The effect of alpha-pinene on the expression of Bax and Bcl-2 in the liver of male rats receiving carbon tetrachloride

Fatemeh Noroozi[1], Masoumeh Asle-Rousta[1]*, Rahim Amini[2], Zeinab Sahraeian[3]

1. Department of Physiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
2. Department of Biology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
3. Nanobiotechnology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

*** Corresponding author e-mail: masoumeh.rousta@iau.ac.ir**

Abstract

Background and Objective: Studies have shown that liver damage is linked to apoptosis. Carbon tetrachloride is a powerful toxin that is used to induce liver fibrosis and cirrhosis in animal models. The purpose of this study was to investigate the effect of alpha-pinene on the expression of apoptosis-related factors Bax and Bcl-2 in the liver of adult male Wistar rats receiving carbon tetrachloride.

Materials and Methods: Rats were divided into four groups including control, alpha-pinene, carbon tetrachloride, and carbon tetrachloride-alpha-pinene group. Carbon tetrachloride (2 ml/kg of body weight) was injected intraperitoneally twice a week for six consecutive weeks. Alpha-pinene was also administered intraperitoneally (50 mg/kg of body weight per day) for six consecutive weeks. Real-time PCR was used to evaluate Bax and Bcl-2 mRNA levels at the end of the course.

Results: Carbon tetrachloride significantly increased the expression of pro-apoptotic factor Bax (P= 0.019) and significantly decreased anti-apoptotic factor Bcl-2 (P= 0.042) in the liver of rats compared to the control group. Alpha-pinene treatment caused a significant decrease in Bax mRNA level (P= 0.001) and a significant increase in Bcl-2 mRNA level (P= 0.025) in the carbon tetrachloride-alpha-pinene group compared to the carbon tetrachloride group. In addition, alpha-pinene prevented the occurrence of apoptotic cells in liver tissue sections of CCl4-injectes animals.

Conclusion: Alpha-pinene can prevent apoptosis caused by carbon tetrachloride in the liver of rats and probably has a hepatoprotective effect.

Keywords: Alpha-pinene, Bax, Bcl-2, Liver, Carbon tetrachloride

Received: Jun 14, 2023 **Revised:** Oct 04, 2023 **Accepted:** Oct 17, 2023

How to cite this article: Noroozi1 F, Asle-Rousta1 M, Amini R, Sahraeian Z. The effect of alpha-pinene on the expression of Bax and Bcl-2 in the liver of male rats receiving carbon tetrachloride. Daneshvar Medicine 2023; 31(4):11-19. doi: 10.22070/DANESHMED.2023.17855.1363

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

بررسی اثر آلفاپینن بر بیان Bax و Bcl-2 در کبد رت‌های نر دریافت‌کننده تتراکلریدکربن

فاطمه نوروزی[۱]، معصومه اصل روستا[۱]*، رحیم امینی[۲]، زینب صحراییان[۳]

۱. گروه فیزیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران
۲. گروه زیست‌شناسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران
۳. مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

*نویسنده مسئول: معصومه اصل روستا **Email: masoumeh.rousta@iau.ac.ir**

چکیده

مقدمه و هدف: : بررسی‌ها نشان داده است که آسیب‌های کبدی با وقوع آپوپتوز همراه است. تتراکلریدکربن یک سم قوی است که برای القای فیبروز و سیروز کبدی در مدل‌های حیوانی به کار می‌رود. مطالعه حاضر به هدف بررسی اثر آلفاپینن بر تغییر بیان فاکتورهای وابسته به آپوپتوز Bax و Bcl-2 در کبد رت‌های نرِ بالغ از نژاد ویستار دریافت‌کننده تتراکلریدکربن انجام شد.

مواد و روش ها: رت‌ها به چهار گروه شامل کنترل، آلفاپینن، تتراکلریدکربن و تتراکلریدکربن-آلفاپینن تقسیم شدند. تزریق درون صفاقی تتراکلریدکربن با دوز ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن (دو بار در هفته و به مدت ٦ هفته متوالی) انجام شد. آلفاپینن نیز با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن (هر روز و به مدت ٦ هفته متوالی) به‌صورت درون صفاقی تیمار شدند. در پایان دوره، سطح mRNAیBax و Bcl-2، توسط Real-time PCR ارزیابی شد.

نتایج: تتراکلریدکربن موجب افزایش معنادار بیان فاکتور پیش‌آپوپتوتیک Bax (P= ۰/۰۱۹) و کاهش معنادار فاکتور ضدآپوپتوتیک Bcl-2 (P= ۰/۰٤۲) در کبد رت‌ها در مقایسه با گروه کنترل شد. تیمار آلفاپینن موجب کاهش معنادار سطح mRNAی Bax (P=۰/۰۰۱) و افزایش معنادار سطح mRNAی Bcl-2 (P=۰/۰۲۵) در گروه تتراکلریدکربن-آلفاپینن در مقایسه با گروه تتراکلریدکربن شد. علاوه‌براین، آلفاپینن از پیدایش سلول‌های آپوپتوتیک در برش‌های بافتی کبد حیوانات تحت تزریق تتراکلریدکربن ممانعت کرد.

نتیجه‌گیری: آلفاپینن می‌تواند از آپوپتوز ناشی از تتراکلریدکربن در کبد رت‌ها ممانعت کند و احتمالاً اثر حفاظت کبدی دارد.

واژه های کلیدی: آلفاپینن، Bax، Bcl-2، کبد، تتراکلریدکربن

وصول مقاله: ۱۴۰۲/۰۳/۲۴
اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۲/۰۷/۱۲
پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۵

مقدمه

امروزه بیماری‌های کبدی، سلامت مردم جهان را به خطر انداخته و سالانه به مرگ و میر ۲ میلیون نفر منجر می‌شوند (۱). این بیماری‌ها عبارت‌اند از بیماری‌های مزمن کبدی مرتبط با ویروس (نظیر هپاتیت *B* و *C*)، کبد چرب الکلی، کبد چرب غیرالکلی و بیماری‌های خودایمنی و ژنتیکی. به دنبال پیشرفت التهاب کبدی، فیبروز کبدی ظاهر می‌شود که در ٤٥ درصد مرگ و میرهای ناشی از بیماری‌های کبدی نقش دارد. سطح فیبروز به‌عنوان یک پیش‌آگاهی محسوب شده و بر کیفیت زندگی اثر می‌گذارد. بنابراین فیبروز با عملکرد کبد در ارتباط بوده و مهم‌ترین فاکتور خطر ابتلا به کارسینوم کبدی است. فیبروز در ادامه به سیروز کبدی منجر می‌شود که یازدهمین علت مرگ و میر را در دنیا به خود اختصاص داده است (۱ و ۲)؛ بنابراین پیشگیری و ممانعت از پیشرفت فیبروز کبدی اهمیت فراوانی دارد و امروزه، مطالعات زیادی در این حوزه در حال انجام است. تجمع پیش‌رونده ماتریکس خارج سلولی در کبد را فیبروز کبدی می‌نامند. این پدیده موجب تخریب ساختار فیزیولوژیکی کبد می‌شود. فیبروز کبدی، صرف‌نظر از علت پیدایش، با مکانیسم‌های مولکولی رایج مانند آپوپتوز سلول‌های کبدی، التهاب مزمن، فعال‌شدن سلول‌های ستاره‌ای شکل و اختلال در سد اندوتلیال مشخص می‌شود (۲). سلول‌های ستاره‌ای شکل، مهم‌ترین سلول‌های درگیر در فیبروز کبدی هستند. وقتی که کبد در شرایط نرمال قرار دارد این سلول‌ها ساکن بوده و در فضای دیس قرار می‌گیرند، ویتامین *A* را در قطرات چربی ذخیره کرده و به‌عنوان پری‌سیت کبد عمل می‌کنند (۳). سلول‌های ستاره‌ای‌شکل در پاسخ به آسیب مداوم کبد، به میوفیبروبلاست‌های فعال تبدیل می‌شوند و بیان ژن‌های فیبروژنیک را آغاز می‌کنند (٤). آسیب مزمن کبد، از جمله هپاتیت ویروسی و کبد چرب غیرالکلی، معمولاً با آپوپتوز سلول‌های کبدی همراه است (۵). تحقیقات روی بیماران و مدل‌های تجربی فیبروز نشان داده است که فیبروز را می‌توان با برداشتن علت آسیب از بین برد. به‌خصوص میوفیبروبلاست‌ها پس از حذف علت ایجادکننده آپوپتوز، غیرفعال می‌شوند که به تحلیل فیبروز منجر می‌شود (۳).

سلول‌های ستاره‌ای‌شکل به دنبال کاهش سیگنال‌های فیبروژنیک، بیان ژن‌های واسطه گیرنده مرگ مانند گیرنده *Fas* یا گیرنده نوع ۱ فاکتور نکروز توموری را افزایش می‌دهند، پروتئین‌های پروآپوپتوتیک نظیر *p53*، *Bcl-2-associated X protein (Bax)* و کاسپاز ۹ را تنظیم می‌کنند و عوامل ضدآپوپتوز مانند *B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)* را افزایش می‌دهند. در فیبروز کبدی ناشی از تتراکلریدکربن، سلول‌های ستاره‌ای‌شکل را منبع اصلی میوفیبروبلاست‌ها در نظر می‌گیرند (٦). تتراکلریدکربن یک هپاتوکسین شناخته شده است که برای القای فیبروز و سیروز کبدی در جوندگان به فراوانی استفاده می‌شود. این مدل به‌طور مؤثری، فیبروز کبدی ناشی از آسیب سمی را تقلید می‌کند (۷).

مطالعات زیادی برای بررسی اثر ترکیبات طبیعی مختلف با منشأ گیاهی از گروه‌های آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، فنل‌ها، ترپن‌ها و کاروتنوئیدها بر مدل‌های مختلف فیبروز کبدی طراحی و اجرا شده است. تحقیقات نشان داده است اثرات ضدفیبروز ترکیبات طبیعی به روش‌های مختلفی حاصل می‌شود که از میان آنها می‌توان به سرکوب آپوپتوز اشاره کرد (۸–۱۰). خانواده پروتئین‌های *Bcl-2* با تنظیم نفوذپذیری غشای میتوکندری، نقش مهمی در انتقال سیگنال‌های آپوپتوتیک در سلول دارند. این خانواده به دو گروه تقسیم می‌شوند که عبارت‌اند از پروتئین ضدآپوپتوز *Bcl-2* و پروتئین آپوپتوتیک *Bax* (۱۱).

آلفاپینن یک مونوترپن دو حلقه‌ای است که به‌عنوان متابولیت ثانویه در بسیاری از اسانس‌های مشتق از مخروطیان یافت می‌شود. این مونوترپن در گیاهان دیگری نظیر رزماری (*Salvia rosmarinus*) و اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) نیز وجود دارد. آلفاپینن، حالت فرار و آب‌گریز دارد و رایحه تازه کاج را ایجاد می‌کند. پینن‌ها سال‌های طولانی برای تهیه عطرها و طعم‌دهنده‌ها استفاده شده‌اند و اثرات فارماکولوژیکی آنها نیز طی تحقیقات مختلف به اثبات رسیده است (۱۲، ۱۳). اثرات محافظتی آلفاپینن در مدل‌های حیوانی ایسکمی و اپی‌لپسی تا حدی به توانایی این مونوترپن در مهار آپوپتوز نسبت داده شده است (۱۵،۱٤) اما تاکنون گزارشی مبنی

بر اثر حفاظت کبدی آلفاپینن ارائه نشده است. این تحقیق به هدف بررسی اثر آلفاپینن بر بیان فاکتور پیش آپوپتوتیک *Bax* و فاکتور ضدآپوپتوتیک *Bcl-2* در کبد رت‌های نر بالغ دریافت‌کننده تتراکلریدکربن انجام شد.

مواد و روش

۲۰ سر رت نر بالغ از نژاد ویستار به وزن ۲۰۰–۲۲۰ گرم از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی خریداری شد. همه مراحل کار با رت‌ها طبق اصول اخلاقی انجام شد و به تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان رسید (کد اخلاق: *IR.IAU.Z.REC.1401.036*).

حیوانات به ٤ گروه (هر گروه ۵ رت) به شرح زیر تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل (*C*): تیماری دریافت نکردند؛

۲- گروه آلفاپینن(*P*) : آلفاپینن را با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت درون صفاقی (١٤) و به مدت شش هفته دریافت کردند؛

۳- گروه تتراکلریدکربن(*CCl4*) : این حیوانات، تتراکلریدکربن ۳۰ درصد را با دوز ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به‌صورت درون صفاقی، دو بار در هفته و به مدت شش هفته متوالی دریافت کردند (١٦)؛

٤- گروه تتراکلریدکربن- آلفاپینن(*CCl4-P*) : علاوه‌بر دریافت *CCl4* با آلفاپینن نیز تیمار شدند. به‌طوری‌که در طول شش هفته تیمار، حیوانات هر روز تحت تزریق آلفاپینن قرار می‌گرفتند و دو ساعت بعد، *CCl4* تزریق می‌شد (نوبت تزریق *CCl4*، فقط دو بار در هفته بود).

پس از پایان دوره تزریق، کبد حیوانات برداشته شد تا برای اندازه‌گیری بیان ژن‌های *Bcl-2* و *Bax* توسط *real time-PCR* و بررسی میکروسکوپی تغییرات بافتی مورد استفاده قرار گیرد.

برای مطالعات مولکولی، ابتدا استخراج *RNA* مطابق با دستورالعمل کیت مربوطه (ساخت شرکت پارس توس، مشهد، ایران) انجام شد. غلظت *RNA*ی استخراج‌شده در طول موج ٢٦٠ نانومتر و نسبت جذب ٢٦٠/٢٨٠ با استفاده از اسپکتروفتومتر سنجش شد که ٢/٢–١/٨ بود. سنتز *cDNA* از روی *RNA* استخراج‌شده نیز با استفاده از دستورالعمل کیت مربوطه (ساخت شرکت پارس توس، مشهد، ایران) انجام شد. برای بررسی بیان ژن‌ها در هر گروه از تکنیک *real time -PCR* استفاده شد. واکنش *PCR* شامل یک مرحله دناتوراسیون اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و ٤٢ سیکل تکثیری شامل مرحله دناتوراسیون با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٢ ثانیه و مرحله اتصال با دمای ٦٢ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦٠ ثانیه بود. توالی پرایمرهای استفاده‌شده در جدول ۱ آمده است. در این مطالعه از گلیسرآلدهید ۳ - فسفات دهیدروژناز(*GAPDH*) به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد و درنهایت، کمّی کردن داده‌ها (نسبت بیان ژن مورد نظر به ژن مرجع) با $2^{-\Delta\Delta ct}$ انجام شد (۱۷). توالی پرایمرها در جدول ۱ نمایش داده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده‌شده برای real time PCR

ژن	پرایمر فوروارد	پرایمر معکوس
Bax	CGTGGTTGCCCTCTTCTACT	TCACGGAGGAAGTCCAGTGT
Bcl-2	GGGATGCCTTTGTGGAACTA	CTCACTTGTGGCCCAGGTAT
GAPDH	GCTACACTGAGGACCAGGTTGTCT	CCCAGCATCAAAGGTGGAA

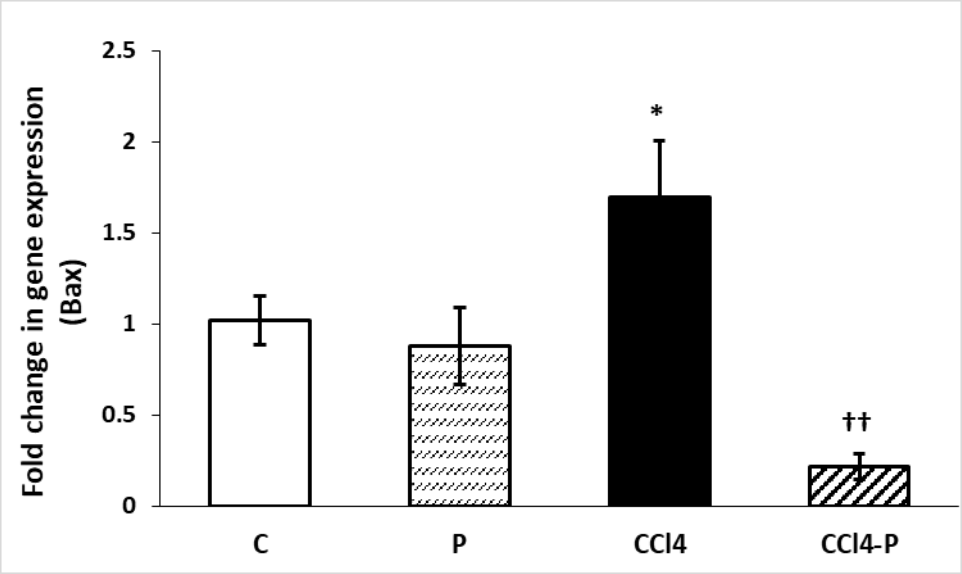
برای بررسی هیستولوژیکی، بخشی از کبد هر حیوان ابتدا در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد و پس از طی مراحل آب‌گیری با پارافین قالب‌گیری شد. سپس، برش‌های ۵ میکرومتری توسط میکروتوم تهیه شده و برش‌ها پس از انتقال به لام با هماتوکسلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. درنهایت، لام‌ها با میکروسکوپ نوری دوچشمی مورد مطالعه قرار گرفتند. ۵ برش از کبد هر حیوان تهیه شده بود و از هر برش، ۵ منطقه به‌طور تصادفی (در بزرگ‌نمایی X 400) برای حضور سلول‌های آپوپتوتیک بررسی شدند.

هپاتوسیت‌های آپوپتوتیک با پیکنوز (انقباض سیتوپلاسمی) و تراکم کروماتین مشخص شدند.

آنالیز آماری نتایج بخش مولکولی با استفاده از 24 SPSSv. انجام و نتایج به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین ارائه شد. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات، one way ANOVA و همچنین تست Tukey به کار رفت. P < ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معناداری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

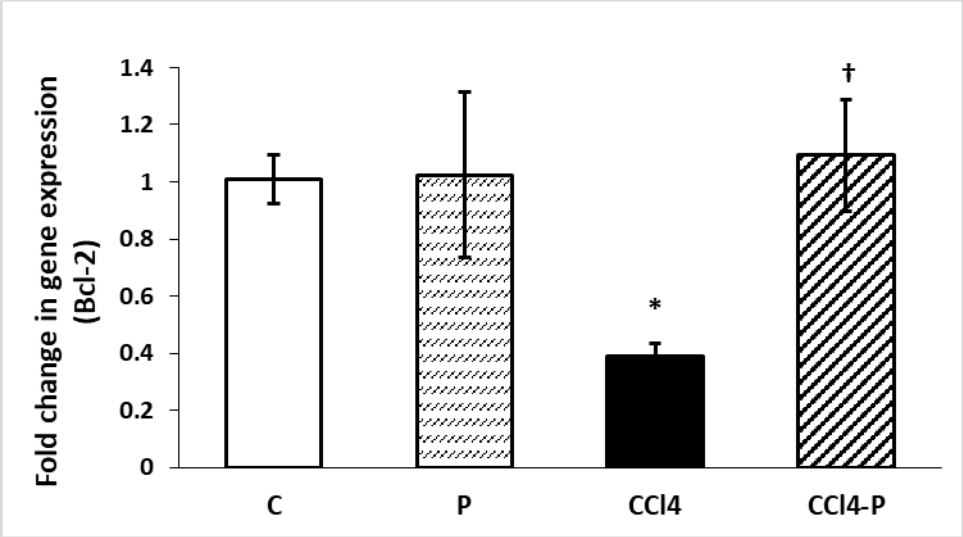
نتایج

بیان Bax در کبد حیوانات گروه تتراکلریدکربن در مقایسه با کنترل به‌طور معناداری بالاتر بود (P =۰/۰۱۹) و تزریق درون صفاقی آلفاپینن موجب کاهش معنادار بیان آن در گروه تتراکلریدکربن-آلفاپینن در مقایسه با گروه تتراکلریدکربن شد (P = ۰/۰۰۱) (شکل ۱). اختلاف معناداری در بیان Bax بین گروه‌های آلفاپینن و کنترل وجود نداشت.



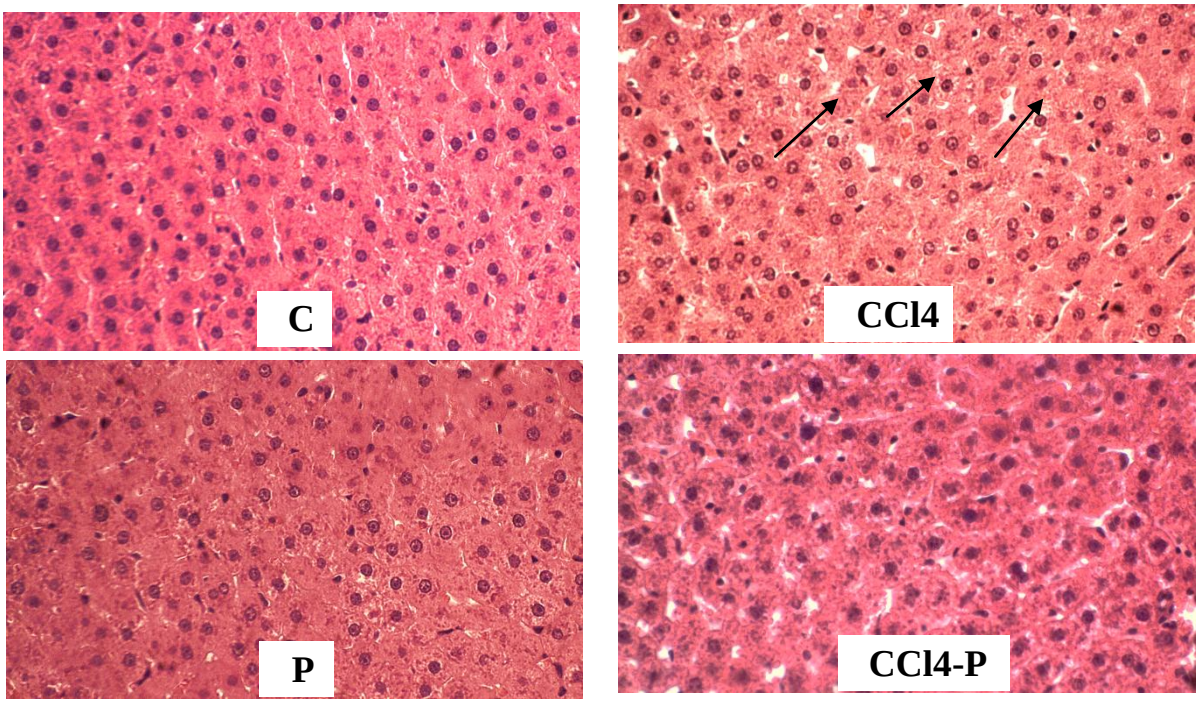
نمودار ۱. اثر آلفاپینن بر بیان Bax در کبد رت‌های دریافت‌کننده تتراکلریدکربن. نتایج به‌صورت میانگین ± خطای معیار ارائه شده است و ۵ رت در هر گروه قرار دارد. P <۰/۰۵ * در مقایسه با گروه کنترل و P<۰/۰۱ †† در مقایسه با گروه تتراکلریدکربن. (C: کنترل، P: آلفاپینن، CCl4: تتراکلریدکربن و CCl4-P: تتراکلریدکربن-آلفاپینن).

بیان Bcl-2 در کبد رت‌های گروه تتراکلریدکربن در مقایسه با کنترل به‌طور معناداری کمتر بود (P= ۰/۰۴۲) و تیمار آلفاپینن موجب افزایش معنادار بیان آن در گروه تتراکلریدکربن-آلفاپینن در مقایسه با گروه تتراکلریدکربن شد (P= ۰/۰۲۵) (شکل ۲). اختلاف معناداری در بیان Bcl-2 بین گروه‌های آلفاپینن و کنترل وجود نداشت.



نمودار ۲. اثر آلفاپینن بر بیان Bcl-2 در کبد رت‌های دریافت‌کننده تتراکلریدکربن. نتایج به‌صورت میانگین ± خطای معیار ارائه شده است و ۳ رت در هر گروه قرار دارد. P <۰/۰۵ * در مقایسه با گروه کنترل و P <۰/۰۵ † در مقایسه با گروه تتراکلریدکربن. (C: کنترل، P: آلفاپینن، CCl4: تتراکلریدکربن و CCl4-P: تتراکلریدکربن-آلفاپینن).

بررسی میکروسکوپی برش‌های تهیه‌شده از بافت کبد نیز نتایج مولکولی را تأیید کرد به‌طوری‌که وقوع آپوپتوز در بافت کبد حیوانات گروه CCl4 مشاهده شد درحالی‌که تیمار آلفاپینن تا حد زیادی از پیدایش سلول‌های آپوپتوتیک در کبد حیوانات دریافت‌کننده CCl4 جلوگیری کرد (شکل ۱).



شکل ۱. اثر آلفاپینن بر وقوع آپوپتوز در کبد رت‌های دریافت‌کننده تتراکلریدکربن. سلول‌های آپوپتوتیک با فلش سیاه نشان داده شده‌اند. (C: کنترل، P: آلفاپینن، CCl4: تتراکلریدکربن و CCl4-P: تتراکلریدکربن-آلفاپینن). تصاویر با بزرگ‌نمایی ٤٠٠ X نمایش داده شده‌اند.

بحث

در مطالعه حاضر، اثر ضدآپوپتوزی آلفاپینن در کبد رت‌های دریافت‌کننده تتراکلریدکربن مورد بررسی قرار گرفت. آلفاپینن از افزایش بیان فاکتور پیش آپوپتوزی Bax، کاهش بیان فاکتور ضدآپوپتوزی Bcl-2 و پیدایش سلول‌های آپوپتوتیک در کبد رت‌هایی که تتراکلریدکربن را به‌طور مزمن دریافت کردند جلوگیری کرد.

تتراکلریدکربن نوعی هپاتوکسین است که سال‌های طولانی برای القای سمیت حاد کبدی و همچنین القای فیبروز کبدی و سیروز مورد استفاده قرار گرفته است. اگرچه تزریق درون صفاقی تتراکلریدکربن برای القای فیبروز رایج است اما تیمار آن به‌صورت زیرجلدی، خوراکی یا استنشاقی نیز انجام شده است (۷). بر این اساس، تتراکلریدکربنِ ۳۰ درصد با دوز ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت درون صفاقی (دو بار در هفته و به مدت شش هفته متوالی) مطابق با دوزی که Wang و همکاران (۱٦) برای القای فیبروز کبدی به کار بردند به رت‌ها تزریق شد که کاهش معنادار بیان Bcl-2 و افزایش Bax را به دنبال داشت و با نتایج حاصل از مطالعات پیشین همسو بود (۱۹،۱۸).

Bcl-2 و Bax از پروتئین‌های دخیل در مسیر داخلی آپوپتوز (مسیر میتوکندریایی) هستند. Bcl-2 آپوپتوز را مهار می‌کند درحالی‌که Bax با انتشار سیتوکروم c و فعال‌کردن کاسپازها موجب تحریک وقوع آپوپتوز می‌شود. ثابت شده است که Bcl-2 موجب مهار فعالیت Bax می‌شود؛ بنابراین با افزایش بیان Bcl-2 اثر تحریکی Bax بر آپوپتوز بلوکه می‌شود (۲۱،۲۰).

ترپن‌های مختلف نظیر لیمونن (۲۲)، لینالول (۲۳)، کارواکرول (۲٤) و ۸،۱-سینئول (۲۵) با کاهش Bax و افزایش Bcl-2، آپوپتوز را مهار می‌کنند. اثر ضدآپوپتوزی آلفاپینن نیز که از گروه مونوترپن‌ها بوده، در مطالعات in vitro و in vivo گزارش شده است (۲٦،۱٦). به‌طور مثال، Karthikeyan و همکارانش (۲۷) نشان دادند که آلفاپینن موجب کاهش بیان Bax، کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ و افزایش بیان Bcl-2 در پوست موش‌های مواجه‌شده با اشعه فرابنفش می‌شود. علاوه‌براین، آلفاپینن نسبت Bax/Bcl-2، آزادسازی سیتوکروم c و فعالیت کاسپاز ۳ را در رده سلولی دوپامینرژیک SH-SY5Y انسانیِ مواجه‌شده با ٦-هیدروکسی دوپامین نیز کاهش داد (۲۸). بنابراین آلفاپینن را با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت درون صفاقی به مدت ٦ هفته متوالی به حیوانات دریافت‌کننده تتراکلریدکربن تزریق کردیم. انتخاب این دوز بر اساس اثر ضدآپوپتوزی این ترکیب در مغز رت‌های مدل ایسکمی بود (۱٤). در پایان دوره، مشخص شد که تیمار آلفاپینن از تغییر بیان Bax و Bcl-2 در کبد رت های گروه تتراکلریدکربن-آلفاپینن جلوگیری کرد که با مطالعات قبلی همسو است. تاکنون اثر محافظتی آلفاپینن بر کبد مورد مطالعه قرار نگرفته است. با توجه به اینکه آلفاپینن توانست آپوپتوز را در کبد مهار کند نتایج حاصل از این تحقیق، راهگشای محققان در حوزه محافظت کبدی است. از محدودیت‌های این تحقیق، فقدان بررسی آپوپتوز در سطح پروتئین‌های Bax و Bcl-2 و کاسپاز-۳ است که این محدودیت از کمبود منابع مالی ناشی شد.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری می‌شود که مونوترپن آلفاپینن با ممانعت از تغییر بیان Bax و Bcl-2 در کبد رت‌های دریافت‌کننده تتراکلریدکربن موجب سرکوب آپوپتوز این حیوانات شده و احتمالاً دارای قابلیت حفاظت کبدی است.

ملاحظات اخلاقی

پژوهش حاضر با کد IR.IAU.Z.REC.1401.036. در دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان به تصویب رسیده است.

تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

منابع

1. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. Journal of hepatology 2019;70(1):151-71 .
2. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives. Cells 2020;9(4):875 .
3. Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. Proceedings of the National Academy of Sciences 2012;109(24):9448-53.
4. Kukla M. Angiogenesis: a phenomenon which aggravates chronic liver disease progression. Hepatology International 2013;7:4-12.
5. Wang P, Koyama Y, Liu X, Xu J, Ma HY, Liang S, et al. Promising therapy candidates for liver fibrosis. Frontiers in physiology 2016;7:47.
6. Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, Cong M, Moore-Morris TJ, Park TJ, et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences 2014;111(32):E3297-305.
7. Aydın MM, Akçalı KC. Liver fibrosis. The Turkish Journal of Gastroenterology 2018;29(1):14.
8. Elvira-Torales LI, García-Alonso J, Periago-Castón MJ. Nutritional importance of carotenoids and their effect on liver health: A review. Antioxidants 2019;8(7):229.
9. Shan L, Liu Z, Ci L, Shuai C, Lv X, Li J. Research progress on the anti-hepatic fibrosis action and mechanism of natural products. International Immunopharmacology 2019;75:105765.
10. El-Tantawy WH, Temraz A. Anti-fibrotic activity of natural products, herbal extracts and nutritional components for prevention of liver fibrosis. Archives of Physiology and Biochemistry 2022;128(2):382-93 .
11. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature reviews Molecular cell biology 2008;9(1):47-59.
12. da Silva Rivas AC, Lopes PM, de Azevedo Barros MM, Costa Machado DC, Alviano CS, Alviano DS. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. Molecules 2012;17(6):6305-16.
13. Allenspach M, Steuer C. α -Pinene: A never-ending story. Phytochemistry 2021;190:112857.
14. Khoshnazar M, Parvardeh S, Bigdeli MR. Alpha-pinene exerts neuroprotective effects via anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases 2020;29(8):104977.
15. Hashemi P, Ahmadi S. Alpha-Pinene Exerts Antiseizure Effects by Preventing Oxidative Stress and Apoptosis in the Hippocampus in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy Induced by Kainate. Molecular Neurobiology 2023;60(6):3227-38 .
16. Wang K, Yang X, Wu Z, Wang H, Li Q, Mei H, et al. Dendrobium officinale polysaccharide protected CCl4-induced liver fibrosis through intestinal homeostasis and the LPS-TLR4-NF- κ B signaling pathway. Frontiers in Pharmacology 2020;11:240 .
17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta$ CT method. methods 2001;25(4):402-8.
18. Wang R, Song F, Li S, Wu B, Gu Y, Yuan Y. Salvianolic acid A attenuates CCl4-induced liver fibrosis by regulating the PI3K/AKT/mTOR, Bcl-2/Bax and caspase-3/cleaved caspase-3 signaling pathways. Drug Design, Development And Therapy 2019:1889-900.
19. Wei L, Chen Q, Guo A, Fan J, Wang R, Zhang H. Asiatic acid attenuates CCl4-induced liver fibrosis in rats by regulating the PI3K/AKT/mTOR and Bcl-2/Bax signaling pathways. International immunopharmacology 2018;60:1-8 .
20. Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. Current opinion in immunology 2007;19(5):488-96 .
21. Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochromec release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. Journal of Biological Chemistry 1999;274(4):2225-33.
22. Younis NS. D-Limonene mitigate myocardial injury in rats through MAPK/ERK/NF- κ B pathway inhibition. The Korean Journal of Physiology & Pharmacology 2020;24(3):259-66.
23. Hosseini A, Pourheidar E, Rajabian A, Asadpour E, Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Linalool attenuated ischemic injury in PC12 cells through inhibition of caspase-3 and caspase-9 during apoptosis. Food Science & Nutrition 2023;11(1):249-60.
24. Kandemir FM, Caglayan C, Darendelioğlu E, Küçükler S, İzol E, Kandemir Ö. Modulatory effects of carvacrol against cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity by molecular targeting regulation. Life Sciences 2021;277:119610 .
25. Wang Y, Zhang X, Fu Y, Fu D, Zhen D, Xing A, et al. 1, 8-cineole protects against ISO-induced heart failure by inhibiting oxidative

stress and ER stress in vitro and in vivo. European Journal of Pharmacology 2021;910:174472.
26. Karthikeyan R, Kanimozhi G, Prasad NR, Agilan B, Ganesan M, Srithar G. Alpha pinene modulates UVA-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis in human skin epidermal keratinocytes. Life Sciences 2018;212:150-8.
27. Karthikeyan R, Kanimozhi G, Madahavan NR, Agilan B, Ganesan M, Prasad NR, Rathinaraj P. Alpha-pinene attenuates UVA-induced photoaging through inhibition of matrix metalloproteinases expression in mouse skin. Life Sciences 2019;217:110-8.
28. Moshrefi M, Pourrahimi AM, Abbasnejad M, Farjoo MH, Esmaeili-Mahani S. Alpha-pinene preserves human dopaminergic SH-SY5Y cells against 6-hydroxydopamine-induced toxicity through its antioxidant and antiapoptotic properties and gamma-aminobutyric acid type A signaling. Biomedical and Biotechnology Research Journal 2022;6(2):255.