

تأثیر پوست انار و آتورواستاتین بر عوامل التهابی و انتقال گلوکز ۴ در سلول‌های فیبروبلاست بافت چربی

بهنوش اعتمادی کرمانی^۱، فرزانه جوداله‌زاده^۱، آتوسا مرادزادگان^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: عصاره‌ی پوست انار (PPE (Pomegranate peel extract، فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی را با کاربردهای درمانی بالقوه نشان می‌دهد. در این مطالعه، خواص آنتی‌اکسیدانی ترکیب آتورواستاتین و PPE، تأثیر این ترکیب بر تنظیم عوامل التهابی و مسیر ژنی تنظیم انتقال گلوکز (GLUT4) در سلول‌های فیبروبلاست بافت چربی (3T3-L1) مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: این پژوهش به صورت توصیفی-تحلیلی انجام شد. درصد بقای سلولی پس از تیمار با غلظت‌های مناسب عصاره‌ی آبی پوست انار (Aqueous extract of pomegranate peel) و داروی آتورواستاتین به دست آمد. میزان سیتوکین‌های التهابی IL-1، IL-6 و TNF- α در محلول رویی سلول‌های تیمار شده با استفاده از روش الایزا اندازه‌گیری شد. سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی و در نهایت بیان GLUT4 با استفاده از تکنیک Real-time PCR اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به ترکیب AEPP با آتورواستاتین است. همچنین سطح سیتوکین‌های IL-1، TGF-B و IL-6 افزایش یافت. علاوه بر این، آتورواستاتین به طور قابل توجهی سطح GLUT4 را در سلول‌های چربی در مقایسه با ترکیب غلظت آتورواستاتین و AEPP و همچنین AEPP به تنهایی افزایش می‌دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که استفاده ترکیبی از AEPP و داروی آتورواستاتین می‌تواند کارایی مسیرهای آنتی‌اکسیدانی را در سلول بهبود بخشد و سطح اکسیژن فعال را به میزان قابل توجهی کاهش دهد. علاوه بر این، آتورواستاتین در مقایسه با ترکیب غلظت آتورواستاتین و AEPP، تأثیر بیشتری بر تنظیم عملکرد عوامل التهابی و مسیر ژنی تنظیم‌کننده‌ی انتقال گلوکز ۴ (GLUT4) چربی دارد. با این حال، مطالعات بیشتری در این زمینه مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: آتورواستاتین؛ اینترلوکین؛ عصاره‌ی آبی پوست انار؛ انتقال گلوکز ۴ (GLUT4)

ارجاع: اعتمادی کرمانی، بهنوش، جوداله‌زاده فرزانه، مرادزادگان آتوسا. تأثیر پوست انار و آتورواستاتین بر عوامل التهابی و انتقال گلوکز ۴ در

سلول‌های فیبروبلاست بافت چربی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۳؛ ۴۲ (۷۵۸): ۱۳۹-۱۳۲

مقدمه

انار، میوه‌ای است که به دلیل داشتن ترکیبات زیست فعال ارزشمند از دیرباز مورد توجه بوده است (۱). محل کشت اصلی این میوه در آسیا، شمال آفریقا و نواحی مدیترانه است ولی امروزه در همه جا موجود می‌باشد (۲). مطالعات نشان می‌دهد که پوست انار دارای مواد پلی‌فنل بیشتری نسبت به سایر قسمت‌ها است (۳). اجزای مهم انار شامل پونیکالازین، آنتوسیانین‌ها و فلاونول‌ها است که به انار خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌بخشد (۴). علاوه بر این، انار به دلیل خواص درمانی آن در بیماری‌هایی مانند اثرات ضد التهابی، تصلب شرایین، دیابت و سرطان نیز مورد توجه قرار گرفته است (۵-۹). مطالعه روی

۶۲ نوع نوشیدنی در کره نشان داد که آب انار دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی است (۱۰). سطح بالای فعالیت آنتی‌اکسیدانی انار را به یک میوه خاص تبدیل می‌کند و در صنعت مشتقات انار کاربردهای متفاوتی دارد، به عنوان مثال در صنایع تکمیلی از ضایعات پوست آن برای تولید کپسول‌های فنلی غلیظ استفاده می‌شود (۱۱). علاوه بر این، بسیاری از مطالعات خواص ضد میکروبی پوست انار را گزارش کرده‌اند (۱۲). علاوه بر این، از ضایعات انار برای تهیه فرآورده‌های گوشتی از جمله جلوگیری از رشد باکتری‌ها و فرایندهای اکسیداسیون استفاده می‌شود (۱۱، ۱۳، ۱۴).

ایران به همراه هند، چین، ترکیه، افغانستان و ایالات متحده

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تجربی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

۲- استادیار، گروه علوم تجربی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: آتوسا مرادزادگان؛ استادیار، گروه علوم تجربی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

آماده‌سازی نمونه: انار مورد نیاز با ژنوتیپ پوست سیاه ابرندآباد یزد از یک باغ تحقیقاتی در شهرستان شاهدیه (استان یزد) ایران تهیه شد. پوست آن جدا، در سایه خشک و سپس پودر گردید. با استفاده از دستگاه سوکسله و حلال حاوی مخلوطی از متانول (۸۰ درصد)، آب مقطر (۱۹ درصد) و اسید کلریدریک معمولی (۱/۵ درصد) با نسبت ۱:۱۵، عصاره‌ی انار به آرامی استخراج شد و عصاره‌ی حاصل از طریق کاغذ واتمن فیلتر شد. سپس برای تبخیر حلال، عصاره به دست آمده را در حمام آب گرم با دمای بین ۳۰ تا ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده و پس از تبخیر کامل حلال، عصاره به دست آمده را وزن کرده و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

کشت سلولی: رده‌ی سلولی فیبروبلاست بافت چربی (3T3-L1) از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران، ایران تهیه شد و در محیط کشت DMEM ۱۰ درصد سرم جنین گاو و یک درصد آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین/پنی‌سیلین کشت داده شد. سلول‌ها در شرایط استاندارد دی‌اکسید کربن ۵ درصد، دمای ۳۷ درجه و رطوبت ۸۰ درصد در انکوباتور قرار گرفتند.

شرایط رشد و نگهداری مناسب سلول‌ها از جمله pH، دما، اکسیژن و دی‌اکسید کربن کنترل شد. سرم حاوی فاکتورهای رشد، عوامل تنظیم‌کننده و هورمون‌های رشد مناسب برای سلول‌ها به محیط کشت اضافه شد.

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH: ترکیب عصاره‌ی آبی انار (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و داروی آتورواستاتین (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) با BHA (۵۰ ppm) به لوله آزمایش اضافه شد. حجم با افزودن MeOH به ۱۰۰ میکرولیتر رسید و سپس ۵ میلی‌لیتر محلول DPPH نیز به لوله اضافه گردید. لوله آزمایش به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس تغییرات جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

بررسی MTT assay: تعداد 3×10^4 سلول فیروبلات 3T3-L1 در هر چاهک از یک صفحه ۹۶ تایی کشت شد و سپس محیط کشت به حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر رسید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط ۵ درصد دی‌اکسید کربن، رطوبت ۸۰ درصد و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، محیط کشت قدیمی سلول‌ها از هر چاهک برداشته شد و محیط کشت (بدون سرم) حاوی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی پوست انار و داروی آتورواستاتین اضافه شد.

آمریکا یکی از بزرگترین تولیدکنندگان انار در جهان است (۱۵). بررسی‌ها نشان می‌دهد که احتمالاً انار برای اولین بار در ایران کشت شده و از طریق تجارت به کشورهای دیگر مانند کشورهای مدیترانه‌ای، پاکستان، هند، چین و افغانستان راه یافته است (۱۶، ۱۷). چاقی و اختلالات متابولیک از مشکلات مهم جوامع امروزی است. مطالعات نشان می‌دهد که ترکیبات پلی‌فنلی می‌توانند با کاهش سنتز اسیدهای چرب، مهار تمایز سلول‌های چربی و افزایش مصرف انرژی، نقش مهمی در کنترل چاقی و اختلالات مرتبط با آن ایفا کنند (۱۸، ۱۹). تنظیم گلوکز خون از طریق هورمون انسولین و جذب گلوکز توسط عضلات اسکلتی انجام می‌شود. عضله‌ی اسکلتی با استفاده از GLUT4 انسولین را جذب می‌کند (۲۰). ژن‌های تنظیم‌کننده مهمی مانند ژن‌های آدیپونکتین، *GLUT4*، *PPAR γ* و *FABP4* در متابولیسم چربی و گلوکز نقش دارند. مطالعات نشان می‌دهد که پوست انار با خواص زیست‌فعال خود می‌تواند بیان ژن‌های دخیل در چاقی و دیابت را تنظیم کند (۲۱).

استاتین‌ها، مهارکننده‌های ردوکتاز ۳ هیدروکسی ۳ متیل گلوکوتاریل کو آنزیم A (HMGCoA)، دسته‌ای از داروها هستند که با مهار آنزیم HMG CoA ردوکتاز (آنزیم سنتزکننده‌ی کلسترول) به منظور کاهش سطح کلسترول استفاده می‌گردند (۲۲).

در این مطالعه، پوست انار ساوه ایرانی را مورد بررسی قرار دادیم و پس از بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی آن، اثر عصاره‌ی آبی آن را به همراه داروی آتورواستاتین بر مسیرهای التهابی و بیان ژن *GLUT4* در سلول‌های فیبروبلاست بافت چربی بررسی کردیم.

روش‌ها

مواد شیمیایی: Trolox، 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl، EDTA از شرکت DPPH و اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) از شرکت شیمیایی (Pool, Sigma-Aldrich UK) تهیه شد. رده‌ی سلولی 3T3-L1 از انستیتو پاستور تهران، ایران خریداری شد. سرم جنین گاو (FBS)، محیط Eagle اصلاح شده (DMEM) Dulbecco و آنتی‌بیوتیک‌ها (پنی‌سیلین و استرپتومایسین) از شرکت Gibco، ایالات متحده تهیه شد. کیت‌های *IL-1*، *IL-6*، *TNF- α* ELISA و کیت‌های سنجش MDA از طب پژوهان رازی (TPR)، ایران خریداری شد. پرایمرها از شرکت پیشگام ایران تهیه شد (جدول ۱).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

GENE	Sequence (5'→3')	Product length	Annealing Tm	
ACTB	F: 5'→3'	ACCCAGCACAATGAAGATCAAGA	175	60
	R: 5'→3'	ACAGTCCGCCTAGAAGCATTTG		
GLU4	F: 5'→3'	GGGCCAGATGAGAACGACT	206	60.94
	R: 5'→3'	GTCACACGAGGGGAATGAGG		

نانو قطره (Thermo SCIENTIFIC) و الکتروفورز بررسی شد. ۵۰۰ نانوگرم RNA با استفاده از کیت رونویسی معکوس (Amplisense، روسیه، K3-4-100-CE) به cDNA تبدیل شد. واکنش‌های RT-PCR با استفاده از یک دستگاه Applied Biosystems™ 7500 (ABI، ایالات متحده آمریکا) با ترکیب اصلی SYBR Green (RealQ Plus 2x Master Mix Green Amplicon) و در شرایط دمایی - زمانی به شرح زیر انجام شد: دناتوراسیون در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ چرخه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، و گسترش در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. نتایج با ژن اکتین بتا (ACTB) به عنوان ژن مرجع، نرمال شد. طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner انجام گردید و سپس با استفاده از پایگاه‌های داده‌ی ITD و Primer Blast تأیید شد.

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شد و برای مقایسه داده‌ها در محیط نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه‌ی ۸ از ANOVA یک طرفه استفاده شد. برای بررسی وجود رابطه‌ی خطی بین میزان عصاره‌ی پوست انار و سطوح سیتوکین‌های مورد بررسی، از آزمون رگرسیون خطی استفاده گردید و $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. تمام نمونه‌ها در سه تکرار آنالیز شدند. این مقاله با کد اخلاق IR.IAU.D.REC.1401.016 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد دزفول به تصویب رسیده است

یافته‌ها

نتایج آزمون MTT برای سه ماده عصاره‌ی پوست انار به تنهایی، داروی آنترواستاتین به تنهایی و ترکیب هر دو نشان داد که بیشترین کاهش دوز زنده‌مانی سلول‌های فیروبلاست بافت چربی، به ترتیب برابر با ۱ ($P < 0/01$) (***)، ۲۰ ($P < 0/01$) (**) و ۱۰۱ ($P < 0/01$) (**) میکروگرم در میلی‌لیتر بود ($P < 0/1$) (شکل ۱). علاوه بر این، نتایج آزمایش ROS با کاهش همراه بود که نشان می‌دهد این ترکیب می‌تواند به طور مؤثر سطح گونه‌های اکسیژن فعال را کاهش دهد ($P < 0/05$) (شکل ۲).

سطح IL-1 β در گروه تحت تیمار با عصاره‌ی پوست انار به طور قابل توجهی افزایش یافت ($P < 0/01$) (***) (شکل ۳). سطح سیتوکین IL-1 در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر داروی آنترواستاتین، غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر AEPP به تنهایی و ترکیب غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر AEPP با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر داروی آنترواستاتین به ترتیب برابر با ۲۱/۵۴ pg/ml، ۴۷/۸۴ pg/ml و ۳۶/۶۳ pg/ml بود (شکل ۳-A). سطح IL-6 نیز در هر سه گروه به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($P < 0/01$) (***) (شکل ۳-B).

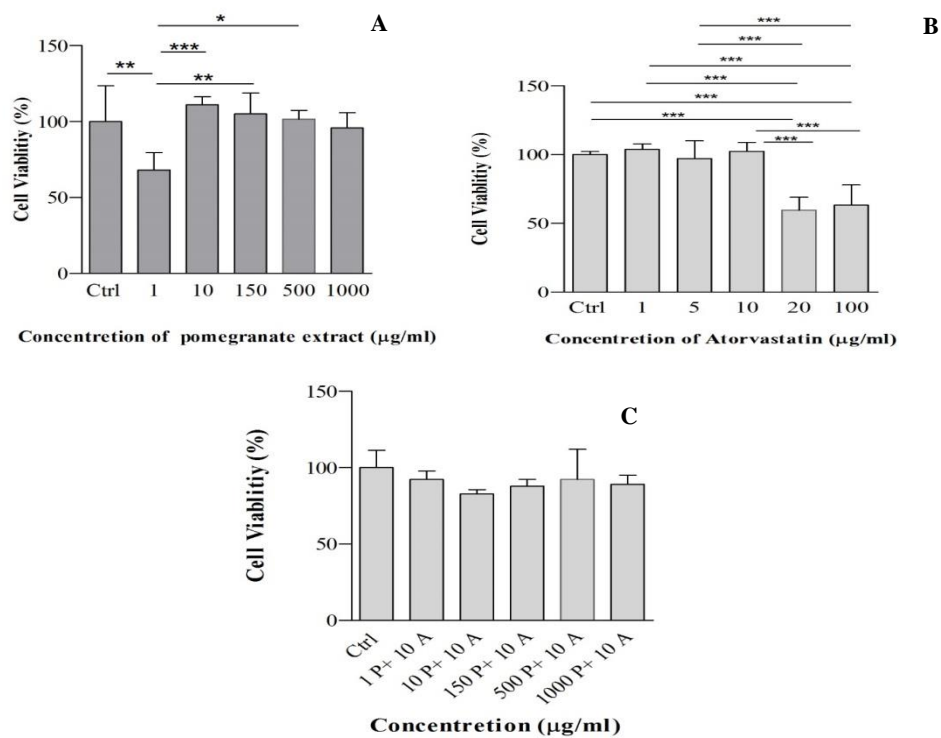
پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت، ۵ میکرولیتر محلول MTT (۳-۴،۵-دی-متیل تیازول-۲-یل)-۲،۵-دی-فنیل تترازولیوم) با غلظت ۵ mg/ml به هر چاهک اضافه شد. پس از تشکیل کریستال آبی تیره، محتویات هر چاهک حذف و پس از شستشو با PBS، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به آن اضافه شد. برای حل کامل رسوب، پلیت به مدت ۲-۴ ساعت در تاریکی در دمای اتاق انکوبه شد. در این آزمایش از محیط کشت به عنوان بلانک و از محیط کشت حاوی سلول‌ها به عنوان شاهد استفاده شد. جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از پلیت ریدر (Biotek، ایالات متحده آمریکا) اندازه‌گیری شد. این آزمایش ۳ بار تکرار گردید و برای هر غلظت ۳ چاه (۳ بار) در نظر گرفته شد.

فعالیت حذف رادیکال سوپراکسید: فعالیت سوپراکسید دسموتاز (SOD) را می‌توان با سنجش فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری کرد. در روش بیوشیمیایی، گزانتین-گزانتین اکسیداز برای تولید O₂-• و کاهش تترازوم نیتروبلو (NBT) به عنوان شاخص تولید O₂-• استفاده می‌شود. SOD با NBT برای ۵-۱۰ رقابت خواهد کرد. درصد کاهش NBT اندازه‌گیری مقدار SOD موجود است. برای انجام این آزمایش، عصاره (۵۰ میکرولیتر)، دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) (۳۰ میکرولیتر)، گزانتین اکسیداز (۰/۴ واحد در میلی‌لیتر) (۵۰ میکرولیتر)، ۴/۵ DMPO (۲۰ میکرولیتر)، ۴ میلی‌مولار هیپوگزانتین (۵۰ میکرولیتر) شدند. در لوله مخلوط شده و سپس به سلول مسطح کوارتز (ظرفیت ۲۰۰ میکرولیتر) منتقل شده و طیف ESR ثبت شد.

اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید: اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید (MDA) (Malondialdehyde) به طور خاص به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی استفاده می‌شود. در این مطالعه از کیت سنجش MDA شرکت طب پژوهان رازی (TPR) ایران استفاده گردید و تست طبق دستورالعمل کیت سازنده انجام شد. طبق پروتکل سازنده، رنگ صورتی از واکنش اسید تیوباربتوریک با MDA تولید می‌شود. جذب با استفاده از اسپکتروفتومتر (Jena, Analytik Jena@، آلمان) در طول موج ۵۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری سطح IL-1، IL-6 و TNF- α : میزان سیتوکین‌های التهابی IL-1، IL-6 و TNF- α در محلول رویی سلول‌های تیمار شده با استفاده از کیت الایزا کارمانیا پارس ژن، ایران که بر اساس دو آنتی‌بادی Sandwich ELISA طراحی شده بود، با حساسیت ۲ pg/ml اندازه‌گیری شد.

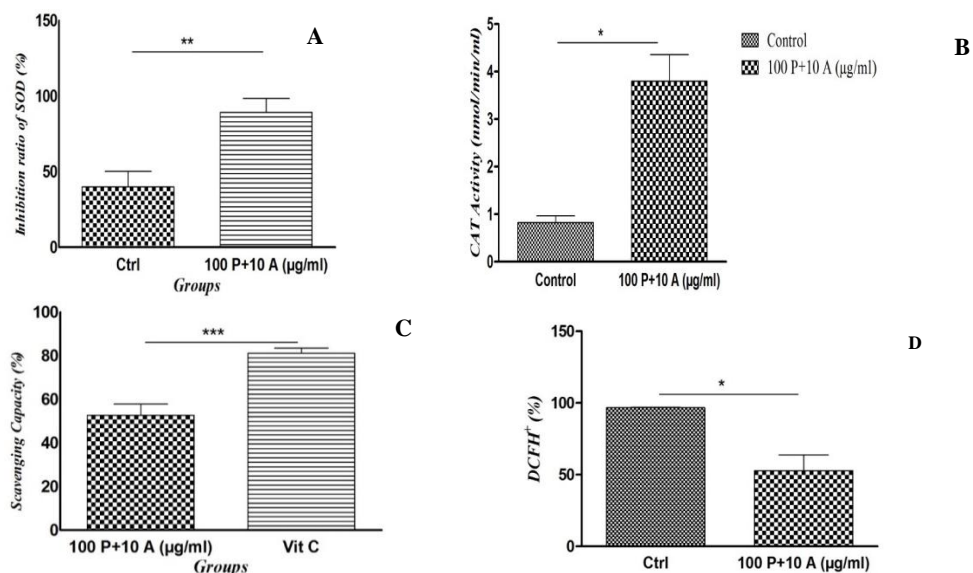
استخراج RNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR): استخراج RNA توسط معرف TRIZol (Invitrogen USA)، از سلول‌های بافت چربی تیمار شده با عصاره‌ی پوست انار، انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از دستگاه



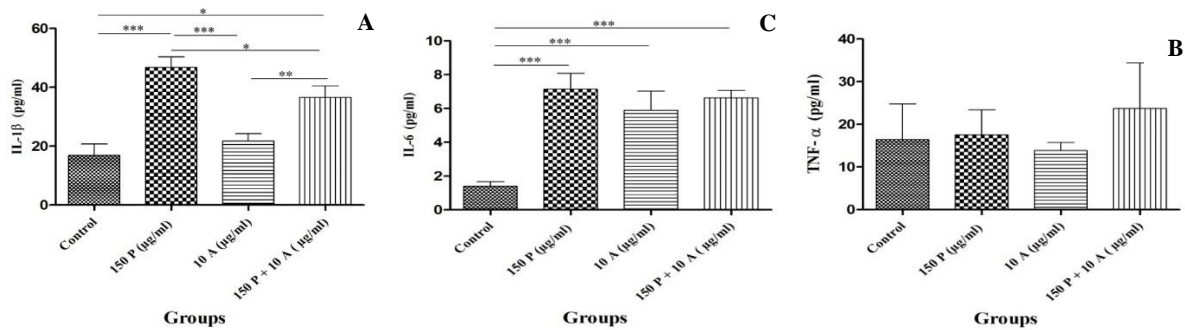
شکل ۱. اثر عصاره پوست انار در غلظت‌های مختلف بر روی رده سلولی فیروبلاست بافت چربی (3T3-L1). دوز مؤثر برای عصاره پوست انار، داروی آتورواستاتین و ترکیبی از آنها به ترتیب، برابر با $1 \mu\text{g/ml}$ (A)، $20 \mu\text{g/ml}$ (B) و $10 \mu\text{g/ml}$ (10 A + 10 B) (C) بود.

معنی‌دار نبود. بر اساس نتایج ELISA، میانگین سطح سیتوکین $\text{TNF-}\alpha$ برای داروی آتورواستاتین، AEPP و ترکیب آتورواستاتین و AEPP به ترتیب برابر با $13/86 \text{ pg/ml}$ ، $17/49 \text{ pg/ml}$ ، $23/7 \text{ pg/ml}$ بود (شکل ۳-C).

علاوه بر این، در سلول‌های تیمار شده با آتورواستاتین، غلظت $\text{TNF-}\alpha$ کاهش یافته، در حالی که دو گروه دیگر افزایش سطح $\text{TNF-}\alpha$ را نشان دادند. اما در هر سه گروه این تفاوت با گروه شاهد



شکل ۲. نتایج افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (A) ($P < 0/01$)، کاتالاز (B) ($P < 0/05$) و DPPH را نشان می‌دهد (C) ($P < 0/05$) سطح اکسیژن فعال در حضور ماده ترکیبی عصاره پوست انار و داروی آتورواستاتین در رده سلولی فیروبلاست بافت چربی (3T3-L1) در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته است (D) ($P < 0/05$).



شکل ۳. اثر ترکیبی عصاره‌ی آبی انار و داروی آتورواستاتین بر سطوح IL-1, IL-6, TNF-α در هر سه گروه تیمار شده، افزایش معنی‌داری داشت. این افزایش برای IL-1 (A) و IL-6 (B) معنی‌دار بود. اما برای TNF-α (C) معنی‌دار نبود ($P < 0/05$).

رادیکال DPPH (Diphenyl picrylhydrazyl) برای بررسی اثر ترکیبی پوست انار و داروی آتورواستاتین افزایش یافت که نشان‌دهنده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالای این ترکیب است. مطالعات نشان می‌دهد که پوست انار به دلیل وجود ترکیباتی مانند فنل، تانن و فلاونوئیدها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی بالایی است و روش خشک برای حفظ این ترکیبات در عصاره بهتر است (۲۳).

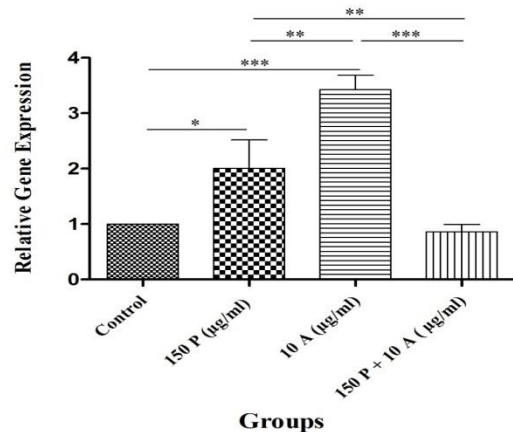
علاوه بر این مشخص شده است که پوست انار، دارای بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی در بین سایر مشتقات انار است و بیشترین میزان فعالیت فنلی نیز در عصاره‌ی آبی پوست انار مشاهده می‌شود که با نتایج این مطالعه مطابقت داشت (۲۴).

ماکروفاژها و مونوسیت‌ها TNF-α را آزاد می‌کنند که منجر به شروع یک آبشار التهابی و تولید سیتوکین‌هایی مانند IL-6 و IL-1 می‌شود. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که با افزایش سطح TNF-α، میزان سایر سیتوکین‌های التهابی نیز افزایش می‌یابد.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که معمولاً تحت تأثیر عصاره‌های مختلف به‌دست آمده از انار، سطح سیتوکین‌های التهابی کاهش می‌یابد، در حالی که در این مطالعه شاهد افزایش سطح آن‌ها بودیم که می‌تواند نشان‌دهنده‌ی اثربخشی دوز باشد (۲۵، ۲۶). این بدان معنی است که استفاده‌ی بیش از حد از عصاره به تنهایی یا همراه با آتورواستاتین می‌تواند اثرات نامطلوبی داشته باشد.

از انار برای درمان اختلالات متابولیکی مانند دیابت در طب یونانی و کشورهای اسلامی استفاده شده است (۲۷). ناقل گلوکز ۴ (GLUT4) در کنترل سطح قند خون نقش دارد. مشخص شده است که سطح بیان این ژن در افراد مقاوم به انسولین افزایش می‌یابد (۲۸). مطالعات قبلی نشان می‌داد که عصاره‌ی پوست انار می‌تواند با تنظیم سطح بیان این ژن به کنترل مقاومت به انسولین کمک کند (۲۸). در این مطالعه اثر عصاره‌ی پوست انار و داروی آتورواستاتین، هر کدام به تنهایی منجر به افزایش بیان ژن GLUT4 گردید، در حالی که استفاده همزمان هر دو باهم اثر کاهش‌دهنده‌ی

بر اساس تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از کمی‌سازی بیان ژن *GLUT4* در Real-time PCR، بیان *GLUT4* در گروه غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آتورواستاتین نسبت به گروه شاهد، ۳/۴۱ برابر افزایش یافته است. بیان آن افزایش ۱/۲ برابری غلظت ۱۵۰ میکروگرم AEPP را نسبت به گروه شاهد نشان داد. در نهایت بیان *GLUT4* در ترکیب غلظت آتورواستاتین و عصاره‌ی آبی پوست انار نسبت به گروه شاهد ۰/۸ برابر تغییر کرد. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که آتورواستاتین به‌طور قابل توجهی، سطوح mRNA *GLUT4* را در سلول‌های چربی افزایش می‌دهد (شکل ۴).



شکل ۴. تأثیر عصاره‌ی آبی انار و داروی آتورواستاتین بر سطح بیان ژن *GLUT4* در این نمودار نشان می‌دهد که میزان *GLUT4* در گروه تیمار شده با داروی آتورواستاتین به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است ($P < 0/05$).

بحث

نتایج آزمایش‌های فعالیت کاتالاز (CAT (Catalase)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD (Superoxide dismutase) و اندازه‌گیری فعالیت مهار

خواص آنتی‌اکسیدانی است و می‌تواند به عنوان یک مکمل غذایی در رژیم غذایی روزانه و همچنین به عنوان یک افزودنی غذایی تأیید شده در کارخانه‌های مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد. از سوی دیگر، با تنظیم سطح بیان ژن GLUT4، عصاره می‌تواند در حذف گلوکز از خون و کنترل اختلالات متابولیک مانند دیابت مفید باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مصوب شورای پژوهش طرح‌های دانشگاه آزاد اسلامی دزفول می‌باشد و با حمایت مالی و معنوی این دانشگاه انجام گرفته است.

داشته که می‌تواند به علت تداخل ماده‌ی مؤثر آن‌ها باشد با این وجود نتیجه‌گیری قطعی نیاز به مطالعه و تحقیق بیشتر دارد. علاوه بر این، عصاره‌ی پوست انار می‌تواند به جذب و انتقال گلوکز به بافت‌های عضلانی کمک کند و از این طریق برای کنترل قند خون مفید است (۲۹). نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده‌ی درمانی از دوز بالای عصاره‌ی آبی پوست انار می‌تواند بیان GLUT4 را افزایش دهد و عملکرد بهینه‌ی عصاره به دوز بستگی دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعات ما نشان داد که عصاره‌ی آبی پوست انار سرشار از

References

- Tang F. Metabolic profiling of complex mixtures using novel NMR-based approaches and chemometrics: Pomegranate juice as a case study [Thesis]. Columbus, OH: Graduate Program in Food Science and Technology: The Ohio State University; 2020.
- Noormohammadi Z, Fasihee A, Homaee-Rashidpoor S, Sheidai M, Baraki SG, Mazooji A, et al. Genetic variation among Iranian pomegranates (*Punica granatum*L.) using RAPD, ISSR and SSR markers. *Australian Journal of Crop Science* 2012; 6(2): 268-75.
- Bassiri-Jahromi S. *Punica granatum* (Pomegranate) activity in health promotion and cancer prevention. *Oncol Rev* 2018; 12(1).
- Khan MS, Ahmad I. Herbal medicine: current trends and future prospects. *New Look to Phytomedicine* 2019; 3-13.
- Vučić V, Grabež M, Trchounian A, Arsić A. Composition and potential health benefits of pomegranate: a review. *Curr Pharm Des* 2019; 25(16): 1817-27.
- Wong TL, Strandberg KR, Croley CR, Fraser SE, Venkata KC, Fimognari C, et al. Pomegranate bioactive constituents target multiple oncogenic and oncosuppressive signaling for cancer prevention and intervention. *Semin Cancer Biol* 2021; 73: 265-93.
- Kalaycıoğlu Z, Erim FB. Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide. *Food chemistry*. 2017;221:496-507.
- Kojadinovic MI, Arsic AC, Debeljak-Martacic JD, Konic-Ristic AI, Kardum ND, Popovic TB, et al. Consumption of pomegranate juice decreases blood lipid peroxidation and levels of arachidonic acid $\gamma\gamma$ in women with metabolic syndrome. *J Sci Food Agric* 2017; 97(6): 1798-804.
- Razani Z, Dastani M, Kazerani HR. Cardioprotective effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice in patients with ischemic heart disease. *Phytother Res* 2017; 31(11): 1731-8.
- Kim JM, Jo YJ, Hahn D. Physicochemical properties, bioactive composition and antioxidant activities of noni fruit juices from different regions of cultivation. *Korean J Food Preserv* 2017; 24(7): 1000-6.
- Turgut SS, Soyer A, Işıkcı F. Effect of pomegranate peel extract on lipid and protein oxidation in beef meatballs during refrigerated storage. *Meat Sci* 2016; 116: 126-32.
- Sadeghi-Kiakhani M, Tehrani-Bagha AR, Gharanjig K, Hashemi E. Use of pomegranate peels and walnut green husks as the green antimicrobial agents to reduce the consumption of inorganic nanoparticles on wool yarns. *J Clean Prod* 2019; 231: 1463-73.
- Gullón P, Astray G, Gullón B, Tomasevic I, Lorenzo JM. Pomegranate peel as suitable source of high-added value bioactives: Tailored functionalized meat products. *Molecules* 2020; 25(12): 2859.
- Paul A, Radhakrishnan M. Pomegranate seed oil in food industry :Extraction, characterization, and applications. *Trends in Food Science & Technology* 2020; 105: 273-83.
- Kahramanoglu I, Usanmaz S. Pomegranate production and marketing. Boca Raton, FL: C RC Press; 2016.
- Vincent L, Anushma PL, Vasugi C, Rekha A, Shiva B. Genetic Resources of tropical fruits. In: Rajasekharan P, Rao V. Editors. Conservation and Utilization of Horticultural Genetic Resources. Berlin, Germany: Springer; 2019. p. 79-116.
- Hussain SZ, Naseer B, Qadri T, Fatima T, Bhat TA. Pomegranate (*Punica granatum*)—Morphology, Taxonomy, Composition and Health Benefits. In: Hussain SZ, Naseer B, Qadri T, Fatima T, Ahmad Bhat T. Editors. Fruits Grown in Highland Regions of the Himalayas: Nutritional and Health Benefits. Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 131-44.
- Stohs SJ, Badmaev V. A review of natural stimulant and non-stimulant thermogenic agents. *Phytother Res* 2016; 30(5): 732-40.
- Okumuş E, Bakkalbaşı E, Javidipour I, Meral R, Ceylan Z. A novel coating material: Ellagitannin-loaded maltodextrin and lecithin-based nanomaterials. *Food Bioscience* 2021; 42: 101158.
- Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 2001; 104(4): 517-29.

21. Abo-Saif MA, Ragab AE, Ibrahim AO, Abdelzaher OF, Mehanyd AB, Saber-Ayad M, El-Feky OA. Pomegranate peel extract protects against the development of diabetic cardiomyopathy in rats by inhibiting pyroptosis and downregulating LncRNA-MALAT1. *Front Pharmacol* 2023; 14: 1166653.
22. Özcan ÖU, Güleç S. Heterozygous familial hypercholesterolemia. *Turk Kardiyol Dern Ars* 2014; 42(2): 10-18.
23. Mphahlele RR, Fawole OA, Makunga NP, Opara UL. Effect of drying on the bioactive compounds, antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. *BMC Complement Altern Med* 2016; 16: 143.
24. Kumar N. Study on physico-chemical and antioxidant properties of pomegranate peel. *J Pharmacogn Phytochem* 2018; 7(3): 2141-7.
25. Baradaran Rahimi V, Ghadiri M, Ramezani M, Askari VR. Antiinflammatory and anti-cancer activities of pomegranate and its constituent, ellagic acid: Evidence from cellular, animal, and clinical studies. *Phytotherapy research* 2020; 34(4): 685-720.
26. Colombo E, Sangiovanni E, Dell'Agli M. A review on the anti-inflammatory activity of pomegranate in the gastrointestinal tract. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 247145.
27. Ahmed D, Sharma M, Mukerjee A, Ramteke PW, Kumar V. Improved glycemic control, pancreas protective and hepatoprotective effect by traditional poly-herbal formulation "Qurs Tabasheer" in streptozotocin induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med* 2013; 13: 10.
28. van Gerwen J, Shun-Shion AS, Fazakerley DJ. Insulin signalling and GLUT4 trafficking in insulin resistance. *Biochem Soc Trans* 2023; 51(3): 1057-69.
29. Zhang X, Du L, Zhang W, Yang M, Chen L, Hou C, Li J. Pomegranate peel polyphenols alleviate insulin resistance through the promotion of insulin signaling pathway in skeletal muscle of metabolic syndrome rats. *Food Sci Hum Wellness* 2022; 11(4): 1076-85.

Effects of Pomegranate Peel and Atorvastatin on the Inflammatory Factors and the Glucose Transport 4 in 3T3-L1 Cell Line

Behnoosh Etemadi Kermani¹, Farzaneh Joudalahzadeh¹, Atousa Moradzadegan²

Original Article

Abstract

Background: Pomegranate peel extract (PPE) exhibits biological activities with potential therapeutic applications. In this research, the antioxidant properties of the combination of atorvastatin and PPE, and the effect of this combination on the regulation of inflammatory factors and the gene pathway of glucose transport regulation (GLUT4) in tissue fibroblast cells (3T3-L1).

Methods: This research was done in a descriptive-analytical way. The percentage of cell survival after treatment with suitable concentrations of aqueous extract of pomegranate peel (AEPP) and atorvastatin drug was obtained. The amount of inflammatory cytokines IL-1, IL-6, and TNF- α in the supernatant solution of treated cells was measured using the ELISA method. Then the antioxidant activity and GLUT4 expression were measured using real-time PCR.

Findings: The highest antioxidant capacity is related to the combination of AEPP with atorvastatin. Also, the level of IL-1, TGF-B, and IL-6 cytokines increased. Furthermore, atorvastatin significantly increased the level of GLUT4 in adipocytes compared to the combination of atorvastatin and AEPP concentration, as well as AEPP alone.

Conclusion: The results showed that the combined use of AEPP and Atorvastatin can improve the efficiency of antioxidant pathways in the cell and significantly reduce the level of reactive oxygen. In addition, atorvastatin has a greater effect on regulating the function of inflammatory factors and the adipose glucose transporter 4 (GLUT4) regulatory gene pathway than the combination of atorvastatin and AEPP concentrations. However, more studies are needed in this area.

Keywords: Atorvastatin, Interleukins; Aqueous Extract of Pomegranate Peel (AEPP); Glucose transport 4 (GLUT4)

Citation: Etemadi Kermani B, Joudalahzadeh F, Moradzadegan A. **Effects of Pomegranate Peel and Atorvastatin on the Inflammatory Factors and the Glucose Transport 4 in 3T3-L1 Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2024; 42(758): 132-9.

1- MSc Student, Department of Experimental Sciences, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran

2- Assistant Professor, Department of Experimental Sciences, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran

Corresponding Author: Atousa Moradzadegan, Assistant Professor, Department of Experimental Sciences, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran; Email: atousa.moradzadegan@gmail.com