Qom University of Medical Sciences Journal

2024. Volume 18

Research Paper

Effect of Chlorogenic Acid on the Heart Tissue in Male C57/BL6 Mice With Endoplasmic Reticulum Stress

Fatemeh Heidari[1], Tahereh Komeili-Movahhed[2], *Azam Moslehi[3]

1. Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.
2. Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.
3. Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Heidari F, Komeili-Movahhed T, Moslehi A. [Effect of Chlorogenic Acid on the Heart Tissue in Male C57/BL6 Mice With Endoplasmic Reticulum Stress (Persian)]. Qom Univ Med Sci J. 2024; 18:E65.9. https://doi.org/10.32598/qums.18.65.9

https://doi.org/10.32598/qums.18.65.9

Received: 15 Nov 2023

Accepted: 16 Dec 2023

Available Online: ???

Keywords:
Chlorogenic acid, Endoplasmic reticulum stress, Oxidative stress, Heart, Tunicamycin

ABSTRACT

Background and Objectives: Endoplasmic reticulum (ER) stress is one of important factors in pathophysiology of fatty liver, infertility, gastric ulcer, and even cardiac disorders. Chlorogenic acid (CA) is an herbal compound with many antioxidant and anti-inflammatory properties. This study aims to evaluate the protective effectiveness of CA in reducing ER stress induced by tunicamycin (TM) in the heart of male C57/BL6 mice.

Methods In this study, 36 male C57/BL6 mice were divided into six groups: Saline, Vehicle, CA, ER stress, ER stress-CA 20 mg/kg and ER stress-CA 50 mg/kg. ER stress was induced by intraperitoneal injection of TM. The CA was injected intraperitoneally one hour before TM injection. Thirty hours after TM injection, the animals were sacrificed and a part of their heart was kept in 10% formaldehyde and another part was kept in -80°C.

Results The CA reduced GRP78 and Malondialdehyde levels, while total antioxidant capacity increased after CA administration. Decreased cross section of muscle fibers and increased interventricular wall thickness caused by ER stress were also improved.

Conclusion The CA can improve histological and cellular changes caused by ER stress in the heart of male C57/Bl6 mice by reducing oxidative stress and ER stress.

**** Corresponding Author:***

Azam Moslehi, Associate Professor.

Address: Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

Tel: +98 (912) 6510485

E-Mail: moslehi2000@gmail.com, amoslehi@muq.ac.ir

Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license(https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).
Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) is a main organelle in folding newly synthesized secretory and membrane proteins, lipid biosynthesis, and calcium storage. Misfolding or unfolding of proteins occurs during biosynthesis in the ER lumen. The accumulation of unfolded or misfolded proteins in the ER can cause "ER stress". It can affect the fate of proteins, lipids, carbohydrates, leading to inflammation, apoptosis and many disorders. Oxidative stress plays an important role in creating ER stress. Chlorogenic acid (CA), an ester of caffeic acid and 3, 4-dihydroxyphenyllactic acid, is one of the main polyphenols with many health-promoting properties. Recent studies demonstrated that CA has anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-diabetic, anti-cancer, anti-neurodegenerative, anti-lipidemic and anti-hypertensive activities. Given these beneficial effects, this study aims to evaluate the effect of CA on improving cardiac histological changes and oxidative stress in male C57/BL6 mice with ER stress.

Methods

In this study, 36 male C57/BL6 mice, weighing 22-25 g, were kept at 21˚C exposed to 12-hour light/dark cycle. They had free access to fresh tap water and food. The animals were randomly divided into six groups of 6 including: Saline (received normal saline), Vehicle (received dimethylsulfoxide), CA (50 mg/Kg CA injection), ER stress (2 µg/g Tunicamycin [TM] injection to induce ER stress), CA 20 - ER stress (20 mg/kg CA injection 60 minutes before TM injection), CA 50 – ER stress (50 mg/kg CA injection 60 minutes before TM injection). The intraperitoneal administration was used in all groups.

Thirty hours after TM injection, the animals were anaesthetized with a mix of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The abdomen excised via midline incision and the heart removed. Apart of the it, was fixed in 10% formalin for histopathological assessment and the other half stored at freezer (-80˚C) for cellular assessment. For histological examination, the heart tissues were dehydrated in ethanol series, cleaned in xylene series, embedded in paraffin wax, cut into 5 µm sections, mounted on glass slides and stained with hematoxylin and eosin dye (H&E stain). Photomicrographs and histological examination were taken using light microscope.

Total RNA of frozen tissue samples was isolated using the Trizol solution, according to the manufacturer's instructions. The quantity and purity of the RNA samples were measured by Nanodrop spectrophotometer. Complementary DNAs (cDNA) were prepared from mRNA templates for RT-PCR. The expression of each gene was measured using the 2ΔΔCT method and compared to the expression level of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as an internal control. The levels of Malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (TAC) were assayed with the ELISA method. All data were presented as Mean±SEM. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test for multiple comparisons in SPSS software, version18. In all analyses, the significance level was set at 0.05.

Results

A single dose of TM resulted in ER stress and increased GRP78 gene expression in the ER stress group compared to the saline group; but GRP78 gene expression significantly decreased in the CA 20 - ER stress group compared to the ER stress group ($P<0.05$). ELISA findings also showed a marked increase of MDA level in the ER stress group compared to the saline group, while it significantly decreased in the CA 20 - ER stress group. Also, the TAC level significantly decreased in the ER stress group compared to the saline group and administration of CA caused a significant increase in the TAC level.

H&E staining results revealed the normal shape of heart tissue in the saline and vehicle groups. Heart fibers rupture and vessels rupture were seen in the ER stress group. Also, muscle fibers cross section decreased and interventricular thickness significantly increased. However, they were improved in the preventive groups.

Conclusion

The administration of CA can result in reduced ER stress and increased antioxidant capacity which can finally improve the tissue structure of the heart. Therefore, it can be suitable for the attenuation of ER stress and pathologic effects in the mice heart.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of Qom University of Medical Sciences (Code: IR.MUQ.REC.1400.031).

Funding

Qom University of Medical Sciences supported this study.

Authors contributions

All authors equally contributed to preparing this article.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank Qom University of Medical Sciences (QUMS) for supporting this study.

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

مقاله پژوهشی

بررسی اثر کلروژنیک‌اسید بر بافت قلب در موش‌های C57/BL6 نر مبتلا به استرس شبکه اندوپلاسمی

فاطمه حیدری[۱]، طاهره کمیلی‌موحد[۲]، *اعظم مصلحی[۳]

۱. گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی قم، قم، ایران.
۲. گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی قم، قم، ایران.
۳. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی قم، قم، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Heidari F, Komeili-Movahhed T, Moslehi A. [Effect of Chlorogenic Acid on the Heart Tissue in Male C57/BL6 Mice With Endoplasmic Reticulum Stress (Persian)]. Qom Univ Med Sci J. 2024; 18:E65.9. https://doi.org/10.32598/qums.18.65.9

https://doi.org/10.32598/qums.18.65.9

تاریخ دریافت: ۲۴ آبان ۱۴۰۲
تاریخ پذیرش: ۲۵ آذر ۱۴۰۲
تاریخ انتشار: ؟؟؟

چکیده

زمینه و هدف استرس شبکه اندوپلاسمی به‌عنوان یکی از دلایل مهم در پاتوفیزیولوژی بسیاری از بیماری‌ها مثل کبد چرب، ناباروری، زخم معده و حتی اختلالات قلبی در نظر گرفته می‌شود. کلروژنیک‌اسید یک ترکیب گیاهی شناخته‌شده با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی فراوان است. هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظتی کلروژنیک‌اسید بر کاهش استرس شبکه اندوپلاسمی القاشده توسط تونیکامایسین در قلب موش‌های نر بود.

روش بررسی حیوانات به ۶ گروه سالین، حلال، کلروژنیک‌اسید، استرس شبکه اندوپلاسمی و استرس شبکه اندوپلاسمی ـ کلروژنیک‌اسید ۲۰ میلی‌گرم و استرس شبکه اندوپلاسمی ـ کلروژنیک‌اسید ۵۰ میلی‌گرم تقسیم شدند. استرس شبکه اندوپلاسمی به‌وسیله تزریق داخل‌صفاقی تونیکامایسین ایجاد شد. یک ساعت قبل از تزریق تونیکامایسین، کلروژنیک‌اسید با دُزهای ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم به‌صورت داخل‌صفاقی به حیوانات تزریق شد. ۳۰ ساعت پس از تزریق تونیکامایسین، حیوانات کشته شدند و بخشی از نمونه‌های بافت قلب در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و بخش دیگر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

یافته‌ها کلروژنیک‌اسید، سطح GRP78 و میزان مالون‌دی‌آلدئید را کاهش داد و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی پس از تجویز کلروژنیک‌اسید افزایش یافت. همچنین سطح مقطع کاهش‌یافته فیبرهای عضلانی و افزایش ضخامت دیواره بین بطنی نیز بهبود یافت.

نتیجه‌گیری کلروژنیک‌اسید می‌تواند تغییرات بافتی و سلولی ایجادشده به‌وسیله استرس شبکه اندوپلاسمی را در بافت قلب از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و استرس شبکه اندوپلاسمی بهبود بخشد.

کلیدواژه‌ها:
استرس شبکه اندوپلاسمی، استرس اکسیداتیو، کلروژنیک‌اسید، تونیکامایسین، قلب

* **نویسنده مسئول:**
اعظم مصلحی
نشانی: قم، دانشگاه علوم‌پزشکی قم، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی.
تلفن: ۶۵۱۰۴۸۵ (۹۱۲) ۹۸+
رایانامه: moslehi2000@gmail.com, amoslehi@muq.ac.ir

Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license(https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).
Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

مقدمه

شبکه اندوپلاسمی یکی از اندامک‌های مهم در تولید و تغییر شکل پروتئین‌های تازه‌ساخته‌شده است که می‌توانند شامل انواع هورمون‌ها، سیتوکین‌های التهابی و حتی آنزیم‌های دخیل در سنتز و متابولیسم چربی باشند [۱]. بسیاری از محرک‌های محیطی، تغذیه‌ای و پاتولوژیکی، مانند اختلال در هموستاز کلسیم، محرومیت از قند یا افزایش آن، بار بیش از حد کلسترول، التهاب و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در سلول می‌توانند هموستاز شبکه اندوپلاسمی را مختل کرده و موجب اختلال در تاخوردن پروتئین‌های تازه‌تشکیل‌شده، تغییر در گلیکوزیلاسیون و سولفیداسیون در آن‌ها شده و وضعیتی به‌عنوان استرس شبکه اندوپلاسمی[1] را ایجاد کنند [۲، ۳]. ایجاد استرس و اختلال در شبکه اندوپلاسمی با فعال کردن فرایندهای التهابی و آپوپتوز موجب تغییر عملکرد بافت‌ها و تغییرات ساختاری در آن‌ها می‌شود. بنابراین استرس شبکه اندوپلاسمی می‌تواند در فیزیوپاتولوژی بسیاری از بیماری‌ها مثل کبد چرب، زخم معده، ناباروری و حتی اختلالات قلبی نقش داشته باشد [۴، ۵]. مطالعات گذشته نشان داده‌اند استرس شبکه اندوپلاسمی در ایجاد بیماری‌های ایسکمیک قلبی، نارسایی قلبی و حتی انواع آریتمی‌های قلبی نقش دارد [۶، ۷]. استرس در شبکه اندوپلاسمی می‌تواند موجب هیپرتروفی قلب و ایجاد استئاتوز یا تجمع چربی در بافت قلب شود. این امر عمدتاً ناشی از اختلال در بتا-اکسیداسیون تری‌گلیسریدهاست [۸، ۹]. ثابت شده است که تجمع اسیدهای چرب یا تری‌گلیسریدها با ایجاد استرس شبکه اندوپلاسمی موجب تغییر در ساخت و فعالیت آپولیپوپروتئین‌های ترشحی مانند آپولیپوپروتئین B می‌شود [۱۰]. همچنین استرس شبکه اندوپلاسمی در قلب تولید گونه‌های فعال اکسیژن، التهاب و آپوپتوز را نیز فعال می‌کند [۱۱].

کلروژنیک‌اسید، یک استر از کافئیک‌اسید و ۳و۴دی‌هیدروکسی فنیلاکتیک‌اسید است و به فراوانی در گیاهانی چون قهوه سبز یافت می‌شود [۱۲]. مطالعات متعدد اثرات مثبت کلروژنیک‌اسید را بر بهبود آسیب‌های بافتی نشان داده‌اند [۱۳، ۱۴]. کلروژنیک‌اسید اثرات قابل‌توجهی نیز در کاهش التهاب دارد و به‌عنوان یک ترکیب ضدالتهاب قوی شناخته می‌شود [۱۵، ۱۶]. نشان داده شده است که کاهش استرس شبکه اندوپلاسمی می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو و مهار مسیرهای التهابی، موجب بهبود بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی در موش‌های سوری شود [۱۷]. همچنین کلروژنیک‌اسید با کاهش استرس شبکه اندوپلاسمی موجب بهبود عملکرد کبد در موش‌های سوری شده است [۱۸].

با توجه به اهمیت استرس شبکه اندوپلاسمی در ایجاد و پیشرفت بیماری‌های قلبی و نقش مثبت کلروژنیک‌اسید بر بهبود بیماری‌ها، هدف از انجام این مطالعه بررسی نقش کلروژنیک‌اسید بر بهبود تغییرات بافت‌شناسی قلب و استرس اکسیداتیو در موش‌های C57/Bl6 مبتلا به استرس شبکه اندوپلاسمی بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در دانشگاه علوم‌پزشکی قم و بر روی ۳۶ سر موش کوچک نر نژاد C57/BL6 در محدوده وزنی ۲۳ تا ۲۵ گرم انجام شد. در مدت مطالعه، حیوانات در شرایط استاندارد دمایی(۲±۲۹ درجه سانتیگراد) و رطوبت نسبی (۴۵ تا ۴۸ درصد) و سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داشته و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. این مطالعه مطابق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم‌پزشکی قم انجام شد (IR.MUQ.REC.1401.031). جهت انجام آزمایش، حیوانات به‌طور تصادفی به ۶ گروه ۶تایی به‌ترتیب زیر تقسیم شدند:

گروه اول (سالین): شامل حیوانات سالمی بود که نرمال‌سالین را به‌عنوان حلال کلروژنیک‌اسید به‌شکل داخل‌صفاقی دریافت می‌کردند.

گروه دوم (حلال): شامل حیوانات سالمی بود که دی‌متیل سولفوکسید[2] را به‌عنوان حلال تونیکامایسین به‌شکل داخل‌صفاقی دریافت می‌کردند.

گروه سوم (کلروژنیک‌اسید): شامل حیوانات سالمی بود که ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، کلروژنیک‌اسید (شرکت سیگما، کد G5-536954) را جهت بررسی تغییرات سمی احتمالی به‌شکل داخل‌صفاقی دریافت می‌کردند [۱۹].

گروه چهارم (استرس شبکه اندوپلاسمی): شامل حیواناتی بودند که جهت القای استرس شبکه اندوپلاسمی، تونیکامایسین را با دُز ۲ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌شکل داخل‌صفاقی دریافت می‌کردند [۵].

گروه پنجم (استرس شبکه اندوپلاسمی ـ کلروژنیک‌اسید ۲۰ میلی‌گرم): شامل موش‌های سوری بودند که یک ساعت قبل از تزریق تونیکامایسین، ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، کلروژنیک‌اسید به‌شکل داخل‌صفاقی به آن‌ها تزریق می‌شد [۱۹].

گروه ششم (استرس شبکه اندوپلاسمی ـ کلروژنیک‌اسید ۵۰ میلی‌گرم): شامل موش‌های سوری بودند که یک ساعت قبل از تزریق تونیکامایسین، ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، کلروژنیک‌اسید به‌شکل داخل‌صفاقی به آن‌ها تزریق می‌شد [۱۹].

۳۰ ساعت پس از تزریق تونیکامایسین، حیوانات با استفاده از تزریق داروی بیهوشی کتامین ـ زایلازین (۵۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم کتامین و ۰/۰۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم

1. Endoplasmic reticulum stress (ER stress)

2. Dimethylsulfoxide (DMSO)

زایلازین) بیهوش شدند [۱۷]. سپس ناحیه شکم برش داده شد و قلب بلافاصله خارج شد و بخشی از آن در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. بخشی دیگر جهت بررسی مطالعات سلولی در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس قرار داده شد.

روش تهیه لام بافتی و ارزیابی‌های هیستولوژیک

جهت بررسی مطالعات بافت‌شناسی، بافت قلب در پارافین قالب‌بندی شد و برش‌های ۵میکرومتری از آن تهیه شد. سپس رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد و شاخص‌های بافت‌شناسی مثل سطح مقطع فیبرهای عضلانی و ضخامت دیواره بین بطنی با استفاده از میکروسکپ نوری موردبررسی قرار گرفت.

روش انجام ریل تایم PCR [۳]

جهت بررسی بیان ژن GRP78 از روش RT-PCR استفاده شد. در این روش ابتدا RNA با استفاده از محلول ترایزول (یکتا تجهیز، ایران) از بافت قلب استخراج شد و میزان خلوص آن با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nanolytik، آلمان) تعیین شد. سپس با استفاده از کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز، ایران) از روی آن cDNA به‌طور معکوس ساخته شد. سرانجام با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و سایبرگرین (Biofact, Korea) به‌عنوان ماده نشاندار رنگی و دستگاه ریل تایم (AB, USA)، میزان بیان هر کدام از ژن‌ها به‌طور کمی با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد و با میزان بیان ژن GAPDH [۴] مقایسه شد.

توالی پرایمرهای مورداستفاده به شرح زیر است:

GAPDH: (F) TGGCCTTCCGTGTTCCTAC

GAPDH: (R) GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA

GRP78: (F) TGTGTGTGAGACCAGAACCG

GRP78: (R) TAGGTGGTCCCCAAGTCGAT

روش انجام آزمایش الایزا

جهت سنجش مقدار مالون‌دی‌آلدئید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی، از روش الایزا استفاده شد. در ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت قلب جدا و وزن شد. سپس ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات به آن اضافه و سانتریفوژ شد و مایع رویی که همان سوپرناتانت است برداشته شد. سپس با استفاده از کیت مخصوص سنجش مالون‌دی‌آلدئید (ZB-MDA-96A, Germaney) و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (ZB-TAC-96A, Germaney) مقادیر آن‌ها اندازه‌گیری شد و با استفاده از دستگاه الیزا ریدر، در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین شد.

ارزیابی آماری داده‌ها

داده‌های این مطالعه به‌صورت میانگین± خطای استاندارد بیان شدند. برای ارزیابی آماری و مقایسه بین گروه‌های مختلف از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. در تمامی محاسبات P<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری لحاظ شد.

یافته‌ها

بررسی اثر کلروژنیک‌اسید بر میزان بیان ژن GRP78 قلب

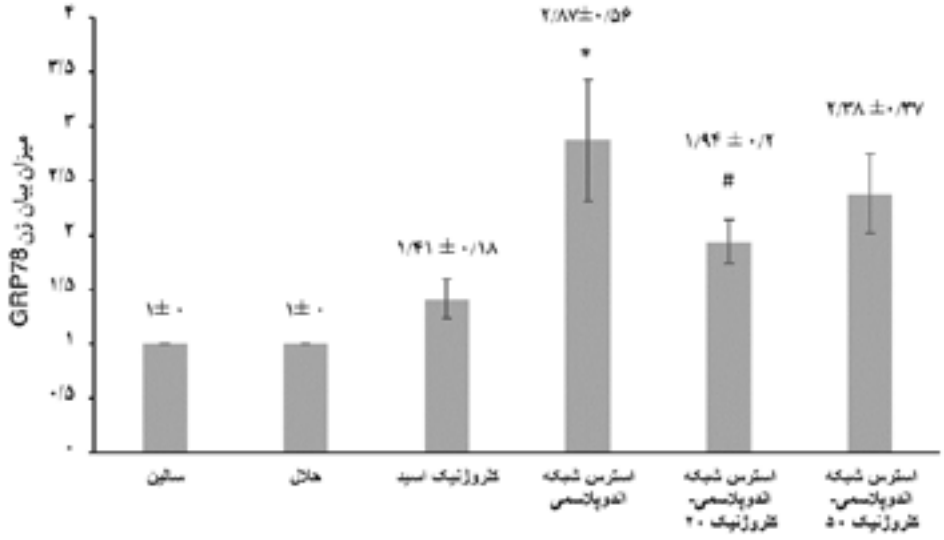
داده‌های به‌دست‌آمده از این مطالعه افزایش معنی‌داری در میزان بیان mRNA ژن GRP78 در گروه استرس شبکه اندوپلاسمی نسبت به گروه سالین نشان داد (۲/۸۷±۰/۰۵۶ در مقابل ۱) (P<۰/۰۱). درحالی‌که استفاده از کلروژنیک‌اسید قبل از القای استرس شبکه اندوپلاسمی موجب کاهش بیان GRP78 به‌عنوان چاپرون اصلی در گروه استرس شبکه اندوپلاسمی ـ کلروژنیک‌اسید ۲۰ میلی‌گرم نسبت به گروه استرس شبکه اندوپلاسمی شد (۱/۹۴±۰/۲) در مقابل ۲/۸۷±۰/۰۵۶) (P<۰/۰۵). هرچند این کاهش در گروه استرس شبکه اندوپلاسمی ـ کلروژنیک‌اسید ۵۰ میلی‌گرم نسبت به گروه استرس شبکه اندوپلاسمی معنی‌دار نبود (تصویر شماره ۱).

بررسی اثر کلروژنیک‌اسید بر میزان مالون‌دی‌آلدئید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی قلب در استرس شبکه اندوپلاسمی القاشده به‌وسیله تونیکامایسین در موش‌های سوری نر

نتایج این مطالعه افزایش معنی‌داری در میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه استرس شبکه اندوپلاسمی نسبت به گروه سالین و حلال نشان داد (۱۲/۰۸±۱/۱۷ در مقابل ۷/۵۲±۱/۲۹ و ۷/۴۸±۱/۰۵) (P<۰/۰۱). استفاده از کلروژنیک‌اسید قبل از القای استرس شبکه اندوپلاسمی در موش‌های گروه استرس شبکه اندوپلاسمی ـ کلروژنیک‌اسید ۲۰ میلی‌گرم با کاهش معنی‌دار در میزان مالون‌دی‌آلدئید نسبت به گروه استرس شبکه اندوپلاسمی همراه شد (۸/۲۵±۰/۶۵ در مقابل ۱۲/۰۸±۱/۱۷) (P<۰/۰۱) (تصویر شماره ۲).

یافته‌های حاصل از الایزا کاهش معنی‌داری در میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در گروه استرس شبکه اندوپلاسمی نسبت به گروه سالین و حلال نشان داد (۰/۲۴±۰/۰۳۶ در مقابل ۰/۵۱±۰/۰۶۱ و ۰/۵۸±۰/۰۶۵) (P<۰/۰۱). درحالی‌که تزریق ۲۰ میلی‌گرم کلروژنیک‌اسید به موش‌های مبتلا به استرس شبکه اندوپلاسمی موجب افزایش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی نسبت به گروه استرس شبکه اندوپلاسمی شد (۰/۴۷±۰/۰۳۱ در مقابل ۰/۲۴±۰/۰۳۶) (P<۰/۰۱) (تصویر شماره ۳).

3. Real time PCR (RT-PCR)
4. Glyceraldehyde-3-pPhosphate dehydrogenase (GAPDH)

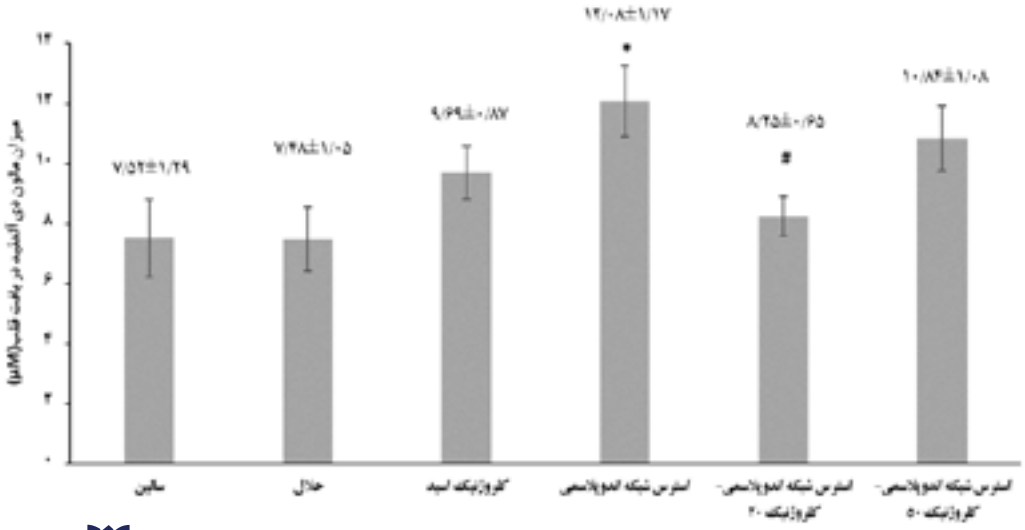


تصویر ۱. میزان بیان mRNA ژن GRP78 در بافت قلب
* نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه سالین؛ # نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه استرس شبکه اندوپلاسمی

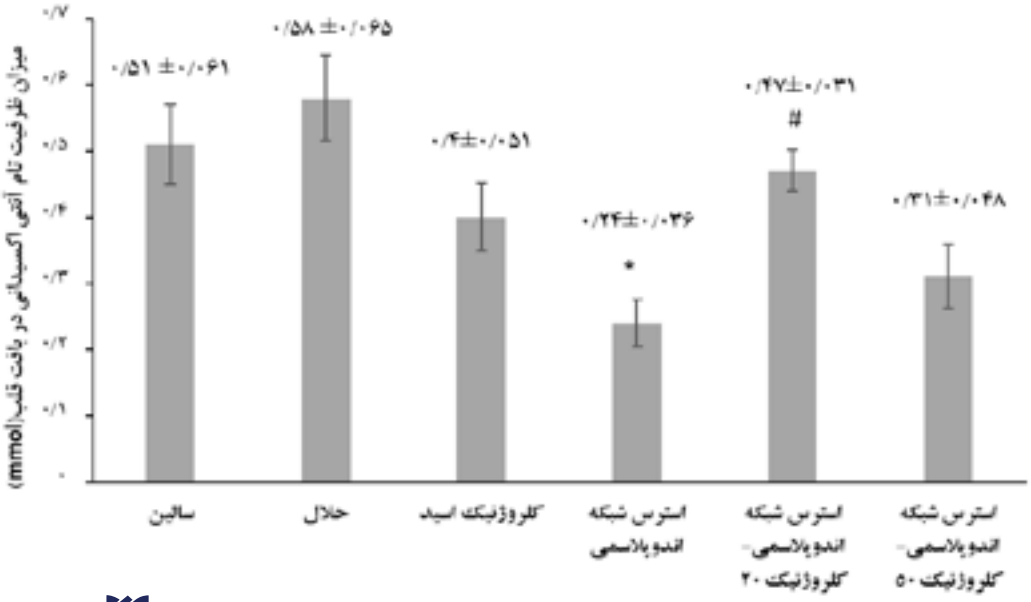
تجزیه‌وتحلیل شدند. در این مطالعه، در گروه‌های سالین (A)، حلال (B) و کلروژنیک‌اسید (C) بافت طبیعی قلب قابل‌مشاهده بود. فیبرهای عضلانی در برش‌های طولی، در امتداد هم بوده و هسته‌ها در محیط قرار داشتند. در گروه استرس شبکه اندوپلاسمی (D) فضای بین فیبرهای عضلانی (علامت ستاره) و پارگی فیبرهای عضلانی (فلش سبزرنگ) مشخص است. در این گروه بین سلول‌ها فضای بیشتری مشاهده می‌شود. تخریب عروقی (فلش قرمزرنگ) و وجود سلول‌های خونی در فضای بین سلول‌ها که نشان‌دهنده پارگی عروق و احتقان است (فلش سیاه‌رنگ) دیده می‌شود.

بررسی اثر کلروژنیک‌اسید بر تغییرات بافت‌شناسی قلب در استرس شبکه اندوپلاسمی القاشده به‌وسیله تونیکامایسین در موش‌های سوری نر

در بررسی مورفولوژیکی، تغییرات مورفولوژی سلول‌های بافت قلبی، کل ساختار سلول‌های قلب در بزرگنمایی ۴ و پارگی و تغییر در سلول‌های قلب به‌صورت کیفی با بزرگنمایی ۴۰۰ موردبررسی قرار گرفت (تصویر شماره ۴). در بررسی مورفومتریک، سلول‌های قلب با بزرگنمایی ۴۰۰ موردبررسی قرار گرفتند و سطح مقطع میوسیت‌های بطن چپ (تصویر شماره ۵) و نیز تغییر در ضخامت دیواره بین بطنی (تصویر شماره ۶) با استفاده از نرم‌افزار ImageJ



تصویر ۲. میزان مالون‌دی‌آلدئید در بافت قلب
* نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه سالین و حلال؛ # نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه استرس شبکه اندوپلاسمی



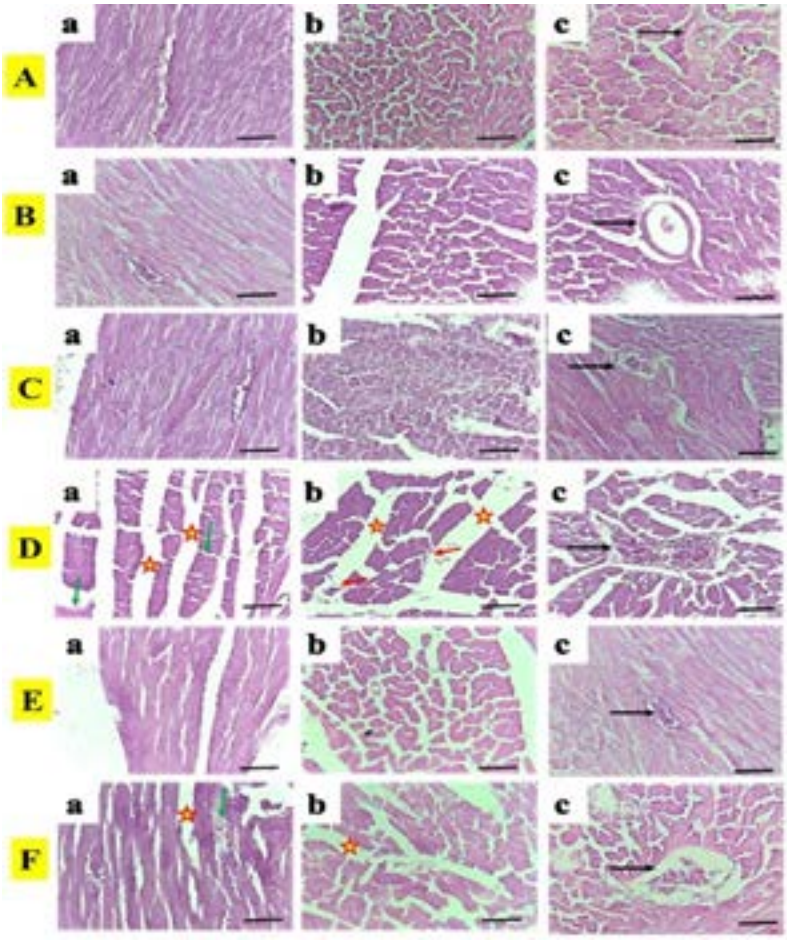
تصویر ۳. میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در بافت قلب
* نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه سالین و حلال؛ # نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه استرس شبکه اندوپلاسمی

در گروه استرس شبکه اندوپلاسمی ـ کلروژنیک‌اسید ۲۰ میلی‌گرم (E)، فضای بین سلول‌ها در حالت نرمال بوده و پارگی فیبرهای عضلانی نیز دیده نمی‌شود. در گروه استرس شبکه اندوپلاسمی ـ کلروژنیک‌اسید ۵۰ میلی‌گرم (F)، فضای بین فیبرهای عضلانی (علامت ستاره) و پارگی فیبرهای عضلانی (فلش سبزرنگ) تا حدی مشاهده می‌شود. در این گروه نیز بهبودی در بافت اتفاق افتاده است، با این وجود در برخی مناطق همچنان افزایش فضای بین سلول‌ها و پارگی فیبرهای عضلانی مشهود است.

بحث

استرس شبکه اندوپلاسمی یک عامل مهم در فیزیوپاتولوژی انواعی از بیماری‌ها شامل بیماری‌های قلبی، ریوی، کبد، دیابت و غیره است. تونیکامایسین یک نوکلئوتیداز آنتی‌بیوتیک است که توسط چندین گونه از استرپتومایس‌ها شامل استرپتومایس‌های A و B و C تولید می‌شود و موجب مهار N-گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها می‌شود. مهار N-گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها باعث ایجاد استرس در شبکه اندوپلاسمی شده و عملکرد طبیعی شبکه اندوپلاسمی را مختل می‌کند [۲۰]. این ماده به‌عنوان یک داروی شیمیایی استاندارد جهت القای استرس شبکه اندوپلاسمی در بدن استفاده می‌شود. یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد استفاده از کلروژنیک‌اسید قبل از ایجاد استرس شبکه اندوپلاسمی به‌صورت قابل‌ملاحظه‌ای میزان بیان ژن GRP78 را به‌عنوان شاخص اصلی شناسایی استرس شبکه اندوپلاسمی کاهش می‌دهد. همچنین مقدار مالون‌دی‌آلدئید کاهش یافت و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی افزایش پیدا کرد. درنهایت، مطالعات بافت‌شناسی نشان داد کلروژنیک‌اسید تغییرات ساختاری ایجادشده به‌وسیله تونیکامایسن را بهبود بخشیده است.

کلروژنیک‌اسید ماده مؤثر اصلی در بسیاری از گیاهان است، اما بیش از همه در قهوه سبز یافت می‌شود. مطالعات انجام‌شده در گذشته نشان داده‌اند کلروژنیک‌اسید اثرات قابل‌توجهی در بهبود استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز در بافت‌های مختلف دارد [۱۳، ۱۴]. برای مثال، کیم و همکاران قبلاً نشان داده‌اند که کلروژنیک‌اسید دارای اثرات حفاظت کبدی در برابر استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در موش‌های سوری مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی است [۲۱]. GRP78 وظیفه تسهیل انتقال، تکمیل و تجمع پروتئین‌های تازه‌تولیدشده در سلول را بر عهده دارد و از تاخوردگی اشتباه و تجمع پروتئین‌های بدتاخورده در سلول جلوگیری می‌کند. زمانی که تعداد این پروتئین‌های اشتباه و بدتاخورده افزایش می‌یابد، میزان بیان GRP78 نیز افزایش پیدا می‌کند که به‌عنوان مهم‌ترین شاخص استرس شبکه اندوپلاسمی در نظر گرفته می‌شود [۱۸]. افزایش GRP78 اکنون موجب القا و فعال شدن حسگرهای مهم دیگری در غشای شبکه اندوپلاسمی به‌نام‌های PREK و IRE1 می‌شود. نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد مصرف کلروژنیک‌اسید قبل از ایجاد استرس شبکه اندوپلاسمی بیان GRP78 را کاهش داده و به این ترتیب استرس شبکه اندوپلاسمی ایجادشده را بهبود بخشیده است. در همین زمینه ژو و همکاران گزارش کردند که کاهش استرس در شبکه اندوپلاسمی موجب کاهش بیان GRP78 و CHOP شده و آسیب ایسکمیک قلبی و آپوپتوز در کاردیومیوسیت‌ها را کاهش داده است [۲۲]. در مطالعه‌ای دیگر، کمیلی و همکاران بیان کردند



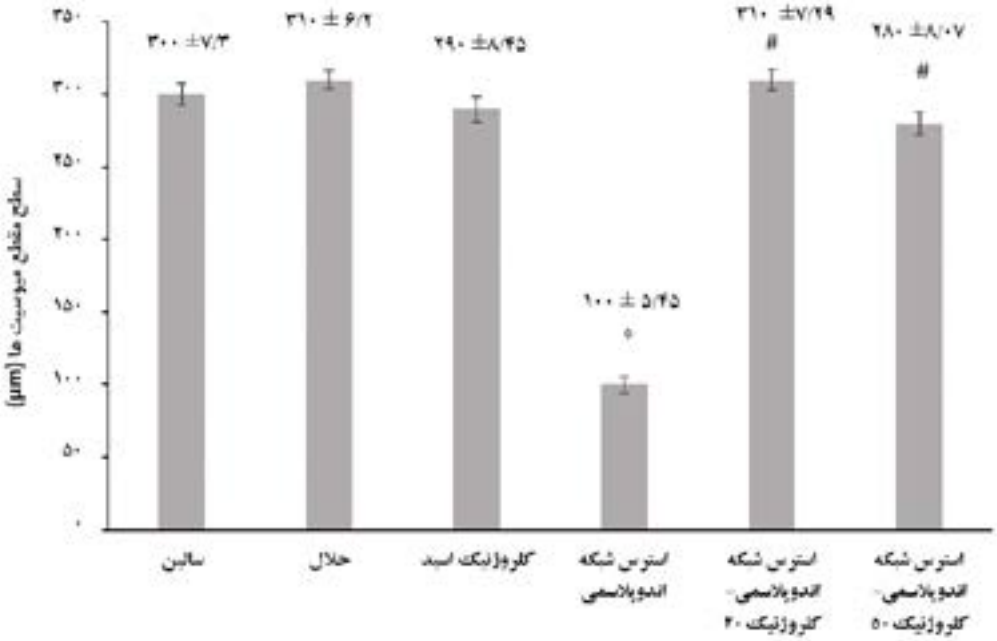
تصویر ۴. نمای میکروسکوپی بافت قلب با بزرگنمایی ۴ و ۴۰۰
a) نمای برش طولی؛ b) نمای برش عرضی؛ C) نمای برش عروق قلب
A) گروه سالین؛ B) گروه حلال؛ C) گروه کلروژنیک‌اسید؛ D) گروه استرس شبکه اندوپلاسمی؛ E) گروه استرس شبکه اندوپلاسمی ـ کلروژنیک‌اسید ۲۰ میلی‌گرم؛
F) گروه استرس شبکه اندوپلاسمی ـ کلروژنیک‌اسید ۵۰ میلی‌گرم

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

که استفاده از کلروژنیک‌اسید قبل از مصرف تونیکامایسین موجب کاهش بیان GRP78 و به‌تبع آن کاهش استرس شبکه اندوپلاسمی در بافت بیضه شده است [۲۳]. علاه بر این، کلروژنیک‌اسید توانسته است با مهار مسیر GRP78/IRE1α، موجب کاهش استرس در شبکه اندوپلاسمی شود و فیبروز ریوی القاشده توسط بلئومایسین را در موش‌های سوری بهبود بخشد [۲۴]. این گزارشات همسو با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه ما بوده و نشان می‌دهند که کلروژنیک‌اسید با کاهش بیان GRP78 می‌تواند استرس شبکه اندوپلاسمی را بهبود بخشد.

استرس اکسیداتیو یکی دیگر از عوامل مهم در آسیب بافتی است. مطالعات قبلی ارتباط متقابل بین استرس شبکه اندوپلاسمی و استرس اکسیداتیو را در بدن نشان داده‌اند [۲۵]. مالون‌دی‌آلدئید یکی از شاخص‌های اصلی در نشان دادن استرس اکسیداتیو در سلول است که نشان‌دهنده پراکسیداسیون لیپیدی در غشا و از بین رفتن یکپارچگی آن است. نتایج این پژوهش نشان داد استفاده از کلروژنیک‌اسید موجب کاهش مالون‌دی‌آلدئید در بافت قلب شده است. از سوی دیگر، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی بعد از مصرف کلروژنیک‌اسید افزایش یافته بود. مطالعات انجام‌شده در این زمینه گزارش می‌کنند که کلروژنیک‌اسید با کاهش مالون‌دی‌آلدئید، سوپراکسید دسموتاز و گونه‌های فعال اکسیژن در بافت قلب همراه بوده است [۲۶، ۲۷]. به همین شکل در مطالعه کازاز و همکاران، کلروژنیک‌اسید موجب بهبود استرس شبکه اندوپلاسمی و نیز کاهش مالون‌دی‌آلدئید و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در بافت بیضه موش‌های صحرایی نر شد [۲۸]. به این ترتیب نتایج مطالعات گذشته، یافته‌های این مطالعه را تأیید می‌کند و به نظر می‌رسد که کلروژنیک‌اسید از طریق کاهش استرس شبکه اندوپلاسمی، موجب کاهش استرس اکسیداتیو در قلب شده است.

درنهایت، ارزیابی‌های بافت‌شناسی نشان داد تغییرات تخریبی در بافت قلب که به‌دلیل استرس شبکه اندوپلاسمی و

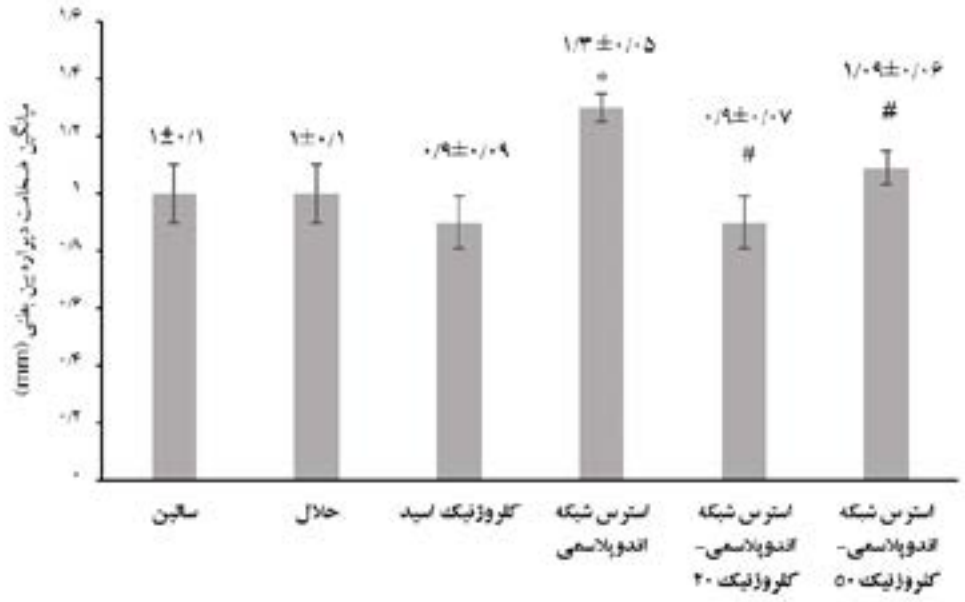


تصویر ۵. سطح مقطع میوسیت‌ها در بافت قلب
* نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه سالین و حلال؛ # نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه استرس شبکه اندوپلاسمی

تونیکامایسین ایجاد شده است با مصرف کلروژنیک‌اسید بهبود یافت. پس از مصرف کلروژنیک‌اسید، پارگی فیبرهای عضلانی از بین رفته و قطر میوسیت‌ها افزایش یافت. همچنین ضخامت دیواره بین بطنی کاهش یافته و خونریزی‌های بین‌سلولی از بین رفته است. جالب توجه اینکه، این نتایج در گروه ۲۰ میلی‌گرم کلروژنیک‌اسید بهتر از گروه ۵۰ میلی‌گرم کلروژنیک‌اسید بود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد کلروژنیک‌اسید با کاهش بیان GRP78 به‌عنوان یک شاخص مهم استرس شبکه اندوپلاسمی موجب بهبود اختلال سلولی شده و درنتیجه میزان استرس اکسیداتیو در سلول کاهش یافته و قدرت آنتی‌اکسیدانی افزایش



تصویر ۶. میانگین ضخامت دیواره بین بطنی در بافت قلب
* نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه سالین و حلال؛ # نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار در مقایسه با گروه استرس شبکه اندوپلاسمی

یافته است. این امر احتمالاً به تضعیف اثرات تخریبی استرس شبکه اندوپلاسمی در بافت منجر شده و ساختار بافتی قلب را بهبود داده است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه مطابق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم‌پزشکی قم با کد (IR.MUQ.REC.1401.031) انجام شد.

حامی مالی

دانشگاه علوم‌پزشکی قم حامی مالی این مطالعه بوده است.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان مشارکت یکسانی در این مطالعه داشتند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه علوم‌پزشکی قم بابت حمایت مالی از این مطالعه تشکر می‌کنند.

References

[1] Powell EE, Wong VW, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease. Lancet. 2021; 397(10290):2212-24. [DOI:10.1016/S0140-6736(20)32511-3] [PMID]

[2] Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. Metabolism. 2019; 92:82-97. [DOI:10.1016/j.metabol.2018.11.014] [PMID]

[3] Zhang J, Guo J, Yang N, Huang Y, Hu T, Rao C. Endoplasmic reticulum stress-mediated cell death in liver injury. Cell Death Dis. 2022; 13(12):1051. [DOI:10.1038/s41419-022-05444-x] [PMID]

[4] Shi P, Zhang Z, Xu J, Zhang L, Cui H. Endoplasmic reticulum stress-induced cell death as a potential mechanism for targeted therapy in glioblastoma (Review). Int J Oncol. 2021; 59(2):60. [DOI:10.3892/ijo.2021.5240] [PMID]

[5] Moslehi A, Nabavizadeh F, Zekri A, Amiri F. Naltrexone changes the expression of lipid metabolism-related proteins in the endoplasmic reticulum stress induced hepatic steatosis in mice. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2017; 44(2):207-12. [DOI:10.1111/1440-1681.12695] [PMID]

[6] Er H, Gemici A, Tas GG, Sati L, Zengin G, Bilmen S, et al. Acetyl-L-carnitine attenuates chronic ethanol-induced oxidative stress, ER stress and apoptosis in rat gastric tissue. Alcohol. 2023; 112:51-9. [DOI:10.1016/j.alcohol.2023.07.003] [PMID]

[7] Keylani K, Arbab Mojeni F, Khalaji A, Rasouli A, Aminzade D, Karimi MA, et al. Endoplasmic reticulum as a target in cardiovascular diseases: Is there a role for flavonoids? Front Pharmacol. 2023; 13:1027633. [DOI:10.3389/fphar.2022.1027633] [PMID]

[8] Li J, Wu W, Xin Y, Zhao M, Liu X. Inhibition of Nogo-B promotes cardiac hypertrophy via endoplasmic reticulum stress. Biomed Pharmacother. 2018; 104:193-203. [DOI:10.1016/j.biopha.2018.05.039] [PMID]

[9] Li T, Jiang S, Lu C, Hu W, Ji T, Han M, et al. Snapshots: Endoplasmic reticulum stress in lipid metabolism and cardiovascular disease. Curr Issues Mol Biol. 2018; 28:14-28. [DOI:10.21775/cimb.028.014] [PMID]

[10] Lee HY, Lee GH, Bhattarai KR, Park BH, Koo SH, Kim HR, et al. Bax inhibitor-1 regulates hepatic lipid accumulation via ApoB secretion. Sci Rep. 2016; 6:27799. [DOI:10.1038/srep27799] [PMID]

[11] Xia B, Li Q, Zheng K, Wu J, Huang C, Liu K, et al. Down-regulation of Hrd1 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by regulating PPARα to prevent oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and cellular apoptosis. Eur J Pharmacol. 2023; 954:175864. [DOI:10.1016/j.ejphar.2023.175864] [PMID]

[12] Xue H, Wei M, Ji L. Chlorogenic acids: A pharmacological systematic review on their hepatoprotective effects. Phytomedicine. 2023; 118:154961. [DOI:10.1016/j.phymed.2023.154961] [PMID]

[13] Ma K, Li F, Zhe T, Sun X, Zhang X, Wan P, et al. Biopolymer films incorporated with chlorogenic acid nanoparticles for active food packaging application. Food Chem. 2024; 435:137552. [DOI:10.1016/j.foodchem.2023.137552] [PMID]

[14] Alsalamah SA, Alghonaim MI, Jusstaniah M, Abdelghany TM. Anti-yeasts, antioxidant and healing properties of henna pre-treated by moist heat and molecular docking of its major constituents, chlorogenic and ellagic acids, with candida albicans and geotrichum candidum proteins. Life (Basel). 2023; 13(9):1839. [DOI:10.3390/life13091839] [PMID]

[15] Gu T, Zhang Z, Liu J, Chen L, Tian Y, Xu W, et al. Chlorogenic acid alleviates LPS-induced inflammation and oxidative stress by modulating CD36/AMPK/PGC-1α in RAW264. 7 macrophages. Int J Mol Sci. 2023; 24(17):13516. [DOI:10.3390/ijms241713516] [PMID]

[16] Hamad RS, El Sherif F, Al Abdulsalam NK, Abd El-Moaty HI. Chlorogenic acid derived from moringa oleifera leaf as a potential antiinflammatory agent against cryptosporidiosis in mice. Trop Biomed. 2023; 40(1):45-54. [DOI:10.47665/tb.40.1.010] [PMID]

[17] Komeili Movahhed T, Moslehi A, Golchoob M, Ababzadeh S. Allantoin improves methionine-choline deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in mice through involvement in endoplasmic reticulum stress and hepatocytes apoptosis-related genes expressions. Iran J Basic Med Sci. 2019; 22(7):736-44. [DOI:10.22038/ijbms.2019.33553.8012] [PMID]

[18] Moslehi A, Komeili-Movahhed T, Ahmadian M, Ghoddoosi M, Heidari F. Chlorogenic acid attenuates liver apoptosis and inflammation in endoplasmic reticulum stress-induced mice. Iran J Basic Med Sci. 2023; 26(4):478-85. [DOI:10.22038/IJBMS.2023.66827.14659] [PMCID]

[19] Ma Y, Gao M, Liu D. Chlorogenic acid improves high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice. Pharm Res. 2015; 32(4):1200-9. [DOI:10.1007/s11095-014-1526-9] [PMID]

[20] Lee JS, Zheng Z, Mendez R, Ha SW, Xie Y, Zhang K. Pharmacologic ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in an animal model. Toxicol Lett. 2012; 211(1):29-38. [DOI:10.1016/j.toxlet.2012.02.017] [PMID]

[21] Kim M, Yoo G, Randy A, Son YJ, Hong CR, Kim SM, et al. Lemon balm and its constituent, rosmarinic acid, alleviate liver damage in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis. Nutrients. 2020; 12(4):1166. [DOI:10.3390/nu12041166] [PMID]

[22] Zhu Z, Pu J, Li Y, Chen J, Ding H, Zhou A, et al. RBM25 regulates hypoxic cardiomyocyte apoptosis through CHOP-associated endoplasmic reticulum stress. Cell Stress Chaperones. 2023; 28(6):861-76. [DOI:10.1007/s12192-023-01380-7] [PMID]

[23] Komeili-Movahhed T, Heidari F, Moslehi A. Chlorogenic acid alleviated testicular inflammation and apoptosis in tunicamycin induced endoplasmic reticulum stress. Physiol Int. 2023; 110(1):19-33. [DOI:10.1556/2060.2023.00132] [PMID]

[24] Li L, Jin RJ, Ji L. Pachymic acid ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis through inhibiting endoplasmic reticulum stress in rats. Environ Toxicol. 2023 May 10. [DOI:10.1002/tox.23824] [PMID]

[25] Moslehi A, Farahabadi M, Chavoshzadeh SA, Barati A, Ababzadeh S, Mohammadbeigi A. The effect of amygdalin on

Endoplasmic Reticulum (ER) stress induced hepatic steatosis in mice. Malays J Med Sci. 2018; 25(1):16-23. [DOI:10.21315/mjms2018.25.1.3] [PMID]

[26] Wang X, Han X, Li M, Han Y, Zhang Y, Zhao S, et al. Ticagrelor protects against AngII-induced endothelial dysfunction by alleviating endoplasmic reticulum stress. Microvasc Res. 2018; 119:98-104. [DOI:10.1016/j.mvr.2018.05.006] [PMID]

[27] Li W, Li W, Leng Y, Xiong Y, Xia Z. Ferroptosis Is involved in diabetes myocardial ischemia/reperfusion injury through endoplasmic reticulum stress. DNA Cell Biol. 2020; 39(2):210225. [DOI:10.1089/dna.2019.5097] [PMID]

[28] Kazaz IO, Demir S, Kerimoglu G, Colak F, Turkmen Alemdar N, Yilmaz Dogan S, et al. Chlorogenic acid ameliorates torsion/detorsion-induced testicular injury via decreasing endoplasmic reticulum stress. J Pediatr Urol. 2022; 18(3):289.e1-7. [DOI:10.1016/j.jpurol.2022.02.013] [PMID]