

بررسی اثرات اپی کتچین بر استرس اکسیداتیو و ژنوتوکسیسیته ناشی از سایپرمتین بر رده سلولی PC-12

نگار آذری نژاد^۱، الهه قره خانی^۲، محبوبه رحمتی^۲، محمد شکرزاده^{۳*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: اپی کتچین به عنوان یک آنتی اکسیدان جدید و قوی با پتانسیل قابل توجهی برای درمان بیماری‌های عصبی شناخته می‌شود. اما، پیش از آنکه یک ترکیب فارماکولوژیک در بالین مورد استفاده قرار گیرد لازم است که در مطالعات پیش بالینی نیز مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به موارد بیان شده بر آن شدیم تا در این مطالعه به بررسی اثرات اپی کتچین بر استرس اکسیداتیو و ژنوتوکسیسیته ناشی از سایپرمتین بر رده سلولی PC-12 بپردازیم.

روش بررسی: در این مطالعه رده سلولی PC-12 با غلظت‌های گوناگون اپی کتچین (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) پیش تیمار شدند و سپس با سایپرمتین (۱۲۹/۳ میکرومولار) القای سمیت سلولی صورت گرفت. در ادامه، پارامترهای تعداد میکرونوکلئوس‌ها، رادیکال‌های آزاد اکسیژن، زنده‌مانی سلولی و سطح گلوپروتئین اندازه‌گیری شدند. **نتایج:** در مطالعه حاضر اپی کتچین توانست در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر توانست تعداد میکرونوکلئوس‌ها را به طور معنی‌داری کاهش و زنده‌مانی سلول‌ها را افزایش دهد. اما در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر نتوانست گلوپروتئین را به طور معنی‌داری افزایش و سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن کاهش دهد. اما غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر توانستند به طور معنی‌داری باعث بهبود پارامترهای یاد شده شد. **نتیجه‌گیری:** به طور کلی به نظر می‌رسد که اپی کتچین در غلظت‌های مختلف می‌تواند پارامترهای استرس اکسیداتیو و ژنوتوکسیسیته را در رده سلولی PC-12 بهبود ببخشد.

واژه‌های کلیدی: اپی کتچین، استرس اکسیداتیو، ژنوتوکسیسیته، سایپرمتین

ارجاع: آذری نژاد نگار، قره خانی الهه، رحمتی محبوبه، شکرزاده محمد. بررسی اثرات اپی کتچین بر استرس اکسیداتیو و ژنوتوکسیسیته ناشی از سایپرمتین بر رده سلولی PC-12. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۵؛ ۳۴ (۱): ۴۰-۹۸۳۰.

۱- پردیس رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران.

۲- گروه سم‌شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۳- گروه سم‌شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. مرکز تحقیقات علوم دارویی، موسسه

هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

(نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۱۱۲۶۳۴۴۸، پست الکترونیکی: mslamuk@yahoo.com، صندوق پستی: ۴۸۱۴۷۷۸۳۵۷

رادیکال‌های آزاد را خنثی می‌کند، بلکه از طریق غیرمستقیم مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی درون ز بدن را از طریق تعدیل مسیرهای بیوشیمیایی کلیدی تقویت می‌کند. یک مسیر قابل توجه تحت تأثیر اپی‌کتچین، مسیر Nrf2 است. اپی‌کتچین Nrf2 را با افزایش جداسازی از آن از بازدارنده سیتوپلاسمی Keap1 و تسهیل انتقال آن به هسته فعال می‌کند، و از این طریق بیان عوامل آنتی‌اکسیدان را افزایش می‌دهد (۷). هم‌چنین اپی‌کتچین بدلیل توانایی در کاهش استرس اکسیداتیو در میتوکندری باعث کاهش اختلال در میتوکندری و بیماری‌های وابسته به آن مانند اختلالات ژنتیکی نادر و آسیب‌شناسی‌های اکتسابی پیچیده می‌شود (۸). ویژگی‌های مولکولی اپی‌کتچین، مانند حلالیت و پایداری، نقش اساسی در فراهمی زیستی و اثربخشی آن ایفا می‌کند. اپی‌کتچین در آب و حلال‌های آلی مانند متانول و اتانول نسبتاً محلول است و جذب آن در دستگاه گوارش را تسهیل می‌کند (۹). با این‌حال، عواملی مانند pH و دما می‌توانند بر پایداری آن تأثیر بگذارند، به‌طوری‌که اپی‌کتچین در شرایط اسیدی پایداری است و در شرایط قلیایی یا قرار گرفتن طولانی مدت در معرض گرما مستعد تخریب است (۱۰). هنگامی که اپی‌کتچین وارد جریان خون می‌شود، وزن مولکولی نسبتاً کم و ماهیت آب‌دوست به آن اجازه می‌دهد در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های بزرگ‌تر یا بیشتر آب‌گریز، از سد خونی مغزی به‌طور موثرتر عبور کند و نفوذ قابل توجه آن را به سیستم عصبی مرکزی را تضمین کند (۱۱). مطالعات مقایسه‌ای اثربخشی برتر اپی‌کتچین را نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های معمول برجسته کرده است. به‌عنوان مثال در یک مطالعه نشان داده شده که اپی‌کتچین حتی از ویتامین E که یک ویتامین محلول در چربی است و توانایی عبور از سد خونی مغزی دارد نیز بیشتر از سد خونی مغزی عبور می‌کند (۱۲). ویتامین C اگرچه در کاهش استرس اکسیداتیو موثر است، اما به سرعت متابولیزه و دفع می‌شود و در نتیجه مدت اثر کوتاهی دارد (۱۳). در مقابل، اپی‌کتچین دارای مشخصات متابولیک مطلوب‌تری است که امکان فعالیت آنتی‌اکسیدانی پایدار در بافت‌های عصبی را فراهم می‌کند. نتایج امیدوارکننده مطالعات برون‌تن توسط مطالعات

استرس اکسیداتیو به‌طور فزاینده‌ای به‌عنوان یک مکانیسم پاتولوژیک کلیدی در مجموعه وسیعی از بیماری‌های عصبی شناخته می‌شود. مغز به دلیل مصرف زیاد اکسیژن و محتوای بالای لیپیدی که دارد، به اکسیداسیون ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال حساس است (۱). پاتوفیزیولوژی بیماری‌های نورودژنراتیو اغلب شامل تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال و گونه‌های نیتروژن فعال است که سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی سلول‌های عصبی را غرق می‌کند و منجر به آسیب و مرگ سلولی می‌شود (۲). با توجه به نقش مرکزی استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بیماری‌های نورودژنراتیو، جستجو برای درمان‌های آنتی‌اکسیدانی نوین امری حیاتی است. آنتی‌اکسیدان‌های سنتی در کارآزمایی‌های بالینی موفقیت محدودی نشان داده‌اند، شاید به دلیل ناتوانی آن‌ها در عبور مؤثر از سد خونی-مغزی و رسیدن به غلظت‌های درمانی در بافت‌های عصبی (۳). علاوه بر این، زمان‌بندی استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها به نظر می‌رسد که حیاتی است، زیرا آسیب اکسیداتیو اغلب در مراحل اولیه بیماری رخ می‌دهد و نیاز به مداخله زودهنگام دارد (۳). پیشرفت‌های اخیر در توسعه درمان‌های آنتی‌اکسیدانی بر هدف‌گیری مسیرهای خاص درگیر در استرس اکسیداتیو، مانند مسیر سیگنالینگ Nrf2، که بیان طیف گسترده‌ای از پروتئین‌های آنتی‌اکسیدانی را تنظیم می‌کند، متمرکز شده است (۴). اپی‌کتچین که از نظر شیمیایی به عنوان (-)-اپی‌کتچین شناخته می‌شود، نوعی فلاوانول با فرمول بسته $C_{15}H_{14}O_6$ است. ساختار آن از دو حلقه فنلی (حلقه A و B) و یک حلقه پیران هتروسیکلیک (حلقه C) تشکیل شده است. مشخصه بک بون ساختاری اپی‌کتچین گروه‌های هیدروکسیل متصل به حلقه‌های A و B می‌باشد که برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بسیار مهم هستند. به‌طور خاص، گروه‌های هیدروکسیل در موقعیت‌های ۳، ۴، و ۵ روی حلقه A و در موقعیت‌های ۳ و ۴ روی حلقه B واکنش‌پذیری بالایی نسبت به رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌کنند و اپی‌کتچین را قادر می‌سازند تا به‌طور مؤثر رادیکال‌های فعال را خنثی کند (۵،۶). اپی‌کتچین نه‌تنها از طریق مستقیم

غلظت‌های مختلف اپی‌کتچین (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و سپس به مدت ۴۸ ساعت در معرض سایپرمتترین (۱۲۹.۳ میکرومولار) قرار گرفتند و جذب نوری آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر سنجیده شد (۱۶).

(میانگین جذب نوری (OD) سلول‌های تحت درمان / میانگین OD کنترل) × ۱۰۰
درصد زنده‌ماندن سلولی = 100 - درصد زنده‌ماندن سلولی
تست میکرونوکلئوس

پس از کشت سلول‌ها با تراکم 1×10^6 و انکوباسیون به مدت ۷۲ ساعت، در مواجهه با اپی‌کتچین برای ۴۸ ساعت قرار گرفتند. یک کشت کنترل نشده و کشت‌های ۰/۴ درصد سلول‌های تیمار شده با DMSO و ۰/۴ درصد پیش تیمار DMSO به مدت ۲ ساعت نیز ایجاد انجام شد. سیتوکالاسین B (۶ گرم در میلی‌لیتر) برای توقف سیتوکینز ۴۴ ساعت پس از شروع همه کشت‌ها اضافه شد. پس از تیمارها، سلول‌ها برداشت و تحت یک تیمار هیپوتونیک خفیف (سیترات سدیم ۱ درصد) قرار گرفتند. سلول‌ها سانتریفیوژ شدند (۲۱۲ × گرم، ۹ دقیقه) و سه بار در متانول سرد: اسید استیک (۳: ۱) ثابت شدند. افزودن اولیه ماده ثابت حاوی ۱٪ فرمالدئید بود که حفظ سیتوپلاسم را افزایش می‌دهد. فرکانس سلول‌های دو هسته‌ای حاوی یک یا چند میکرونوکلئوس نیز تعیین شدند. به‌عنوان معیار سمیت سلولی، شاخص حیات‌بخشی بلوک سیتوکینز (CBPI) طبق فرمول زیر محاسبه شد: $CBPI = (MI + 2MII + 3(MIII + MIV))/N$ (۱۷).

اندازه‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن: ۱۰۰۰۰ سلول در صفحات ۹۶ چاهی در DMEM با ۱۰٪ FBS کاشته شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ۵٪ CO₂ تا رسیدن به ۸۰٪ تلاقی انکوبه شدند. محلول کار DCFDA به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اضافه شد. سپس، فلورسانس DCFDA با استفاده از فلورومتر (Thermo Electron Fluoroskan Ascent Corporation) در 480 nm (exc) و 515 nm (em) اندازه‌گیری شد (۱۸).

سنجش محتوای گلوکاتیون احیا شده (GSH): ابتدا سلول‌ها با استفاده از یک هموژنایزر مکانیکی شیشه‌ای همگن

حیوانی بیماری‌های نورودژنراتیو در یک راستا قرار دارند، که نشان داده شده‌اند تجویز اپی‌کتچین عملکرد شناختی را بهبود می‌بخشد، رسوب آمیلوئید - بتا را کاهش می‌دهد و از دست دادن نورون دوپامینرژیک را کاهش می‌دهد (۱۴). این اثرات به اثرات ترکیبی آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و نوروتروفیک آن نسبت داده می‌شود. علاوه بر این، توانایی اپی‌کتچین برای افزایش جریان خون مغزی و آنژیوژنز، لایه دیگری از محافظت عصبی را اضافه می‌کند که معمولاً با آنتی‌اکسیدان‌های پیشین مشاهده نمی‌شود (۱۵). در نتیجه، اپی‌کتچین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان جدید و قوی با پتانسیل قابل توجهی برای درمان بیماری‌های عصبی شناخته می‌شود. اما، پیش از آن‌که یک ترکیب فارماکولوژیک در بالین مورد استفاده قرار گیرد لازم است که در مطالعات پیش بالینی نیز مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به موارد بیان شده بر آن شدیم تا در این مطالعه به بررسی اثرات اپی‌کتچین بر استرس اکسیداتیو و ژنوتوکسیسیته ناشی از سایپرمتترین بر رده سلولی PC-12 بپردازیم.

روش بررسی

این مطالعه با هدف بررسی اثرات اپی‌کتچین بر استرس اکسیداتیو و ژنوتوکسیسیته ناشی از سایپرمتترین بر رده سلولی PC-12 انجام شد. تمام آزمایش‌ها با استفاده از سلول‌های PC12 فئوکروموسیتوم موش انجام شد. سلول‌ها دو یا سه بار در هفته زیر کشت قرار گرفتند. سلول‌ها در RPMI 1640 (شرکت سیگما-آلدریج) حاوی ۱۰ درصد FBS (Gibco) و ۱ درصد مخلوط آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Sigma) در انکوباتور مرطوب شده با اتمسفر ۹۵٪ هوا و ۵٪ CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (شرکت Thermo Electron) قرار گرفتند. تست‌های MTT جهت ارزیابی میزان سمیت و تعیین IC₅₀، میکرونوکلئوس جهت ارزیابی میزان سمیت ژنتیکی و تست‌های اندازه‌گیری میزان گونه‌های فعال اکسیژن و میزان گلوکاتیون جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو انجام شد.

سنجش MTT: میزان حیات سلولی به روش MTT اندازه‌گیری شد. برای انجام روش MTT ابتدا تعداد ۱۰^۵ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید سپس سلول‌ها با

شدند. هموزن سلولی با بافر Tris-EDTA مخلوط شد و به آن 0.4% DTNB افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در مکانی تاریک انکوبه شد. سپس سانتیفریوژ در ۲۰ دقیقه در 4°C انجام شد و جذب مایع رویی با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. در ادامه غلظت گلوتاتیون را از روی منحنی استاندارد گلوتاتیون برحسب nmol/ml به دست آوردیم (۱۸).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این مطالعه نتایج برحسب انحراف معیار \pm میانگین حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده و کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری Prism Ver.8 انجام شد و مقایسه داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و Post test مربوطه (Tukey-Kramer multiple comprehension test) صورت گرفته و نمودارها توسط همین برنامه گرافیکی رسم می‌شوند. حد معناداری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی تاثیر اپی‌کتچین بر زنده‌مانی رده سلولی PC-۱۲
مواجهه یافته با سایپرمتترین: درصد زنده‌مانی سلولی گروهی که صرفاً با سایپرمتترین (در غلظت IC_{50}) مواجهه داشتند در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری مشاهده شد ($P < 0.001$). همچنین، درصد زنده‌مانی سلول‌های تمامی گروه‌هایی که با سایپرمتترین مواجهه داشتند و اپی‌کتچین ($50 \mu\text{g/mL}$)، صرفاً با سایپرمتترین ($100 \mu\text{g/mL}$)، $200 \mu\text{g/mL}$ ، $400 \mu\text{g/mL}$ ، $800 \mu\text{g/mL}$) را دریافت کردند، در مقایسه با گروهی که صرفاً سایپرمتترین دریافت کردند افزایش معناداری یافت ($P < 0.05$) برای گروه اول $P < 0.001$ برای گروه بعدی). زنده مانی سلول‌ها با افزایش غلظت اپی‌کتچین افزایش یافت. سطح زنده مانی سلول‌هایی که صرفاً با اپی‌کتچین $800 \mu\text{g/mL}$ مواجهه داشتند در مقایسه با سلول‌هایی که صرفاً سایپرمتترین دریافت کردند، افزایش یافت ($P < 0.001$) (نمودار ۱).
بررسی اثرات اپی‌کتچین بر ژنوتوکسیسیته ناشی از سایپرمتترین در رده سلولی PC-۱۲: در تعداد میکرونوکلئوس‌های گروهی که صرفاً با سایپرمتترین (در غلظت

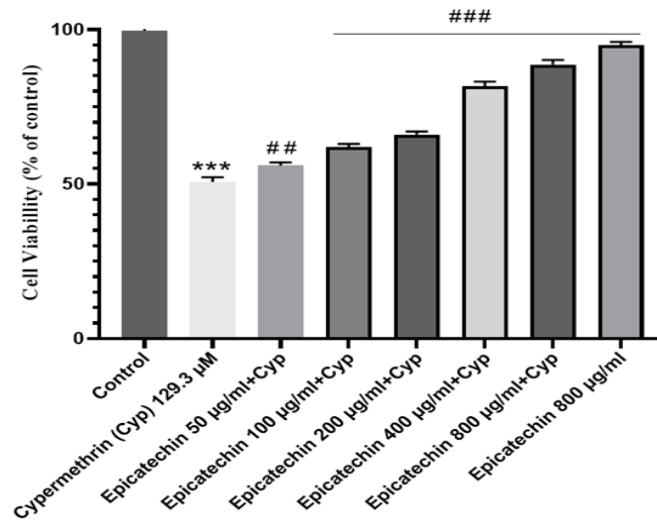
بررسی تاثیر اپی‌کتچین بر میزان ROS تولید شده رده ی سلولی PC-۱۲ مواجهه یافته با سایپرمتترین: در مقدار رادیکال‌های فعال اکسیژن تولید شده گروهی که صرفاً با سایپرمتترین (در غلظت IC_{50}) مواجهه داشتند در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری مشاهده شد ($P < 0.001$). درصد رادیکال‌های فعال اکسیژن تولید شده گروهی که اپی‌کتچین را در غلظت $50 \mu\text{g/mL}$ دریافت کردند، در مقایسه با گروهی که صرفاً سایپرمتترین دریافت کردند کاهش معناداری مشاهده نشد ($P < 0.05$). درصد رادیکال‌های فعال اکسیژن در گروه‌هایی که اپی‌کتچین را در غلظت‌های $100 \mu\text{g/mL}$ و $400 \mu\text{g/mL}$ دریافت کردند کاهش یافت ($P < 0.05$) برای درصد اول و $P < 0.001$ برای ۳ درصد بعدی) درصد رادیکال‌های فعال اکسیژن با افزایش غلظت اپی‌کتچین کاهش یافت (نمودار ۳).

بررسی تاثیر اپی‌کتچین بر میزان گلوتاتیون احیا شده رده سلولی PC-۱۲
مواجهه یافته با سایپرمتترین: در مقدار GSH گروهی که صرفاً با سایپرمتترین (در غلظت IC_{50}) مواجهه داشتند.

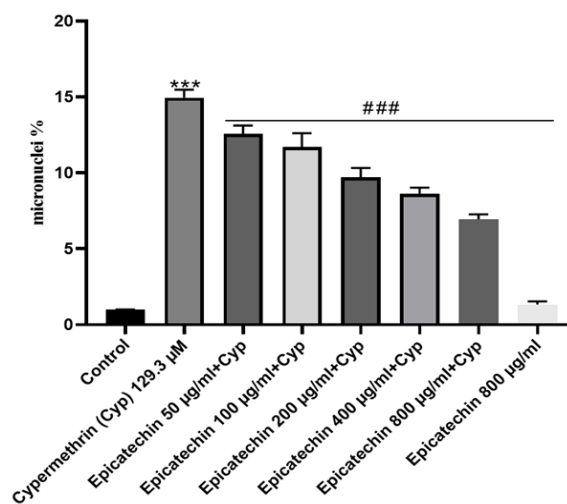
در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری مشاهده شد ($P < 0.001$). سطح GSH سلول‌هایی که اپی‌کتچین $50 \mu\text{g/mL}$ دریافت کردند نسبت به سلول‌هایی که صرفاً با سایپرمتترین مواجهه یافتند، افزایش معناداری نداشت ($P < 0.05$). اما در

سایپرمترین دریافت کردند افزایش معناداری مشاهده شد ($P < 0.001$). سطح GSH سلول‌ها با افزایش غلظت اپی‌کتچین افزایش یافت (نمودار ۴).

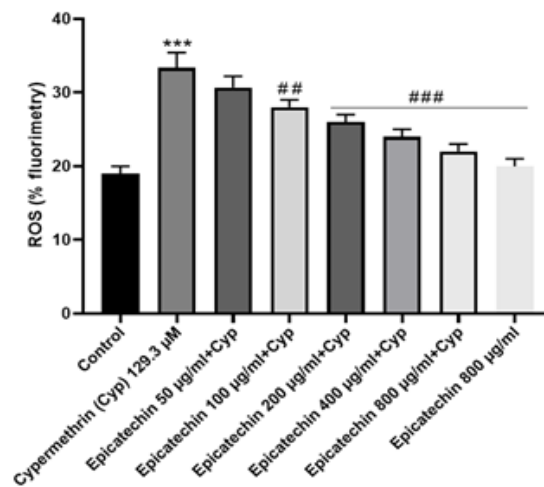
مقدار GSH تولید شده سلول‌هایی که اپی‌کتچین را در غلظت‌های $100 \mu\text{g/mL}$ و $200 \mu\text{g/mL}$ ، $400 \mu\text{g/mL}$ و $800 \mu\text{g/mL}$ دریافت کردند، در مقایسه با گروهی که صرفاً



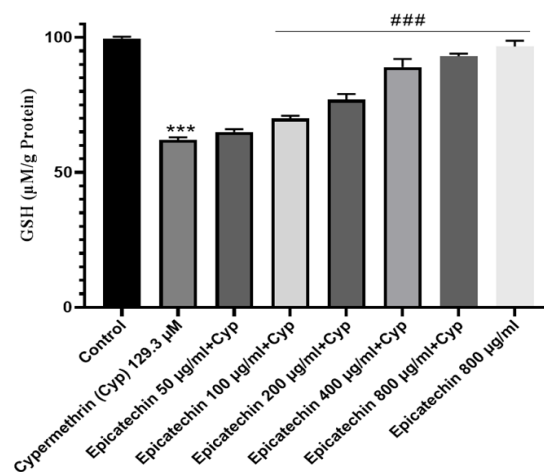
نمودار ۱: نمودار تاثیر اپی‌کتچین بر زنده مانی رده سلولی PC-12 مواجهه یافته با سایپرمترین



نمودار ۲: بررسی تاثیر اپی‌کتچین بر ژنوتوکسیسیته در رده سلولی PC-12 مواجهه یافته با سایپرمترین



نمودار ۳: تاثیر اپی کتچین بر میزان ROS تولید شده رده سلولی PC-12 مواجهه یافته با سایپرمتترین



نمودار ۴: تاثیر اپی کتچین بر میزان گلوتاتیون احیا شده رده سلولی PC-12 مواجهه یافته با سایپرمتترین

کاربردهای بالقوه آن در پیشگیری و مدیریت بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو، از جمله بیماری‌های قلبی عروقی، اختلالات عصبی و برخی سرطان‌ها، متمرکز بوده است (۱۹). در مطالعه حاضر اپی کتچین توانست در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توانست زنده‌مانی سلول‌ها را به‌طور معنی‌داری افزایش و تعداد میکرونوکلئوس‌ها را کاهش دهد. اما در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نتوانست سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن را به‌طور معنی‌داری کاهش و گلوتاتیون را افزایش دهد. اما غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰

بحث

اپی کتچین، فلاونوئیدی است که به‌طور معمول در کاکائو، چای سبز و برخی میوه‌ها یافت می‌شود و به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی قوی خود توجه زیادی را در پژوهش‌ها به خود جلب کرده است. طی دو دهه گذشته، مطالعات بسیاری به بررسی مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی اپی کتچین و مشتقات آن پرداخته‌اند و توانایی آن‌ها در پاکسازی رادیکال‌های آزاد، کاهش استرس اکسیداتیو، و محافظت از ساختارهای سلولی در برابر آسیب‌ها را بررسی کرده‌اند. تحقیقات عمدتاً بر درک

۴۰۰، ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توانستند به‌طور معنی‌داری باعث بهبود پارامترهای یاد شده شد. در اینجا تعدادی از مطالعات پیشین را بررسی می‌کنیم تا به یک دیدگاه جامع از یافته‌های مطالعات کلیدی درباره خواص آنتی‌اکسیدانی اپی‌کتچین و مشتقات آن برسیم. بر اساس نتیجه مطالعه علی‌کیانی و همکاران در سال ۲۰۲۱ اپی‌کتچین (در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث کاهش مالون دی‌آلدهید، و افزایش کاتالاز، GSH، گلوتاتیون-اس-ترنسفراز، نیتریک اکسید سنتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در بافت کبد موش های بزرگ آزمایشگاهی القای سمیت شده با کربن تتراکلرید شد (همسو با نتایج مطالعه) (۲۰). Keller و همکاران در سال ۲۰۲۰ در یک مطالعه تاثیر (-) اپی‌کتچین را بر رده سلولی HUVEC تیمار شده با گلوکز با غلظت بالا و یا آنتی‌مایسین A که یک ترکیب مختل‌کننده میتوکندری است بررسی کردند نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اپی‌کتچین در غلظت ۱ میکرومولار به‌طور قابل توجهی رادیکال سوپراکسید میتوکندری را در سلول‌های تیمار شده با تیمار شده با گلوکز با غلظت بالا کاهش داد. در غلظت ۱ میکرومولار، اپی‌کتچین به‌طور غیر قابل توجهی تنفس میتوکندری را افزایش داد. اپی‌کتچین به‌طور قابل توجهی بیان کمپلکس I را در سلول‌های تیمار شده با آنتی‌مایسین A افزایش داد. اما هیچ اثر قابل توجهی بر روی بیان AMPK یا نیتریک اکسید سنتاز اپیتلیال نداشت (همسو با نتایج مطالعه) (۲۱). شریعتی و همکاران در سال ۲۰۲۴ در یک مطالعه به بررسی اثرات نوروپروتکتیو اپی‌کتچین پرداختند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که آرسنیک باعث نوروٹوکسیسته شد که با افزایش نیتریک اکسید، مالون دی‌آلدهید، رادیکال‌های آزاد اکسیژن، و کاهش سوپراکسید دسموتاز، و کاتالاز بافت مغز رت‌ها همراه بود. تمامی این عوارض در اثر مصرف اپی‌کتچین معکوس شدند (همسو با نتایج مطالعه) (۲۲). Cilleros و همکاران در سال ۲۰۲۴ در یک مطالعه به بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی متابولیت ۳،۲-دی‌هیدروبنزوئیک اسید که یک متابولیت اپی‌کتچین است که در بخش کولون دستگاه گوارش توسط باکتری‌های فلورنرمال تولید می‌شود، پرداختند. این

مطالعه در محیط برون‌تن بر روی رده سلولی توبولار موش (NRK-52E) انجام شد. نتایج نشان داد که متابولیت حاصل از اپی‌کتچین باعث افزایش زنده مانی سلولی و کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن شد (همسو با نتایج مطالعه) (۲۳). تیان و همکاران در سال ۲۰۲۱ در یک مطالعه تاثیرات اپی‌کتچین را در یک مدل سلولی القای استرس اکسیداتیو شده با استفاده از عصاره دود سیگار بررسی کردند. در این مطالعه رده سلولی BEAS-2b استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اپی‌کتچین باعث کاهش رادیکال آزاد اکسیژن درون سلولی و مالون دی‌آلدهید افزایش زنده مانی سلولی شد (همسو با نتایج مطالعه) (۲۴). آزادنسب و همکاران در سال ۲۰۲۱ اثرات محافظتی اپی‌کتچین را در برابر سمیت کبدی ناشی از متوترکسات در موش‌ها بررسی کردند. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که تیمار با اپی‌کتچین باعث کاهش نشانگرهای استرس اکسیداتیو، سیتوکین‌های التهابی و آسیب کبدی شد و سطح آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی مانند گلوتاتیون و کاتالاز را بهبود بخشید (همسو با نتایج مطالعه) (۲۵). ژائو و همکاران در سال ۲۰۲۰ فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی شش فلاونوئید، از جمله اپی‌کتچین، از گیاه *Smilax glabra* را بررسی کردند. فعالیت‌های مهار رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کاهش تولید سیتوکین‌های التهابی در سلول‌های RAW264.7 مواجهه یافته با لیپوپولی‌ساکراید اندازه‌گیری شد. اپی‌کتچین به‌طور قابل توجهی استرس اکسیداتیو و التهاب را کاهش داد و اثرات حفاظتی خود را تأیید کرد (همسو با نتایج مطالعه) (۲۶). Cheng و همکاران در سال ۲۰۲۴ در یک مطالعه به بررسی اثرات اپی‌کتچین بر روی اختلال شناختی ناشی از سرب پرداختند. برای این کار سرب به‌صورت خوراکی با دوز 20 mg/kg به رت‌ها داده شد و بعد از ۲ ساعت با اپی‌کتچین با دوز 50 mg/kg به‌صورت خوراکی تیمار شدند. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که اپی‌کتچین باعث افزایش سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، و گلوتاتیون پراکسیداز در بافت مغز رت‌ها شد (همسو با نتایج مطالعه) (۲۷). شکرزاده و همکاران در سال ۲۰۲۳ در یک مطالعه به بررسی اثر حفاظتی

تعداد میکرونوکلیئوس که مربوط به زوتوکسیسته می‌باشد را در رده سلولی pc-12 بهبود بخشید. شناخت دقیق مکانیسم اثر اپی‌کتچین در پیشگیری از اثرات استرس اکسیداتیو نیاز به مطالعات گسترده‌تری دارد که با توجه به نوع مطالعه نیازمند مطالعات سلولی و حیوانی بیشتری می‌باشد.

سپاس‌گزاری

این مطالعه حاصل پایان‌نامه دوره دکتری عمومی داروسازی خانم نگار آذری‌نژاد با واحد بین‌الملل مازندران بود که منابع مالی آن توسط دانشگاه تامین شده است و بدین‌وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

حامی مالی: واحد بین‌الملل دانشگاه مازندران - رامسر
تعارض در منافع: وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

پایان‌نامه دانشجوی داروسازی در پردیس بین‌الملل دانشگاه (رامسر) می‌باشد. (کد اخلاق: IR.IAU.B.REC.1401.030).

مشارکت نویسندگان

محمد شکرزاده در ارائه ایده، الهه غره‌خانی و محبوبه رحمتی در طراحی مطالعه، نگار آذری‌نژاد، در جمع‌آوری داده‌ها، نگار آذری‌نژاد، الهه قره‌خانی، محبوبه رحمتی، محمد شکرزاده در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

اپی‌کتچین بر زنده‌مانی سلول عصبی ۱۲ PC مواجه شده با داروی والپروئیک اسید پرداختند. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که اپی‌کتچین در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از طریق کاهش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی باعث اعمال اثرات آنتی‌اکسیدانی در مقابل استرس اکسیداتیو القا شده توسط والپروئیک اسید شد (همسو با نتایج مطالعه) (۲۸). Song و همکاران در سال ۲۰۲۴ با هدف بررسی تاثیر اپی‌کتچین بر مقاومت به انسولین القا شده با پالمیتات بررسی پارامترهای استرس اکسیداتیو در رده سلولی C2C12 یک مطالعه انجام دادند. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که اپی‌کتچین باعث افزایش سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، و گلوکوتایون و کاهش مالون دی‌آلدهید و کاهش آپوپتوز شد (همسو با نتایج مطالعه) (۲۹). Wnuk و همکاران در سال ۲۰۲۴ در یک مطالعه به بررسی تاثیر متابولیت اپی‌کتچین گالاکتوگالات (در غلظت‌های فیزیولوژیک) بر استرس اکسیداتیو القا شده توسط کادمیوم کلراید در رده سلولی CHO-K1 پرداختند. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که اپی‌کتچین گالاکتوگالات باعث کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن، افزایش مقدار ATP، افزایش ماتریکس متالوپروتئیناز، و کاهش آپوپتوز شد (همسو با نتایج مطالعه) (۳۰).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد که اپی‌کتچین در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکرومولار می‌تواند پارامترهای استرس اکسیداتیو، مانند میزان گلوکوتایون احیا شده، میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، زنده‌مانی سلولی و پارامتر

References:

1-Picca A, Calvani R, Coelho-Junior HJ, Landi F, Bernabei R, Marzetti E. *Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Neuroinflammation: Intertwined Roads of Neurodegeneration*. Antioxidants 2020; 9(8): 647.

2-Wang J-Y, Wen L-L, Huang Y-N, Chen Y-T, Ku M-C. *Dual Effects of Antioxidants In Neurodegeneration: Direct Neuroprotection Against Oxidative Stress and Indirect Protection Via Suppression of Gliamediated Inflammation*. Curr Pharm Des 2006; 12(27): 3521-33.

- 3-Neves Carvalho A, Firuzi O, Joao Gama M, van Horsen J, Saso L. *Oxidative Stress and Antioxidants in Neurological Diseases: Is There Still Hope?* Current Drug Targets 2017; 18(6): 705-18.
- 4-Van Muiswinkel FL, Kuiperij HB. *The Nrf2-ARE Signalling Pathway: Promising Drug Target to Combat Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders.* Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 2005; 4(3): 267-81.
- 5-Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. *Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids.* Free Radic Biol Med 1996; 20(7): 933-56.
- 6-Heijnen C, Haenen G, Van Acker F, Van der Vijgh W, Bast A. *Flavonoids as Peroxynitrite Scavengers: the Role of the Hydroxyl Groups.* Toxicol in vitro 2001; 15(1): 3-6.
- 7-Shah ZA, Li R-c, Ahmad AS, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S, et al. *The Flavanol (-)-Epicatechin Prevents Stroke Damage Through The Nrf2/HO1 Pathway.* J Cereb Blood Flow & Metabolism 2010; 30(12): 1951-61.
- 8-Daussin FN, Heyman E, Burelle Y. *Effects of (-)-Epicatechin on Mitochondria.* Nutrition Reviews 2020; 79(1): 25-41.
- 9-Spencer Jp, Schroeter H, Kuhnle G, Srai Sks, Tyrrell Rm, Hahn U, et al. *Epicatechin and Its in Vivo Metabolite, 3'-O-Methyl Epicatechin, Protect Human Fibroblasts from Oxidative-Stress-Induced Cell Death Involving Caspase-3 Activation.* Biochem J 2001; 354(3): 493-500.
- 10-Yokozawa T, Rhyu DY, Cho EJ, Aoyagi K. *Protective Activity of (-)-Epicatechin 3-O-Gallate Against Peroxynitrite-Mediated Renal Damage.* Free Radical Research 2003; 37(5): 561-71.
- 11-Ottaviani JI, Momma TY, Kuhnle GK, Keen CL, Schroeter H. *Structurally Related (-)-Epicatechin Metabolites in Humans: Assessment Using De Novo Chemically Synthesized Authentic Standards.* Free Radical Biology and Medicine 2012; 52(8): 1403-12.
- 12-Traber MG, Stevens JF. *Vitamins C and E: Beneficial Effects from a Mechanistic Perspective.* Free Radical Biology and Medicine 2011; 51(5): 1000-13.
- 13-Frei B, Birlouez-Aragon I, Lykkesfeldt J. *Authors' Perspective: What Is the Optimum Intake of Vitamin C in Humans?* Crit Rev Food Sci Nutr 2012; 52(9): 815-29.
- 14-Scholey A, Owen L. *Effects of Chocolate on Cognitive Function and Mood: A Systematic Review.* Nutrition reviews 2013; 71(10): 665-81.
- 15-Schroeter H, Heiss C, Spencer JP, Keen CL, Lupton JR, Schmitz HH. *Recommending Flavanols and Procyanidins for Cardiovascular Health: Current Knowledge and Future Needs.* Mol Aspects of Med 2010; 31(6): 546-57.
- 16-Mosmann T. *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.* J Immunol Methods 1983; 65(1-2): 55-63.
- 17-Fenech M. *The in Vitro Micronucleus Technique.* Mutat Res 2000; 455(1-2): 81-95.
- 18-Sadegh C, Schreck RP. *The Spectroscopic Determination of Aqueous Sulfite Using Ellman's Reagent.* MURJ 2003; 8: 39-43.
- 19- Qu Z, Liu A, Li P, Liu C, Xiao W, Huang J, et al. *Advances in Physiological Functions and*

- Mechanisms of (-)-Epicatechin*. Crit Rev Food Sci Nutr 2021; 61(2): 211-33.
- 20- Alkinani KB, Ali EMM, Al-Shaikh TM, Awlia Khan JA, Al-naomasi TM, Ali SS, et al. *Hepatoprotective Effects of (-) Epicatechin in Ccl4-Induced Toxicity Model are Mediated Via Modulation of Oxidative Stress Markers In Rats*. Evid Based Complement Alternat Med 2021; 2021: 4655150.
- 21- Keller A, Hull SE, Elajaili H, Johnston A, Knaub LA, Chun JH, et al. *(-)-Epicatechin Modulates Mitochondrial Redox in Vascular Cell Models of Oxidative Stress*. Oxid Med Cell Longev 2020; 2020: 6392629.
- 22- Shariati S, Khodayar MJ, Azadnasab R, Nooshabadi MR, Nikravesh M, Khorsandi L, et al. *Epicatechin as a Promising Agent Against Arsenic-Induced Neurobehavioral Toxicity in NMRI Mice: Behavioral and Biochemical Alterations*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2024; 397(12): 10143-153.
- 23- Cilleros DÁ, López-Oliva ME, Martín MÁ, Ramos S. *(-)-Epicatechin and the Colonic Metabolite 2, 3-Dihydroxybenzoic Acid Protect Against High Glucose and Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Renal Proximal Tubular Cells through NOX-4/P38 Signalling*. Food Funct 2020; 11(10): 8811-24.
- 24- Tian X, Xue Y, Xie G, Zhou Y, Xiao H, Ding F, et al. *(-)-Epicatechin Ameliorates Cigarette Smoke-Induced Lung Inflammation Via Inhibiting Ros/Nlrp3 Inflammasome Pathway in Rats with Copd*. Toxicology and Applied Pharmacology 2021; 429: 115674.
- 25- Azadnasab R, Kalantar H, Khorsandi L, Kalantari H, Khodayar MJ. *Epicatechin Ameliorative Effects on Methotrexate-Induced Hepatotoxicity in Mice*. Hum Exp Toxicol 2021; 40(12_suppl): S603-S610.
- 26- Zhao X, Chen R, Shi Y, Zhang X, Tian C, Xia D. *Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Six Flavonoids from Smilax Glabra Roxb*. Molecules 2020; 25(22): 5295.
- 27- Cheng D, Yu Q, Zhu K, Bu D, Wu Z. *Epicatechin Attenuates Lead (Pb)-Induced Cognitive Impairment in Mice: Regulation on Nrf2 Signaling Pathway, and Interference on the Interaction Between Pb with Albumin*. Food Science and Human Wellness 2024; 13(2): 1065-78.
- 28- Shokrzadeh M, Mohammad pour A, Tajik Z, Alizadeh M, Aghajanshakeri S. *Protective Effect of Epicatechin on Survival of PC12 Neurons Exposed to Valproic Acid*. J-Mazand-Univ-Med-Sci 2023; 33(220): 31-42. [Persian]
- 29- Song L, Huang K, Tian D, Liu X, Huang R, Luo J, et al. *Epicatechin Ameliorates Palmitate-Induced Insulin Resistance in C2C12 Myogenic Cells by Alleviating Oxidative Stress and Activating the AMPK/ACC Pathway*. CyTA - Journal of Food 2024; 22(1): 2401591.
- 30- Wnuk E, Zwolak I, Kochanowicz E. *The Physiological Levels of Epigallocatechin Gallate (EGCG) Enhance the Cd-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in CHO-K1 Cells*. Sci Rep 2024; 14(1): 13625.

Investigating the Effects of Epicatechin on Cypermethrin-Induced Oxidative Stress and Genotoxicity on PC-12 Cell Line

Negar Azarinegad¹, Elahe Gharekhani², Mahboube Rahmati², Mohammad Shokrzadeh^{*3}

Original Article

Introduction: Epicatechin is recognized as a novel and potent antioxidant with significant potential for the treatment of neurological diseases. However, prior to its clinical application, any a pharmacological compound must first be evaluated through preclinical research. Considering the above, we decided to investigate the effects of epicatechin on oxidative stress and genotoxicity induced by cypermethrin in the PC-12 cell line.

Methods: In this study, PC-12 cell line was pretreated with different concentrations of epicatechin (50, 100, 200, 400, and 800 µg/ml), followed by exposure to cypermethrin (129.3 µM) to induced cytotoxicity. Subsequently, several parameters, including micronuclei number, oxygen free radicals, cell viability, and glutathione level were measured.

Results: In the present study, epicatechin was able to significantly reduce the number of micronuclei and increase cell viability at concentrations of 50, 100, 200, 400, and 800 µg/mL. However, at the lowest concentration (50 µg/mL), it did not significantly increase glutathione levels or reduce the level of oxygen free radicals. In contrast, concentrations of 100, 200, 400, and 800 µg/mL significantly improved the aforementioned parameters.

Conclusion: In general, it seems that epicatechin at different concentrations can improve oxidative stress and xenotoxicity parameters in the PC-12 cell line.

Keywords: Epicchin, Oxidative stress, Genotoxicity, Cypermethrine.

Citation: Azarinegad N, Gharekhani E, Rahmati M, Shokrzadeh M. **Investigating the Effects of Epicatechin on Cypermethrin-Induced Oxidative Stress and Genotoxicity on PC-12 Cell Line** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2026; 34(1): 9830-40.

1 Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran.

2Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

3Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

*Corresponding author: Tel: 09111263448, email: mslamuk@yahoo.com