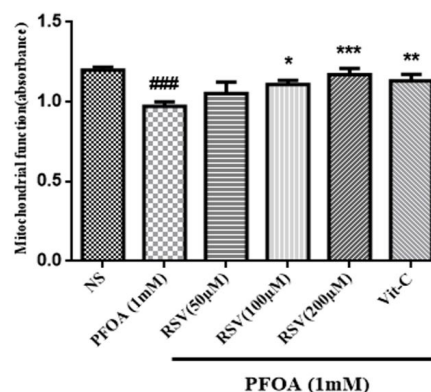
نمودار شماره 2: اثر رسوراترول بر میزان تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از پرفلوئورواکتانویک اسید در میتوکندری‌های ایزوله کبد موش صحرایی نر

نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است. #### نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل است ($P < 0/001$). *: نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه پرفلوئورواکتانویک اسید است ($P < 0/05$). **: نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه پرفلوئورواکتانویک اسید است ($P < 0/01$).

اثر رسوراترول بر میزان لیپید پراکسید/اسیون ناشی از پرفلوئورواکتانویک اسید در میتوکندری‌های ایزوله کبد موش صحرایی نر

میزان لیپید پراکسید/اسیون، پس از یک ساعت تماس میتوکندری‌های ایزوله شده بافت کبد موش صحرایی نر با غلظت‌های 50، 100 و 200 میکرومولار از رسوراترول و 1 میلی مولار پرفلوئورواکتانویک اسید با استفاده از معرف TBA سنجیده شد. همانطور که در تصویر شماره 4 نشان داده شده است، سطح مالون دی آلدئید در تمامی موش‌هایی که پرفلوئورواکتانویک اسید دریافت کردند، در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. علاوه بر این، میزان مالون دی آلدئید در گروه‌هایی که رسوراترول با غلظت‌های مختلف (50-200 μM) دریافت کردند به صورت وابسته به غلظت

میتوکندری‌ها در مواجهه با 1mM پرفلوئورواکتانویک اسید به میزان قابل توجهی کاهش پیدا کرده است ($P < 0/001$) اما مواجهه میتوکندری‌ها با رسوراترول در غلظت‌های (50-200 μM) به صورت وابسته به غلظت سبب کاهش سمیت پرفلوئورواکتانویک اسید (1mM) شد که این اثر در غلظت‌های 100 و 200 میکرومولار از رسوراترول از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$). مکمل رزوراترول به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل تغییر قابل توجهی بر روی سمیت میتوکندریایی ایجاد نکرد (نمودار شماره 1).



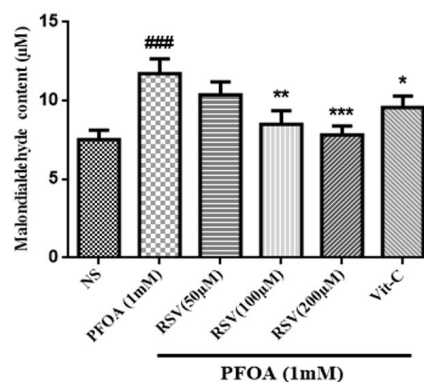
نمودار شماره 1: اثر رسوراترول بر روی سمیت میتوکندریایی ناشی از پرفلوئورواکتانویک اسید در میتوکندری‌های ایزوله کبد موش صحرایی نر.

نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است. #### نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل است ($P < 0/001$). *: نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه پرفلوئورواکتانویک اسید است ($P < 0/05$). **: نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه پرفلوئورواکتانویک اسید است ($P < 0/01$). ***: نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه پرفلوئورواکتانویک اسید است ($P < 0/001$).

اثر رسوراترول بر میزان تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از پرفلوئورواکتانویک اسید در میتوکندری‌های ایزوله کبد موش صحرایی نر

همان‌طور که در نمودار شماره 2 نشان داده شده است، بیش‌ترین میزان تولید ROS در گروه دریافت‌کننده پرفلوئورواکتانویک اسید با غلظت 1 mM و کمترین میزان تولید در گروه دریافت‌کننده رسوراترول با غلظت 200 μM می‌باشد. بنابراین مواجهه با رسوراترول

کاهش یافت که این اثر در غلظت‌های 100 و 200 میکرومولار از رسوراترول از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$). مکمل رسوراترول به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل تغییر قابل ملاحظه‌ای بر میزان لیپید پراکسیداسیون ایجاد نکرد (تصویر شماره 4).



تصویر شماره 3: اثر رسوراترول بر میزان لیپید پراکسیداسیون ناشی از پرفلوئورواکتانوثیک اسید در میتوکندری‌های ایزوله کبد موش صحرایی نر

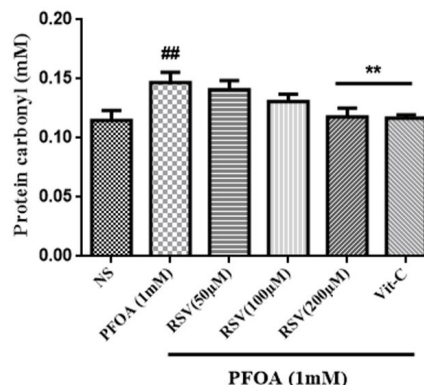
نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است.

نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل است ($P < 0/001$)

*: نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه پرفلوئورواکتانوثیک اسید است ($P < 0/05$)

** نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه پرفلوئورواکتانوثیک اسید است ($P < 0/01$)

*** نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه پرفلوئورواکتانوثیک اسید است ($P < 0/001$)



تصویر شماره 4: اثر رسوراترول بر میزان پروتئین کربونیل ناشی از پرفلوئورواکتانوثیک اسید در میتوکندری‌های ایزوله کبد موش صحرایی نر

نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است.

نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل است ($P < 0/01$)

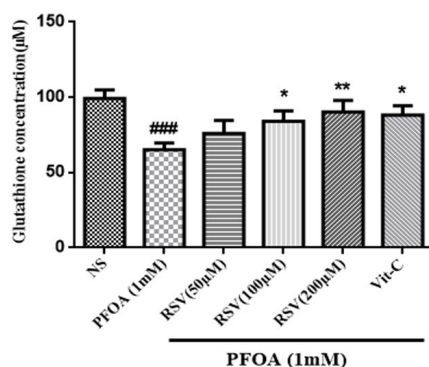
** نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه پرفلوئورواکتانوثیک اسید است ($P < 0/01$)

اثر رسوراترول بر میزان پروتئین کربونیل ناشی از پرفلوئورواکتانوثیک اسید در میتوکندری‌های ایزوله کبد موش صحرایی نر

در مطالعه حاضر نشان داده شد که مواجهه با پرفلوئورواکتانوثیک اسید با افزایش معنی‌دار سطح پروتئین کربونیل در میتوکندری‌های ایزوله کبد رت همراه بود (تصویر شماره 3). نتایج نشان داد که در گروه‌های دریافت کننده رسوراترول نسبت به گروه دریافت کننده پرفلوئورواکتانوثیک اسید کاهش این بیومارکر مشاهده شد. این در حالی است که دوزهای پائین رسوراترول در کاهش پروتئین کربونیل ناشی از پرفلوئورواکتانوثیک اسید خیلی موثر نبود ($P < 0/05$).

اثر رسوراترول بر غلظت گلو تاتیون ناشی از پرفلوئورواکتانوثیک اسید در میتوکندری‌های ایزوله کبد موش صحرایی نر

همان‌طور که در تصویر شماره 5 نشان داده شد، پرفلوئورواکتانوثیک اسید سبب تخلیه سطوح گلو تاتیون در میتوکندری‌های ایزوله شده از بافت کبد شده است. از سویی دیگر تجویز رسوراترول توانست به‌طور معنی‌داری از کاهش سطح گلو تاتیون ممانعت کند که این کاهش در غلظت‌های 100 و 200 میکرومولار از رسوراترول از نظر آماری معنی‌دارتر بود ($P < 0/05$).



تصویر شماره 5: اثر رسوراترول بر غلظت گلو تاتیون ناشی از پرفلوئورواکتانوثیک اسید در میتوکندری‌های ایزوله کبد موش صحرایی نر

نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است.
 #### نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل است ($P < 0/001$)
 *: نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه پرفلوئورواکتانویک اسید است ($P < 0/05$)
 **: نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه پرفلوئورواکتانویک اسید است ($P < 0/01$)
 ***: نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه پرفلوئورواکتانویک اسید است ($P < 0/001$)

بحث

پرفلوئورواکتانویک اسید PFOA یکی از اعضای ترکیبات آلی پرفلورینه پایدار است که به عنوان سورفکتانت قوی به طور گسترده در تولید محصولات صنعتی از جمله روکش تابه های تفلون نجسب و بسته بندی مواد غذایی کاربرد دارد (11). این ماده با توجه به دارا بودن پیوندهای قوی کربن-فلوئور در ساختار خود غیر قابل تجزیه و بسیار پایدار در محیط زیست می باشد (2). در مطالعات متعددی اثبات شده است که مواجهه با PFOA با افزایش آسیب سلول های کبدی همراه است. اولین و مهم ترین مکانیسم سمیت PFOA در بافت کبد استرس اکسیداتیو و سمیت ناشی از رادیکال های آزاد می باشد (8،1). PFOA به عنوان یکی از آلاینده های مهم در آب آشامیدنی شناخته شده است. در حال حاضر، هیچ استاندارد آب آشامیدنی برای PFOA وجود ندارد. با این حال در سال 2009 آژانس حفاظت از محیط زیست ایالات متحده سطح سلامت 0/4 میکروگرم بر لیتر را برای PFOA در سطح مواجهه کوتاه مدت تعیین کرد. نیوجرسی هم میزان مواجهه طولانی مدت با PFOA را برای یک سیستم آبی در سال 2007، 0/04 میکروگرم بر لیتر منتشر کرد. هم چنین در یک مطالعه ای در مینه سوتا حداکثر غلظت 0/9 میکروگرم بر لیتر برای PFOA در چاه های شهری بین سال های 2004 و 2008 گزارش شد (27). در سال 2016، آژانس حفاظت از محیط زیست ایالات متحده (US EPA) سطوح مشاوره بهداشتی و حاشیه ای از محافظت را در برابر قرار گرفتن در معرض PFOA، 70 قسمت در تریلیون (0/07 میکروگرم در لیتر) برای آب آشامیدنی مادام العمر تعیین کرد (28،29). مصرف غذا یکی دیگر از منابع مهم مواجهه با PFOA است. PFOA در انواع محصولات غذایی

از جمله سبزیجات، گوشت، محصولات لبنی، شیر مادر انسان و ماهی یافت می شود. تجمع زیستی در ماهی و سایر موجودات آبی خوراکی مسیر دیگری برای قرار گرفتن در معرض رژیم غذایی است. PFOA در گوشت گاو در نتیجه مصرف خوراک گاو آلوده شناسایی شده است (30).

در شرایط فیزیولوژیکی بدن بین تولید مولکول های اکسیدکننده (رادیکال های آزاد) و دفاع آنتی اکسیدانت ها تعادل وجود دارد. استرس اکسیداتیو به حالتی گفته می شود که دفاع آنتی اکسیدانت های سلولی برای از بین بردن رادیکال های آزاد تشکیل شده ضعیف باشد و یا تولید رادیکال های آزاد بیشتر از ظرفیت آنتی اکسیدانتی سلول باشد (31). افزایش کنترل نشده در میزان تولید اکسیدانت ها ممکن است باعث انجام واکنش های زنجیره ای توسط رادیکال های آزاد شود که می تواند پروتئین ها، لیپیدها، پلی ساکاریدها و DNA را مورد هدف قرار دهد و در نتیجه موادی تولید می گردد که نه تنها کارکرد اولیه خود را از دست می دهند، بلکه باعث بروز مشکلاتی در سیستم بیولوژیکی بدن نیز می شوند. در صورت به وجود آمدن استرس اکسیداتیو خفیف یا ملایم، غالباً بافت ها با افزایش دفاع آنتی اکسیدانتی آن را خنثی می کنند ولی در حالت استرس اکسیداتیو شدید سلول ها آسیب دیده و ممکن است منجر به مرگ سلول گردد (32).

میتوکندری یکی از مهم ترین اندامک های سلولی می باشد که وظیفه تولید انرژی را برعهده دارد. مطالعات مختلف نشان داده اند که آسیب میتوکندری می تواند باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و فعال کردن مسیرهای آپوپتوزی و در نهایت مرگ سلولی شود (12،33،34). در مطالعه ای که توسط Mashayekhi و همکاران در سال 2015 انجام شد نشان داد که مواجهه با PFOA باعث افزایش سطح ROS در کمپلکس 1 و 3 میتوکندری کبد، سقوط پتانسیل غشای میتوکندری، تورم و خروج سایتوکروم C به سیتوزول به عنوان سیگنال آغاز فرایند آپاپتوز می شود (35). با توجه به مکانیسم سمیت پرفلوئورواکتانویک اسید، استفاده از یک ماده

آنتی اکسیدانت در کاهش عوارض این ماده منطقی می باشد. رسوراترول مولکولی است که به مقدار زیادی در پوست انگور قرمز و هسته آن، توت و سایر گیاهان دارویی وجود دارد. این مولکول به صورت یک ترکیب فیتوالکسین پلی فنولی بوده و دارای اثرات آنتی اکسیدانی و برداشت کننده رادیکال های آزاد ناشی از فرآیندهای اکسیداتیو و همچنین اثرات ضد التهابی می باشد (36،16). رسوراترول از سد خونی - مغزی عبور کرده و در بیماری های مختلف مثل ایسکمی مغزی و آلزایمر اثرات محافظتی خوبی از خود نشان داده است (37). مطالعات مختلفی به بررسی اثرات آنتی اکسیدانی رسوراترول پرداخته اند. در مطالعه ای که توسط Hong و همکاران در سال 2010 انجام شد نشان داده شد که رسوراترول می تواند با کاهش سطح مالون دی آلدئید و افزایش سطح گلو تاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز، استرس اکسیداتیو ناشی از دی میل نیتروز آمین در بافت کبد را مهار کند (38). در مطالعه Li و همکارانش در سال 2019 نشان داده شد که رسوراترول توانست با کاهش پتانسیل غشای میتو کندری و نیز افزایش نسبت Bcl2/Bax، استرس اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از هاپتو کسی را در سلول های کاردیومیوسیت مهار کند (39). رسوراترول همچنین به صورت غیر وابسته به جنس سبب بهبود ظرفیت عملکردی سلول های اندوتلیال و همچنین سرکوب آسیب اکسیداتیو تحت شرایط فیزیولوژیک در موش ها شد که اثرات خوبی را به عنوان یک عامل محافظ قلبی و عروقی نشان داد (40).

در مطالعه دیگری نشان داده شد که اثرات محافظتی رسوراترول ناشی از خصوصیات آنتی اکسیدانی آن است که در مدل های مختلف مثل استرس اکسیداتیو ناشی از لیپوبلی ساکاریدها و دو کسی رویسین اثبات شد (41). در مطالعات ما نیز نشان داده شد که رسوراترول به صورت وابسته به غلظت، پس از قرار گرفتن میتو کندری های ایزوله بافت کبد موش صحرایی نر در مجاورت با پرفلوئورواکتانوتیک اسید، میزان درصد میتو کندری های

فعال را افزایش داده و لذا این نتیجه، تایید کننده اثر احیایی و به عبارتی اثر آنتی اکسیدانی رسوراترول است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مواجهه با پرفلوئورواکتانوتیک اسید با افزایش سطح گونه های فعال اکسیژن همراه بود و تجویز رسوراترول در گروه های تحت درمان به طور معنی داری منجر به کاهش میزان تولید رادیکال های فعال اکسیژن ناشی از اثرات تخریبی پرفلوئورواکتانوتیک اسید می شود. پراکسیداسیون لیپیدی یکی از اثرات مخرب رادیکال های آزاد بر سلول می باشد که عملکرد بیولوژیکی غشای سلولی را مختل می کند. این امر منجر به از بین رفتن سیالیت غشای سلول، کاهش پتانسیل غشای سلول و افزایش نفوذ پذیری یون ها، متلاشی شدن و مرگ سلول می شود (42). نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد پرفلوئورواکتانوتیک اسید به صورت وابسته به غلظت منجر به افزایش غلظت مالون دی آلدئید، به عنوان شاخصی برای سطح لیپید پراکسیداسیون می شود و در نتیجه میزان لیپید پراکسیداسیون را افزایش می دهد. که تجویز عصاره رسوراترول توانست پراکسیداسیون لیپیدی ایجاد شده توسط پرفلوئورواکتانوتیک اسید را در میتو کندری های ایزوله شده بافت کبد مهار کند. در مطالعه حاضر نشان داده شد که مواجهه با پرفلوئورواکتانوتیک اسید با افزایش سطح پروتئین کربونیل در کبد رت همراه بود که در گروه های تحت درمان با عصاره رسوراترول کاهش این مارکر مشاهده شد و توانست از آسیب اکسیداتیو پروتئین توسط پرفلوئورواکتانوتیک اسید جلوگیری کند. گلو تاتیون به عنوان یک آنتی اکسیدانت درون سلولی، به طور طبیعی به مبارزه با عملکرد رادیکال های آزاد تولید شده در شرایط استرس اکسیداتیو می پردازد (43). در مطالعه ما نشان داده شد که پرفلوئورواکتانوتیک اسید، منجر به کاهش سطح گلو تاتیون سلولی می شود. این امر در نتیجه تولید رادیکال های آزاد اتفاق می افتد و خود منجر به ضعف در عملکرد دفاعی سلول و در نتیجه آن بروز آسیب های سلولی می شود. در این مطالعه تجویز عصاره

برای کاهش عوارض و مشکلات پرفلوئوروآکتانویک اسید در مطالعات داخل سلولی و حیوانی استفاده کرد که در صورت اثربخشی می توان در فاز مطالعات بالینی نیز از آن استفاده کرد این امر نیازمند مطالعات بیش تر در این زمینه است.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دکترای عمومی داروسازی خانم مژده سیفی با کد اخلاق (IR.MAZUMS..REC.1400.8866) و کد طرح 8866 بوده و منابع مالی آن توسط دانشگاه علوم پزشکی مازندران تأمین شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می شود.

رسوراترول توانست از تخلیه ذخایر گلوکوتایون توسط پرفلوئوروآکتانویک اسید در میتوکندری های ایزوله شده بافت کبد ممانعت کند.

نتایج مطالعه ما نقش اساسی بروز استرس اکسیداتیو و آسیب به میتوکندری در نتیجه تولید رادیکال های آزاد را در سمیت ناشی از پرفلوئوروآکتانویک اسید در میتوکندری های ایزوله شده بافت کبد موش صحرایی و پیامدهایی مثل لیپید پراکسیداسیون و از کار افتادن میتوکندری را نشان داد. بنابراین با توجه به اثرات سودمند رسوراترول در کاهش آسیب های اکسیداتیو و آسیب میتوکندریایی ناشی از پرفلوئوروآکتانویک اسید در شرایط خارج سلولی، می توان از این ترکیب

References

1. Yang B, Zou W, Hu Z, Liu F, Zhou L, Yang S, et al. Involvement of oxidative stress and inflammation in liver injury caused by perfluorooctanoic acid exposure in mice. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 409837.
2. Freberg BI, Haug LS, Olsen R, Daae HL, Hersson M, Thomsen C, et al. Occupational exposure to airborne perfluorinated compounds during professional ski waxing. *Environ Sci Technol* 2010; 44(19): 7723-7728.
3. Geiger SD, Xiao J, Shankar A. Positive association between perfluoroalkyl chemicals and hyperuricemia in children. *Am J Epidemiol* 2013; 177(11): 1255-1262.
4. Shankar A, Xiao J, Ducatman A. Perfluorooctanoic acid and cardiovascular disease in US adults. *Arch Intern Med* 2012; 172(18): 1397-1403.
5. Shankar A, Xiao J, Ducatman A. Perfluoroalkyl chemicals and chronic kidney disease in US adults. *Am J Epidemiol* 2011; 174(8): 893-900.
6. Melzer D, Rice N, Depledge MH, Henley WE, Galloway TS. Association between serum perfluorooctanoic acid (PFOA) and thyroid disease in the US National Health and Nutrition Examination Survey. *Environ Health Perspect* 2010; 118(5): 686-692.
7. Gallo V, Leonardi G, Genser B, Lopez-Espinosa M-J, Frisbee SJ, Karlsson L, et al. Serum perfluorooctanoate(PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) concentrations and liver function biomarkers in a population with elevated PFOA exposure. *Environ Health Perspect* 2012; 120(5): 655-660.
8. Liu W, Xu C, Sun X, Kuang H, Kuang X, Zou W, et al. Grape seed proanthocyanidin extract protects against perfluorooctanoic acid-induced hepatotoxicity by attenuating inflammatory response, oxidative stress and apoptosis in mice. *Toxicol Res (Camb)* 2016; 5(1): 224-234.
9. Salmaninejad A, Kangari P, Shakoori A. Oxidative stress: development and progression

- of breast cancer: review article. *Tehran Univ Med J* 2017; 75(1): 1-9.
10. Vahidirad M, Arab-Nozari M, Mohammadi H, Zamani E, Shaki F. Protective effect of captopril against diazinon induced nephrotoxicity and neurotoxicity via inhibition of ROS-NO pathway. *Drug Chem Toxicol* 2018; 41(3): 287-293.
 11. Zou W, Liu W, Yang B, Wu L, Yang J, Zou T, et al. Quercetin protects against perfluorooctanoic acid-induced liver injury by attenuating oxidative stress and inflammatory response in mice. *Int Immunopharmacol* 2015; 28(1): 129-135.
 12. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 2011; 435(2): 297-312.
 13. Wallace K, Kissling G, Melnick R, Blystone C. Structure-activity relationships for perfluoroalkane-induced in vitro interference with rat liver mitochondrial respiration. *Toxicol Lett* 2013; 222(3): 257-264.
 14. Salimi A, Nikoosiar Jahromi M, Pourahmad J. Maternal exposure causes mitochondrial dysfunction in brain, liver, and heart of mouse fetus: an explanation for perfluorooctanoic acid induced abortion and developmental toxicity. *Environ Toxicol* 2019; 34(7): 878-885.
 15. Smoliga JM, Baur JA, Hausenblas HA. Resveratrol and health-a comprehensive review of human clinical trials. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55(8): 1129-1141.
 16. Shokrzadeh M, Alidous F, Nourian Y, Vaezi N, Mohammadi E, Shaki F. Protective Effects of Resveratrol against Paraquat-Induced Mitochondrial Dysfunction in Brain and Lung Isolated Mitochondria. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014; 24(114): 93-101 (Persian).
 17. Malaguamera L. Influence of resveratrol on the immune response. *Nutrients* 2019; 11(5): 946.
 18. Bhat KPL, Kosmeder JW, Pezzuto JM. Biological effects of resveratrol. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3(6): 1041-1064.
 19. Fukui M, Choi HJ, Zhu BT. Mechanism for the protective effect of resveratrol against oxidative stress-induced neuronal death. *Free Radic Biol Med* 2010; 49(5): 800-813.
 20. Bukowska B, Duchnowicz P. Molecular Mechanisms of Action of Selected Substances Involved in the Reduction of Benzo [a] pyrene-Induced Oxidative Stress. *Molecules* 2022; 27(4): 1379.
 21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72(1-2): 248-254.
 22. Shokrzadeh M, Shaki F, Mohammadi E, Rezagholizadeh N, Ebrahimi F. Edaravone decreases paraquat toxicity in a 549 cells and lung isolated mitochondria. *Iran J Pharm Res* 2014; 13(2): 675-681.
 23. Lund B-O, Miller DM, Woods JS. Studies on Hg (II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 1993; 45(10): 2017-2024.
 24. Habibi E, Naderi M, Talebpour Amiri F, Emamgholizadeh F, Shaki F. Protective Effect of Hydroalcoholic Extract of *Melissa Officinalis* L. on Ethanol-Induced Testicular Toxicity in Wistar Rats. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2021; 31(202): 13-24 (Persian).
 25. Shaki F, Hosseini M-J, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(12): 1940-1950.
 26. Ahangar N, Naderi M, Noroozi A, Ghasemi M, Zamani E, Shaki F. Zinc deficiency and oxidative stress involved in valproic acid

- induced hepatotoxicity: protection by zinc and selenium supplementation. *Biol Trace Elem Res* 2017; 179(1): 102-109.
27. EPA U. Drinking water health advisory for perfluorooctane sulfonate (PFOS). Massachusetts: Health and Ecological Criteria Division EPA. 2016.
 28. Environmental Protection Agency. Drinking water health advisories for PFOA and PFOS. Washington: EPA; 2016.
 29. Garnick L, Massarsky A, Mushnick A, Hamaji C, Scott P, Monnot A. An evaluation of health-based federal and state PFOA drinking water guidelines in the United States. *Sci Total Environ* 2021; 761: 144107.
 30. Environmental Protection Agency. Drinking water health advisory for perfluorooctanoic acid (PFOA). Washington, DC:EPA ;2016.
 31. Moore PD, Patlolla AK, Tchounwou PB. Cytogenetic evaluation of malathion-induced toxicity in Sprague-Dawley rats. *Mutat Res* 2011; 725(1-2): 782-88.
 32. Nisticò R, Mehdawy B, Piccirilli S, Mercuri N. Paraquat-and rotenone-induced models of Parkinson's disease. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011; 24(2): 313-322.
 33. Hosseini M-J, Shaki F, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of arsenic (III) on isolated liver mitochondria: a new mechanistic approach. *Iran J Pharm Res* 2013; 12(Suppl): 121-138.
 34. Hosseini M-J, Shaki F, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of vanadium on isolated rat liver mitochondria: a new mechanistic approach. *Metallomics* 2013; 5(2): 152-166.
 35. Mashayekhi V, Tehrani KHME, Hashemzadei M, Tabrizian K, Shahraki J, Hosseini M. Mechanistic approach for the toxic effects of perfluorooctanoic acid on isolated rat liver and brain mitochondria. *Hum Exp Toxicol* 2015; 34(10): 985-996.
 36. Yu M, Xue J, Li Y, Zhang W, Ma D, Liu L, et al. Resveratrol protects against arsenic trioxide-induced nephrotoxicity by facilitating arsenic metabolism and decreasing oxidative stress. *Arch Toxicol* 2013; 87(6): 1025-1035.
 37. Sawda C, Moussa C, Turner RS. Resveratrol for Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2017; 1403(1): 142-149.
 38. Hong S-W, Jung KH, Zheng H-M, Lee H-S, Suh J-K, Park I-S, et al. The protective effect of resveratrol on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Arch Pharm Res* 2010; 33(4): 601-609.
 39. Li T, Chen L, Yu Y, Yang B, Li P, Tan XQ. Resveratrol alleviates hypoxia/reoxygenation injury-induced mitochondrial oxidative stress in cardiomyocytes. *Mol Med Rep* 2019; 19(4): 2774-2780.
 40. Gresele P, Cerletti C, Guglielmini G, Pignatelli P, de Gaetano G, Violi F. Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *J Nutr Biochem* 2011; 22(3): 201-211.
 41. Xu X, Chen K, Kobayashi S, Timm D, Liang Q. Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cardiomyocyte death via inhibition of p70 S6 kinase 1-mediated autophagy. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 341(1): 183-195.
 42. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 482(3): 419-425.
 43. Galano A, Alvarez-Idaboy JR. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals. *Rsc Advances* 2011; 1(9): 1763-1771.