بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی برگ کرفس کوهی بر ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن *BMP7* در بافت چربی سفید رت

فاطمه هاشمی شهرکی[۱]، کیهان قطره سامانی[۲]*، نوشا ضیاء جهرمی[۳]، اکرم یعقوبی[۴]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲-دانشیار، مرکز تحقیقات بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳-استادیار گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴-کارشناسی ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی ومولکولی ،دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
* آدرس مکاتبه: شهرکرد، رحمتیه، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوشیمی
تلفن: ۳۳۴۶۶۹۲ (۰۳۸۱)، نمابر: ۳۳۳۰۷۰۹ (۰۳۸۱)
پست الکترونیک: kgsamani@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱۵ **تاریخ تصویب:** ۹۶/۷/۲

چکیده

مقدمه: چاقی در حال حاضر یکی از مشکلات عمده در سراسر جهان است. کرفس کوهی گیاهی است که تأثیر آن بر لاغری گزارش شده است.

هدف: هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر عصاره کرفس کوهی بر سطح آنتی‌اکسیدانی پلاسما و تغییر بیان ژن *BMP7* در سلول-های چربی سفید در رت است.

روش بررسی: هشتاد سر رت نر از نژاد ویستار به دو گروه ۴۰ تایی A و B و هر گروه به چهار زیر گروه ده تایی تقسیم شدند. گروه A برای کنترل جلو گیری از چاقی (پیشگیری) و گروه B برای بررسی کاهش چاقی استفاده شد. پس از مداخله، بافت چربی سفید جهت اندازه‌گیری بیان ژن *BMP7*، کبد جهت بررسی آنزیم کاتالاز و خون برای تعیین ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و پاراکسوناز ۱ گرفته شد.

نتایج: عصاره کرفس کوهی بر خلاف انتظار ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی را در هر دو گروه کاهش داده است ولی باعث کاهش وزن در زیرگروه دریافت‌کننده عصاره در گروه پیشگیری شده است. این عصاره میزان فعالیت آنزیم پاراکسوناز ۱ سرم در زیرگروه دریافت کننده نسبت به زیرگروه رژیم غذایی پرچرب را کاهش (P= ۰/۰۱۱) و آنزیم کاتالاز را در کبد افزایش داده است (P= ۰/۰۰۲). عصاره هیدروالکلی کرفس کوهی در زیرگروه دریافت‌کننده از گروه پیشگیری نسبت به زیرگروه کنترل چرب، میزان بیان ژن *BMP7* (P= ۰/۰۱۲) را افزایش داده است.

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی کرفس کوهی در مرحله پیشگیری از چاقی نقش مؤثری بر جلوگیری از افزایش وزن و همچنین افزایش فعالیت کاتالاز کبد دارد و با افزایش بیان ژن BMP7 احتمالاً باعث قهوه‌ای شدن بافت چربی سفید می‌شود. باید درنظر داشت مصرف عصاره این گیاه با کاهش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم احتمالاً استرس اکسیداتیو را تشدید می‌کند.

گل‌واژگان: کرفس کوهی، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی، بافت چربی سفید، ژن BMP7

مقدمه

چاقی در همه کشورهای جهان از جمله کشور ما به عنوان مستعدکننده و افزایش‌دهنده احتمال بیماری دیابت و یا بیماری قلبی- عروقی شناخته می‌شود این بیماری با افزایش بیش از حد چربی سفید در بافت‌های بدن مشخص می‌شود [۱]. در دو دهه اخیر و با توجه به پیشرفت‌های گسترده علمی، شناخت بیشتری نسبت به عوامل مرتبط با چاقی شامل شناسایی جهش-های ژنی مؤثر بر چاقی و نقش فاکتورهای متابولیکی بر بروز چاقی به دست آمده است [۲]. به کارگیری گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها از دوران باستان مورد توجه بوده و امروزه با در دسترس بودن گیاهان دارویی و استفاده آسان از آنها تمایل مردم به مصرف گیاهان دارویی افزایش یافته است [۳]. کرفس کوهی با نام علمی *Kelussia odoratissima Mozaff* جنبه دارویی و غذایی دارد، مختص برخی مراتع ایران است و تاکنون وجود این گونه در سایر مناطق در سطح جهان گزارش نشده است. کرفس کوهی حاوی ویتامین C بوده و اثر تصفیه‌کننده خون، ضدرماتیسم، ضدنقرس، ضدعفونی‌کنندگی و لاغرکننده است در ضمن کافئیک اسید موجود در گیاه احتمالاً خواص آنتی‌اکسیدانی دارد و افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های تحت رژیم کرفس کوهی گزارش شده است [۴]. عصاره الکلی کرفس کوهی حاوی مقدار قابل توجه از فلاونوئید (۱۲/۲ mg/g) و پلی فنول (۱۰۲ mg/g) است [۵].

پستانداران دارای دو نوع بافت چربی،سفید و چربی قهوه-ای می‌باشند (WAT and BAT) که عملکردهای متفاوتی در متابولیسم انرژی در بدن دارند [۶]. چربی سفید محل ذخیره تری گلیسریدها می‌باشد که به عنوان ذخیره انرژی بدن به شمار می‌رود [۷] و سلول‌های چربی قهوه‌ای، سلول‌هایی با میتوکندری فراوان‌اند و یک کارخانه به اصطلاح مجهز و منحصر به فرد برای بیان پروتئین (UCP1) باشد که با تغییر شیب انتشار پروتون در غشای داخلی میتوکندری باعث جدایی واکنش فسفوریلاسیون از اکسیداسیون می‌شود و با این عمل باعث تولید گرما به جای آدنوزین تری فسفات (ATP) می شود [۸]. قسمت اصلی ذخیره‌سازی انرژی در بافت چربی سفید می‌باشد اما بافت چربی قهوه‌ای باعث مصرف انرژی پایه و همچنین القاء گرما به واسطه بیان اختصاصی پروتئین (UCP1) می‌شود [۹]. ژن *BMP7* باعث القاء بافت چربی سفید به چربی قهوه‌ای و تولید بیشتر گرما به جای تولید ATP در بدن از انرژی ذخیره شده در بافت چربی سفید می‌شود [۱۰] با توجه به این که سلول‌های چربی سفید می‌توانند ویژگی سلول‌های چربی قهوه‌ای را به دست آورند درنتیجه می توانند باعث افزایش بافتی شبیه به بافت چربی قهوه‌ای در انسان شوند [۱۱]. بنابر این انتظار می‌رود با افزایش بیان ژن *BMP7* بتوان به درمان چاقی کمک کرد. هدف ما در این مطالعه بررسی تأثیر عصاره کرفس کوهی بر پروفایل لیپیدی، آنزیم‌های کاتالازکبدی و پاراکسوناز ۱ سرم و همچنین تأثیر آن بر بیان ژن *BMP7* در بافت چربی سفید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کرفس کوهی از کوه‌های شهرستان کوهرنگ جمع‌آوری و برگ آن در سایه خشک شد پس از تأیید محققین گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد (Herb No:Skums.144)، به میزان یک کیلوگرم به طور کامل پودر شد و در یک لیتر اتانول۷۰ درصد به مدت یک هفته حل شد. در طی این مدت روزانه چندین بار محتویات ظرف را تکان داده تا عصاره به طور کامل با الکل مخلوط شود. بعد مخلوط را از کاغذ صافی واتمن عبور داده و عصاره جمع شده گیاه به دستگاه تقطیر با خلاء منتقل شد.

تقطیر در خلاء در حرارت پائین در دستگاهی به نام Rotary operator انجام شد و عصاره تغلیظ شده داخل شیشه ساعت منتقل شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته قرار گرفت تا حلال تبخیر شود.

در این پژوهش تجربی از ۸۰ سر موش ویستار نر ۶ هفته ای خریداری شده از انستیتو پاستور ایران با محدوده وزنی ۱۴۰-۱۲۰ گرم استفاده شد. جهت ایجاد تطابق با محیط موش های خریداری شده در محل حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد با رعایت دمای ۲۷-۲۱ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. یک هفته بعد وزن کلیه موش‌ها اندازه‌گیری شد و به

صورت تصادفی به دو گروه ۴۰ تایی A (پیشگیری) و B (درمان) و هر گروه به ۴ زیرگروه ۱۰ عددی تقسیم شدند.

زیر گروه A1 به عنوان کنترل بوده و غذای معمولی دریافت کرده و A2 دریافت‌کننده رژیم پر چرب شامل ۲۰ درصد کربوهیدرات، ۱۰ درصد کلسترول، ۳۰ درصد چربی اشباع و ۵۰ درصد غذای معمولی و A3 mg/kg ۴۰۰ داروی متفورمین به همراه رژیم پرچرب و A4 رژیم پرچرب به همراه mg/kg ۲۰۰ عصاره هیدروالکلی کرفس کوهی دریافت کردند. در گروه B: پس از دریافت چهار هفته رژیم پرچرب، به این ترتیب گروه‌بندی شدند: زیر گروه B1 غذای معمولی از ابتدای مطالعه تا انتهای مطالعه دریافت (۱۰ هفته) و B2 دریافت‌کننده رژیم معمولی به مدت ۶ هفته بعد از دوره ۴ هفته‌ای رژیم پرچرب. B3 دریافت کننده رژیم معمولی به همراه متفورمین به مدت ۶ هفته بعد از دوره ۴ هفته‌ای رژیم پرچرب و گروه B4 دریافت‌کننده رژیم معمولی به همراه mg/kg ۲۰۰ عصاره هیدروالکلی کرفس کوهی به مدت ۶ هفته بعد از دوره ۴ هفته-ای رژیم پرچرب می‌باشند. عصاره‌ها از طریق گاواژ به موش‌ها داده شد و گروه‌های کنترل آب مقطر دریافت می‌کردند.

حیوانات تحت بیهوشی با کلروفورم قرار گرفتند و سپس خونگیری از قلب انجام و نمونه‌های خونی به دست آمده در هر مورد به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند تا سرم از لخته جدا شود بعد از جداسازی نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا انجام آزمایشات منجمد و نگهداری شدند.

در هر گروه از موش‌ها بافت چربی سفید احشایی جهت اندازه‌گیری بیان ژن از بدن موش خارج شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج RNA و سنتز cDNA مطابق پروتکل استاندارد شرکت‌های سازنده کیت انجام شد و بیان ژن BMP7 بااستفاده از تکنیک Real time _ PCR با دستگاه (Austria --Rotor_ gene Q) در مقابل ژن بتا اکتین با روش ($2^{(-\Delta\Delta cT)}$) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی µl ۱۰ شامل ۱ میکرولیتر آغازگر جلویی (Forward primer)، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشتی (reverse primer)، ۵ میکرولیتر cyber green، ۲ میکرولیتر آب nuclease free و ۱ میکرولیتر cDNA به صورت واکنش دوتایی duplicate صورت گرفت.

همچنین از هر موش مقداری از بافت کبد جهت بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز جدا شد و تا زمان انجام آزمایش در۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان فعالیت کاتالاز طبق روش Abei انجام شد [۱۲].

آنزیم‌های کبدی و پروفایل لیپیدی در سرم با استفاده از کیت‌های تجاری (شرکت پارس آزمون) و دستگاه آتوآنالیزور (ایتالیا ,BT3000) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری ظرفیت توتال آنتی‌اکسیدانی بر اساس روش FRAP و با استفاده از ترکیب تری پیریدیل تری آزین (sigma Aldrich-2,4,6_Tripyridyl s triazine) انجام گرفت و غلظت نمونه برحسب µm/l محاسبه شد فعالیت آریل استرازی پاراکسوناز ۱ با استفاده از فنیل استات (Sigma, Aldrich) سوبسترای سنتتیک آنزیم پاراکسوناز اندازه‌گیری شد [۱۳].

تجزیه و تحلیل آماری

پس از انجام آزمایش‌ها، نتایج مربوط به بیان ژن BMP7 در نرم‌افزار Excel وارد شده و محاسبه تغییرات بیان ژن در گروه مداخله به کنترل محاسبه شد [۱۴] و نمودارها با نرم افزار Graph pad Prism رسم شد. سایر متغییرها در بین گروه‌های کنترل و تیمار با نرم‌افزار SPSS با آزمون ANOVA مورد بررسی قرار گرفتند. اختلاف بین دو گروه با آزمون آماری Mann-Whitney آنالیز و تفسیر شد. اختلاف بین داده ها در صورتی معنی‌دار در نظر گرفته شد که P≤۰/۰۵ باشد.

نتایج

در گروه پیشگیری (A)، متفورمین و عصاره کرفس کوهی میزان وزن را نسبت به زیر گروه کنترل چرب کاهش داده‌اند. عصاره کرفس کوهی نسبت به زیرگروه دریافت‌کننده متفورمین کاهش وزن بیشتری ایجاد (P = ۰/۰۳۱) کرده است. در گروه درمان (B) تغییرات معنی‌داری در وزن مشاهده نشد (جدول شماره ۱).

در این مطالعه در گروه پیشگیری، عصاره کرفس کوهی برخلاف انتظار میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) را کاهش داده است اما متفورمین، TAC را تا حدودی افزایش داده است. در گروه درمان تغییرات قابل توجه در ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی مشاهده نشد. عصاره کرفس کوهی میزان آنزیم کاتالاز را در هر دو گروه پیشگیری و درمان افزایش داده است این در حالی است که در گروه پیشگیری، عصاره میزان آنزیم پاراکسوناز ۱ (PON1) را نسبت به زیرگروه کنترل چرب کاهش داده ولی متفورمین میزان این آنزیم آنتی‌اکسیدان را افزایش داده است (جدول شماره ۱).

عصاره کرفس کوهی در هر دو گروه پیشگیری و درمان در میزان گلوکز تغییری ایجاد نکرده است. تغییرات گلوکز در زیرگروه‌های دریافت‌کننده متفورمین طبق انتظار دیده می‌شود.

با مقایسه میانگین، گلوتامیک اگزالواستیک ترانس آمیناز (sGOT) و گلوتامیک پیروویک ترانس آمیناز (sGPT) در گروه پیشگیری، عصاره کرفس کوهی و متفورمین تنها میزان sGPT را نسبت به کنترل چرب کاهش داده‌اند. آلکالن فسفاتاز (ALP) در گروه دریافت‌کننده عصاره از گروه درمان نیز افزایش نشان می‌دهد (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱- میانگین متغیرهای مورد بررسی

فاکتور / زیرگروه	Weight	TAC	CAT	PON1	GLU
A1	۲۸۴/۱۰±۲۳/۳۰	۸۰۶/۷۰±۲۵۳/۸۱	۶/۸۱۶±۳/۱۰۹	۱۸۰۳/۴±۵۹۲/۶۹	۱۸۰±۴۰/۱
A2	۲۹۷/۶۰±۲۹/۸۶**	۹۱۸/۶۰±۲۳۸/۴۸**	۴/۵۵±۰/۹۱۵**	۳۰۳۳/۱۷±۱۰۳۰/۰۱**	۲۲۷/۴±۲۵/۳۰
A3	۲۷۱/۱۱±۲۸/۳۶	۹۹۱/۶۲±۷۱/۷۲	۴/۲۱±۳/۴۳	۴۳۶۵/۱۰±۱۵۱۳/۴۵*	۱۹۵±۲۶/۸۴
A4	۲۶۴/۶۰±۲۵/۵۴*	۸۳۱/۸۰±۱۸۶/۷۴*	۸/۸۵±۳/۱۱*	۲۴۲۰/۸۸±۳۰۵۲/۹۰*	۲۲۵±۳۰/۴۱
B1	۲۹۳/۷۰±۴۵/۴۸	۹۷۴/۹۸±۱۹۵/۳۵	۱/۱۲۴±۰/۵۹۵	۲۴۷۳/۲۸±۶۵۶/۵۹	۲۲۴±۷۳/۱
B2	۳۰۸/۱۲±۳۲/۵۵**	۸۰۶/۴۵±۱۱۳/۶۵**	۱/۵۲۷±۰/۸۶۴**	۱۹۰۶/۰۵±۶۸۱/۴۵**	۲۳۷/۸۷±۳۷/۹۷
B3	۲۹۱±۴۲/۸۱	۸۰۳/۸۰±۲۳۸/۴۶	۰/۸۳۹±۰/۴۸۸	۱۹۶۵/۷۸±۶۲۴/۶۷	۲۱۱/۸۸±۹۴/۸۰۹
B4	۲۹۲/۳۰±۲۷/۵۲	۸۹۱/۰۰±۹۲/۹۴	۵/۵۳۲±۱/۹۰۲*	۲۳۲۶/۵۶±۶۹۸/۲۰	۲۵۴/۲۰±۴۶/۴۶۵

گروه (A): زیرگروه‌های دریافت‌کننده عصاره و متفورمین همزمان با رژیم پرچرب (گروه پیشگیری)

گروه (B): زیرگروه‌های دریافت‌کننده عصاره و متفورمین بعد از ۴۵ روز رژیم پرچرب (گروه درمان)

PON1 (پاراکسوناز ۱). TAC (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم)، CAT (کاتالاز) * P< ۰/۰۵ در مقایسه با زیرگروه دوم (دریافت‌کننده رژیم پرچرب) ** P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد

جدول شماره ۲- میانگین پروفایل لیپیدی و آنزیم‌های کبدی

فاکتور / زیرگروه	CHO	TG	HDL	ALP	sGOT	sGPT
A2	۴۳/۳۰±۱۰/۳۰	۱۵۳/۴۴±۴۶/۵۳	۵۴/۱۵±۱۱/۰۷	۶۰۷/۷±۱۵۸/۸۶	۱۳۱/۴۰±۲۹/۶۲	۸۳/۱۰±۲۳/۱۰
A3	۴۸/۷۷±۶/۴۹	۱۶۹±۶۱/۰۴	۵۵/۷۵±۲۳/۷۹	۵۵۱/۴۴±۱۷۹/۴۴	۱۴۰/۴۴±۱۳/۶۳	۵۴/۱۱±۱۲/۸۳*
A4	۳۸/۳±۵/۹۲*	۱۱۲/۹±۴۴/۶۸	۲۷/۴۵±۱۴/۸۰*	۶۲۱/۷۰±۱۴۸/۶۸	۱۱۱/۷۰±۲۷/۸۴	۵۱±۱۵/۳۶*
B2	۵۵/۵۰±۶/۰۹	۱۰۹±۳۶/۱۳	۳۷/۶۱±۵/۷۴	۳۴۹/۳۰±۱۳۶/۷۱	۱۹۷/۷۱±۱۰۰/۳۱	۴۸/۶۲±۲۳/۶۱
B3	۵۶/۵۰±۱۱/۷۶	۸۴/۱۰±۱۶/۱۵	۴۶/۰۲±۱۴/۴۷	۴۲۱±۹۹/۶۱	۱۸۰/۳۰±۸۲/۷۱	۵۵/۹۰±۲۲/۱۴
B4	۶۶/۷۰±۱۱/۳*	۱۰۸/۴±۱۲/۲۰	۲۷/۰۶±۶/۳۴*	۶۴۵/۱۰±۱۹۵/۸۳*	۱۵۰/۵۰±۲۹/۰۹	۵۰/۵۰±۳۴/۰۶

گروه (A): زیر گروه‌های دریافت‌کننده عصاره و متفورمین همزمان با رژیم پرچرب (گروه پیشگیری)

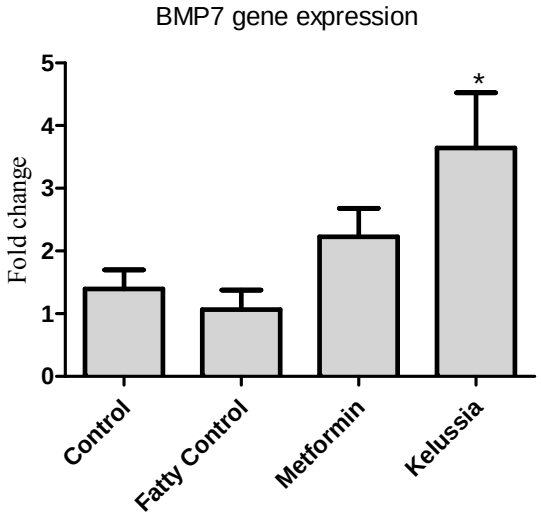
گروه (B): زیرگروه‌های دریافت‌کننده عصاره و متفورمین بعد از ۴۵ روز رژیم پرچرب (گروه درمان)

* P< ۰/۰۵ در مقایسه با زیرگروه دوم (دریافت‌کننده رژیم پرچرب)

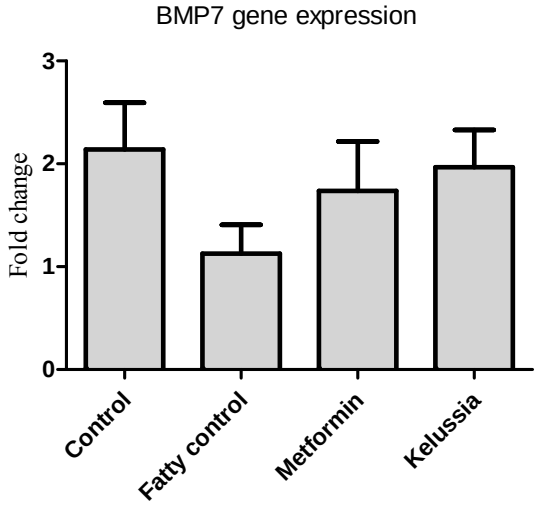
TC (کلسترول تام)، TG (تری گلیسیرید)، HDL (لیپوپروتئین با چگالی بالا)، SGOT (سرم گلوتامات اگزالواستات ترانس آمیناز)، SGPT (سرم گلوتامات پیروات ترانس آمیناز)، ALP (آلکالن فسفاتاز)

بیان ژن *BMP7* در گروه پیشگیری (A) در زیرگروه دریافت کننده عصاره کرفس کوهی نسبت به کنترل معمولی ۲/۶ برابر (Fold change = 2.62, P=0.042) و نسبت به زیرگروه دریافت رژیم چرب ۳/۴۳ برابر (Fold change = 2.62, P=0.012) افزایش یافته است. اما اختلاف معنی‌داری بین کنترل چرب و کنترل معمولی وجود نداشت (P≥۰/۰۵) (شکل شماره ۱).

در مورد بیان ژن *BMP7* در گروه گروه درمان (B) در زیرگروه دریافت‌کننده عصاره کرفس کوهی نسبت به کنترل چرب۱/۳ برابر (Fold change = 1.31, P=0.64) و نسبت به کنترل معمولی ۰/۹ برابر (Fold change = 0.92, P=0.44) بود که اختلاف معنی داری وجود نداشت (P≥۰/۰۵) (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۱ – میزان بیان ژن *BMP7* در گروه پیشگیری (A). * : P= ۰/۰۴۲ با کنترل معمولی و P=۰/۰۱۲ با کنترل چرب



شکل شماره ۲– میزان بیان ژن *BMP7* در گروه درمان (B)

بحث

هدف مطالعه حاضر بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی برگ کرفس‌کوهی بر پروفایل لیپیدی، سطح آنتی‌اکسیدانی، برخی آنزیم های آنتی‌اکسیدانت و همچنین اثر آن بر بیان ژن *BMP7* در بافت چربی سفید رت می‌باشد. مصرف عصاره کرفس کوهی باعث کاهش میزان وزن شده است و این کاهش نسبت به زیر گروه متفورمین بارزتر می‌باشد. مدرسی در سال ۲۰۱۲ دریافت که یکی از خواص کرفس کوهی تأثیر آن بر کاهش وزن می‌باشد. که با نتایج ما مطابقت دارد [۱۵]. اما در گروه درمان، بعد از دریافت یک ماهه رژیم پرچرب و سپس دریافت عصاره کرفس کوهی و متفورمین، کاهش وزن چندانی ایجاد نشده است.

این موضوع احتمالاً به دلیل این مطلب می‌باشد که کرفس کوهی تنها می‌تواند از افزایش وزن و چاقی جلوگیری نماید ولی همانطور که در گروه درمان دیده می‌شود در گروهی که ابتدا اضافه وزن داشتند، نتوانسته وزن را کاهش دهد پس کرفس کوهی در پیشگیری از چاقی کارامد بوده ولی در درمان کمتر تأثیرگذار بوده است. شهرانی و همکاران در سال ۲۰۰۹ گیاه کرفس کوهی را در مدل تجربی هایپرکلسترولمی بررسی کردند و دریافتند که این گیاه اثرات کاهنده لیپیدی داشته است [۴] که با نتایج ما در گروه پیشگیری ($P\leq۰/۰۵$) مطابقت دارد ولی این یافته در گروه درمان مطابقت ندارد. این عدم انطباق می‌تواند به این دلیل باشد که در این پژوهش ما از رت‌هایی استفاده شد که به مدت ۶ هفته عصاره دریافت کرده‌اند. درحالی که در مطالعه ذکر شده از موش‌های سوری‌نژاد Balb/c که فقط ۲ هفته عصاره هیدروالکلی کرفس کوهی را دریافت کرده بودند، استفاده شده است.

آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی اثر شبه انسولینی دارند و جذب گلوکز را در بافت‌های محیطی افزایش می‌دهند [۱۶]. در این مطالعه کرفس کوهی تأثیری بر گلوکز نداشته است. تغییرات گلوکز در گروه متفورمین به دلیل ویژگی دارویی که دارد واضح بوده که البته دور از انتظار نیز نبوده است.

تحقیقات نشان داده است که با کاهش میزان مواد آنتی-اکسیدان بدن، از فعالیت آنزیم پاراکسوناز ۱ کم می‌شود و برعکس با مصرف مواد آنتی‌اکسیدان از جمله ویتامین‌ها، ترکیبات فلاونوئید و غیره بر فعالیت آن افزوده می‌شود [۱۷]. متفورمین توانسته میزان آنزیم پاراکسوناز ۱ را افزایش دهد دلیل این موضوع احتمالاً با کاهش قند رادیکال‌های آزاد نیز کاهش یافته که منجر به بالا رفتن PON1 شده است. مصرف عصاره کرفس کوهی میزان فعالیت آنزیم پاراکسوناز ۱ را کاهش داده که باتوجه به نتایج مربوط به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام، این کاهش تا حدی قابل توجیه می‌باشد، این موضوع نشان می‌دهد علی‌رغم فرض اول مطالعه که انتظار بر افزایش آنزیم های آنتی‌اکسیدان و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی می‌رفت کرفس کوهی نتوانسته سطح آنتی‌اکسیدان‌ها را افزایش دهد که این امر احتمالاً به کاهش سطح پاراکسوناز ۱ منجر شده است. باید در نظر داشت که در این مطالعه کرفس کوهی با کاهش نسبی کلسترول و کاهش معنی‌دار HDL-c همراه بوده و با نظر به اینکه آنزیم پاراکسوناز ۱ در پلاسما متصل به HDL است با کاهش HDL توسط عصاره، پاراکسوناز ۱ نیز کاهش داشته است. البته شاید این موضوع به دز مصرفی عصاره، زیاد بودن دوره مصرف یا متابولیسم رت‌های استفاده شده در این مطالعه مربوط شود ولی اگر مطلب فوق در مطالعات انسانی تأیید شود، در مصرف کرفس کوهی برای انسان احتیاط بسیار بیشتری لازم است.

یکی از معیارهای بررسی میزان و شدت آسیب‌های کبدی، اندازه‌گیری سطح آنزیم‌های کبدی، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالن فسفاتاز (ALP) می‌باشد. افزایش این آنزیم‌ها تا بیش از ۲ برابر حد طبیعی از نشانه‌های بیماری کبد چرب می‌باشد [۱۸]. مطالعات نشان می‌دهد بین وزن، چاقی احشایی و BMI با آنزیم‌های کبدی رابطه معنی‌دار وجود دارد [۲۰، ۱۹]. طبق نتایج ما در گروه پیشگیری گروه متفورمین با $P=۰/۰۲$ و عصاره کرفس کوهی با $P=۰/۰۲۳$ توانسته‌اند میزان آلانین آمینوترانسفراز را نسبت به کنترل چرب کاهش دهند.

از ترکیبات فلاونوئیدی که در کرفس کوهی و گیاهانی مانند کنگرفرنگی موجود است خواص محافظتی برای کبد گزارش شده است لذا کاهش ALT با مصرف کرفس کوهی تا حدی قابل توجیه است با ید در نظر داشت که کرفس کوهی

کاتالاز کبدی را هم افزایش داده پس استرس اکسیداتیو وارد شده از طرف رژیم پرچرب بر کبد تا حدی توسط کاتالاز تخفیف یافته و احتمالا منجر به کاهش ALT شده است.

تأثیر محافظتی عصاره‌های گیاهی مانند کنگرفرنگی بر کبد گزارش شده است، این عصاره نیز توانسته Alt را کاهش دهد که با مطالعه حاضر همسو است [۲۱].

BMP7 در انسان بالغ، قهوه‌ای شدن بافت چربی سفید را تحت اثر محرک‌هایی مانند سرما القا می‌کنند. افزایش بیان BMP7 باعث القای بافت چربی سفید به قهوه‌ای و تولید بیشتر گرما به جای تولید ATP در بدن می‌شود. BMP7 باعث کاهش چاقی و تجمع چربی‌های کبد می‌شود و اختلالات یادگیری و هیپرگلیسمی را در موش‌های دارای رژیم چاق کاهش می‌دهد [۲۲].

عصاره کرفس کوهی در گروه پیشگیری میزان بیان ژن *BMP7* را افزایش داده است از آنجایی که با افزایش بیان ژن *BMP7* میزان گرمازایی در بافت چربی سفید افزایش می‌یابد و ATP کمتری تولید می‌شود و بافت چربی سفید عملکردی شبیه به چربی قهوه‌ای پیدا می‌کند بنابراین کاهش وزن در گروه پیشگیری را می‌توان به افزایش بیان این ژن نسبت داد. این یافته با نتایج Tseng و همکارانش در سال ۲۰۰۸ که نشان دادند افزایش بیان *BMP7* باعث افزایش حجم BAT و تمایز سلول‌های WAT می‌شود، مطابقت دارد [۲۳]. تغییر نکردن وزن در گروه درمان می‌تواند به دلیل عدم تغییر بیان ژن BMP7 در این گروه باشد.

اولین توضیحی برای این یافته ممکن است شامل مسیر سیگنالینگ داخل سلولی باشد که توسط BMP7 باعث تنظیم UCP-1 در آدیپوسیت‌های قهوه‌ای می‌شود. این مسیر شامل اتصال BMP7 به گیرنده BMP-receptor II subtype و القاء مسیر p38 MAPK می‌شود [۲۴].

باید در نظر داشت، مسیر سیگنالینگ β3-adrenergic، که ناشی از فعال‌سازی سمپاتیک دربافت چربی قهوه‌ای است، همچنین از طریق فعال شدن پروتئین کیناز A (PKA) باعث القای مسیر P38 MAPK می‌شود [۲۵]. بنابراین، از طریق P38 MAPK، مسیرهای سیگنالینگ β3-adrenergic و BMP7 در هم تنیده می‌شوند. احتمالاً، مقدار معینی از فعالیت p38 MAPK برای مسیر سیگنالینگ BMP7 ضروری است تا اثرات پایین دست خود را بر روی بیان UCP-1 ایجاد کند. به نظر می‌رسد شرایط در گروه درمان با عدم فعالیت این مسیر سیگنالینگ روبرو بوده که تغییرات وزن در ایبن گروه قابل توجه نبوده است.

مطالعات تکمیلی بر بیان ژن‌هایی مانند UCP1 در بافت چربی قهوه‌ای و یا اندازه‌گیری سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پلاسما مانند سوپراکسید دیسمیوتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و یا گلوتاتیون ردوکتاز برای تکمیل این مطالعه می‌تواند کمک‌کننده باشد. بافت چربی قهوه‌ای به همراه BMP7 دارای ویژگی‌هایی اند که می‌توانند هدف جدید درمان در مبارزه با چاقی و اختلالات مرتبط با آن در آینده قرار می‌گیرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعه حاضر و مقایسه یافته‌های دو گروه پیشگیری و درمان به نظر می‌رسد گیاه کرفس کوهی با افزایش بیان ژن *BMP7* توانسته در پیشگیری از چاقی مفید واقع شده ولی این عصاره با کاهش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و پاراکسوناز ۱ خطر استرس اکسیداتیو را بیشتر می‌کند. عصاره کرفس کوهی در گروه پیشگیری در مورد کاهش وزن خوب عمل کرده اما اثرات آن بر روی سیستم آنتی‌اکسیدانی نیاز به بررسی بیشتری دارد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه از پایان‌نامه خانم فاطمه هاشمی شهرکی دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه آزاد شهرکرد می باشد. قسمتی از هزینه این تحقیق توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به صورت طرح تحقیقاتی با شماره ۲۱۹۱ حمایت مالی شده است که بدینوسیله تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

1. Serra D, Mera P, Malandrino MI, Mir JF and Herrero L. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxidants & Redox Signaling* 2013; 19: 269-84.

2. Tchernof A and Després J-P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiological Rev.* 2013; 93: 359-404.

3. Verma RK, and Paraidathathu T. Herbal medicines used in the traditional indian medicinal system as a therapeutic treatment option for overweight and obesity management: a review. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*. 2014; 6: 40e7.

4. Shahrani M, Pilehvarian A, KHEYRI S, ASGARI A, FAROKHI E, Parvin N and et al. Effects of Kelussia odoratissima Mozaffarian (KOM) extract on blood lipid in Balb/c mice. *Shahrekord University of Medical Sciences J.* 2009; 10 (4): 50-56.

5. Ahmadipour B, Hassanpour H, Asadi E, Khajali F, Rafiei F and Khajali F. Kelussia odoratissima Mozzaf–A promising medicinal herb to prevent pulmonary hypertension in broiler chickens reared at high altitude. *Journal of Ethnopharmacol.* 2015; 159: 49-54.

6. Thoonen R, Hindle AG, and Scherrer-Crosbie M. Brown adipose tissue: The heat is on the heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiol*. 2016; 310: H1592-H605.

7. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T and et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *New England Journal of Med*. 2009; 360: 1518-25.

8. Lee M-J, Wu Y and Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Molecular Aspects of Med*. 2013; 34: 1-11.

9. Chechi K, Nedergaard J and Richard D. Brown adipose tissue as an anti-obesity tissue in humans. *Obesity Reviews* 2014; 15: 92-106.

10. Beaudoin MS, Snook LA, Arkell AM, Stefanson A, Wan Z, Simpson JA and et al. Novel effects of rosiglitazone on SMAD2 and SMAD3 signaling in white adipose tissue of diabetic rats. *Obesity* 2014; 2: 42-1632.

11. Asgary S, Naderi G, Dashti G and Paknahad Z. Effect of Amirkabiria odorastissima Mozaffarian on the development and progression of fatty streaks in hypercholesterolemic rabbits. *Phytotherapy Res*. 2004; 18: 370-2.

12. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-6.

13. Samani KG and Farrokhi E. Effects of cumin extract on oxLDL, paraoxanase 1 activity, FBS, total cholesterol, triglycerides, HDL-C, LDL-C, Apo A1, and Apo B in in the patients with hypercholesterolemia. *International J. Health Sci*. 2014; 8: 39.

14. Livak K.J. and Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25 (4): 402-8.

15. Modaresi M.. Effect of Apium Graveolens on Testis and Spermatogenesis in Mice. *J. Experimental Animal Biol*. 2012; 1 (3): 13-18.

16. Pardo M, Crujeiras AB, Amil M, Aguera Z, Jiménez-Murcia S, Baños R and et al. Association of irisin with fat mass, resting energy expenditure, and daily activity in conditions of extreme body mass index. *International J. Endocrinol.* 2014; 2014: 857270. doi: 10.1155/2014/857270.

17. Dahabreh IJ, Kitsios GD, Kent DM and Trikalinos TA. Paraoxonase 1 polymorphisms and ischemic stroke risk: A systematic review and meta-analysis. *Genetics in Medicine* 2010; 12: 606-15.

18. Popović M, Kaurinović B, Trivić S, Mimica-Dukić N and Bursać M. Effect of celery (*Apium graveolens*) extracts on some biochemical

parameters of oxidative stress in mice treated with carbon tetrachloride. *Phytotherapy Res*. 2006; 20: 531-7.

19. Elinav E, Ben-Dov IZ, Ackerman E, Kiderman A, Glikberg F, Shapira Y and et al. Correlation between serum alanine aminotransferase activity and age: an inverted U curve pattern. *The American Journal of Gastroenterol*. 2005; 100: 2201-4.

20. Prati D, Taioli E, Zanella A, Della Torre E, Butelli S, Del Vecchio E and et al. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Annals of Internal Medicine* 2002; 137: 1-10.

21. Heidarian E and Rafieian-Kopaei M. Protective effect of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf extract against lead toxicity in rat. *Pharmaceutical Biol*. 2013; 51: 1104-9.

22. Boon MR, van den Berg SAA, Wang Y, van den Bossche J, Karkampouna S, Bauwens M and et al. BMP7 Activates Brown Adipose Tissue and Reduces Diet-Induced Obesity Only at Subthermoneutrality. *PLoS ONE* 2013; 8 (9): e74083.

23. Tseng Y-H, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM and et al. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 2008; 454: 1000-4.

24. Schulz TJ and Tseng YH. Emerging role of Bone Morphogenetic Proteins in adipogenesis and energy metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20: 523 - 531.

25. Cao W, Medvedev AV, Daniel KW and Collins C. β-adrenergic activation of p38 MAP Kinase in adipocytes. cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 27077 - 27082.

Effects of Hydroethanolic Extract of *Kelussia odoratissima* Mozaff. Leaf on Total Antioxidant Capacity and BMP7 Gene Expression in Rat White Adipose Tissue

Hashemi Shahraki F (M.Sc. Student)[1], Ghatreh Samani K (Ph.D.)[2]*, Zia Jahromi N (Ph.D.)[3], Yaghobi A (M.Sc.)[4]

1- Clinical Biochemistry, Azad University, Shahrekord, Iran
2- Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
3- Department of Biochemistry, Azad University, Shahrekord, Iran
4- Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
* Corresponding author: Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
Tel: +98- 38 - 33335654, Fax: +98-38- 33330709
E-mail: kgsamani@yahoo.com

Abstract

Background: Obesity is one of the problems of major concern to today's society. Weight loss has been reported for *Kelussia odoratissima* Mozaff.

Objective: Aim of this research is to examine the effect of this plant extract on plasma total antioxidant capacity and Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP7) gene expressions in white adipose tissue (WAT).

Methods: Eighty male wistar rats were divided in two prevention (A) and treatment (B) groups and every group were divided to four subgroups. The A for prevention from obesity and B were used for reducing of obesity. WAT was obtained after the study for BMP7 gene expression (with using Real time PCR). Liver sample for catalase activity, blood for measuring of total antioxidant capacity and paraoxonase 1 activity were prepared.

Results: Weight loss and BMP7 gene expression was seen only in subgroup that receiving *K. odoratissima* hydroethanolic extract in the A group. Contrary to expectation, K. odoratissima extract was reduced the total antioxidant capacity in both groups, reduced level of serum paraoxonase 1 activity and increased liver catalase (p value = 0.002) in comparing to the subgroup that received high fat diet (p value = 0.011).

Conclusion: *K. odoratissima* hydroethanolic extract has an effective role in prevention of weight gain and enhanced liver catalase activity. Increasing in BMP7 gene expression probably causes alteration of WAT to brown adipose tissue (BAT). According to this study, consumption of extract can reduce serum total antioxidant capacity and is likely to exacerbate oxidative stress.

Keywords: *Kelussia odoratissima* Mozaff, Tissue, Total Antioxidant Capacity, White Adipose *BMP7* Gene