



## Effect of opium on oxidative stress markers in HepG2 cell line

Abbasi E<sup>a\*</sup>, Pourjafar M<sup>b</sup>, Mirzaei F<sup>c</sup>, Ghaleiha A<sup>d</sup>, Ahmadi M<sup>e</sup>, Mirzajani SS<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>b</sup> Department of Molecular Medicine and Genetics, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>c</sup> Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>d</sup> Department of Psychiatry, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>e</sup> Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>f</sup> Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

### Original Article

Use your device to scan  
and read the article online



**Citation:** Abbasi E, Pourjafar M, Mirzaei F, Ghaleiha A, Ahmadi M, Mirzajani SS. Effect of opium on oxidative stress markers in HepG2 cell line. . Journal of Cell and Tissue . 2024; 15(3):257.

<https://10.61186/JCT.15.3.257>

### KEYWORDS

MDA  
Catalae  
Antioxidant

### ABSTRACT

**Aim:** Addiction is an important social and health problem in many Middle Eastern countries. Studies show that opium is the most commonly used substance after tobacco in many countries, especially in Iran. Opium is obtained from the seeds of the *Papaver somniferum* plant and contains more than 40 different alkaloids, the most important of which are morphine, codeine, papaverine, noscapine, and thebaine. Various studies show that morphine, which is one of the most important substances in opium, increases the production of free radicals in the body and reduces the antioxidant capacity. Opium consumption has various adverse health effects on the body. Therefore, long-term use of this combination can be related to some pathological consequences, including neurological disorders, liver toxicity, kidney dysfunction, oxidative stress, and apoptosis. Most drugs are metabolized by liver hepatocytes and excreted by kidney cells. Therefore, opium consumption can directly cause damage to liver cells. Free radicals play an important role in liver diseases. The increase of free radicals and on the other hand the decrease of antioxidants in the body caused liver toxicity. Oxidative stress is caused by an imbalance between the production of free radicals and their neutralization inside the body by antioxidant defense mechanisms. Oxidative stress is produced in various diseases, consumption of toxic substances, and old age, since it is not possible to investigate the effect of opium on human liver cells, and no study has been conducted in this field. The liver is the most important organ that is directly

\* Corresponding author. Tel.:0813131000 Fax: 0813131000

E-mail address: 7abbasi@gmail.com

DOI: : 10.61186/JCT.15.3.257

Received: 29 Oct. 2024; Received in revised form: 18 Nov. 2024 ; Accepted: 26 Nov. 2024

Original Article



responsible for the metabolism and excretion of opium. Therefore, in this study, the effects of opium on oxidative stress markers in HepG2 cell line were determined.

**Material and methods:** Human liver cancer cell lines (HepG2) were used in this experimental study. At first, the cell line was placed in a 25 ml flask in the culture medium. DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) containing 10% FBS (Fetal bovine serum), and 1% penicillin and streptomycin antibiotics were incubated in a 37°C incubator with 5% CO<sub>2</sub>. The cells were treated with different concentrations of opium (0-100ug/ml) for 24 hours. Then IC<sub>50</sub> was determined and then a lower concentration, IC<sub>50</sub>, and a higher concentration (three concentrations in total) were used for further studies.

The lipid peroxidation was measured by thiobarbituric acid method. The total oxidant was measured using xylenol orange. The amount of total antioxidants was determined by the FRAP (Ferric Reducing / Antioxidant Power) method. The catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase enzyme activities were measured by colorimetry methods. The data was entered into SPSS software (Version 20) and analyzed using ANOVA and Tukey statistical tests. P less than 0.05 was considered a significant level.

**Results:** Statistical analysis results indicated a significant difference in the amount of oxidative stress factors compared with control ( $p < 0.001$ ). In the group receiving opium with a dose of 60 and 70 mg/ml compared to the control group, the amount of TOS and MDA increased significantly ( $p < 0.001$ ), while the amount of TAC decreased ( $p < 0.001$ ). Also, the activity of catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase enzymes decreased in opium-treated groups ( $p < 0.001$ ). **Conclusion:** The results of this research showed that opium had a lethal effect on HepG2 cells. Also, opium caused an increase in oxidative stress in this cell line, which indicates the vulnerability of the liver against this compound. The results of this study show that although opium has analgesic effects, it can seriously damage the liver tissue.



## اثر اپیوم بر مارکرهای استرس اکسیداتیو در رده سلولی HepG2

ابراهیم عباسی\*<sup>۱</sup>، موناپورجعفر<sup>۲</sup>، فاطمه میرزایی<sup>۳</sup>، علی قلعه ئی‌ها<sup>۴</sup>، مهرداد احمدی<sup>۵</sup>، سید سمیه میرزاجانی<sup>۶</sup>

- ۱- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
- ۲- محقق، گروه پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
- ۳- استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
- ۴- استاد، گروه روانپزشکی، مرکز تحقیقات اختلالات رفتاری و سوء مصرف مواد، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
- ۵- کارشناس، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
- ۶- کارشناس، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p><b>هدف:</b> بررسی‌ها نشان می‌دهد که تریاک پس از تنباکو پرمصرف‌ترین ماده مخدر در بسیاری از کشورها، به‌ویژه ایران می‌باشد. قسمت اعظم مواد مخدر تو سبب کبد متابولیزه می‌شود. لذا، مصرف تریاک می‌تواند به‌طور مستقیم سبب آسیب سلول‌های کبدی شود. لذا در این مطالعه اثر تریاک بر سیستم آنتی‌اکسیدانتی بافت کبد بررسی شد. <b>مواد و روش‌ها:</b> در این تحقیق از رده سلولی سرطانی کبد انسان (HepG2) استفاده شد. در ابتدا زنده بودن سلول‌ها با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس IC50 تعیین شد و همان غلظت و یک غلظت پایین‌تر و یک غلظت بالاتر (در مجموع سه غلظت) برای مطالعات بعدی استفاده شد. سپس پراکسیداسیون لیپیدی، میزان اکسیدانتی تام، و آنتی‌اکسیدانت تام اندازه گرفته شد. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از کیت انجام شد. <b>نتایج:</b> نتایج آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی‌داری در میزان مارکرهای استرس اکسیداتیو بود (<math>p &lt; 0.001</math>). در گروه دریافت کننده اپیوم با دوز ۶۰ و ۷۰ میکرو گرم در میلی لیتر در مقایسه با گروه کنترل میزان TOS و MDA افزایش معنی‌داری داشت (<math>p &lt; 0.001</math>), در حالی که میزان TAC کاهش یافت (<math>p &lt; 0.001</math>). همچنین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در گروه‌های درمان شده با تریاک کاهش نشان داد (<math>p &lt; 0.001</math>). <b>نتیجه‌گیری:</b> نتایج این مطالعه نشان داد که تریاک می‌تواند سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در کبد شده و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی را کاهش دهد.</p>	<p>مالون دی‌الدهید کاتالاز آنتی‌اکسیدانت</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۸ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۰۶</p>

## ۱- مقدمه

اعتیاد یک معضل اجتماعی و بهداشتی مهم در بسیاری از کشورهای خاور میانه می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که تریاک پس از تنباکو رایج‌ترین ماده مصرفی در بسیاری از کشورها به‌ویژه در کشور ایران است. تریاک از دانه‌های گیاه *Papaver somniferum* به‌دست می‌آید و حاوی بیش از ۴۰ الکلونئید مختلف بوده که مهم‌ترین آن‌ها مورفین، کدئین، پاپاورین، نو سکاپین و تبائین می‌باشد (۱). شیوع مصرف مواد مخدر در خاورمیانه و جنوب غربی آسیا ۲/۶ درصد است که بیشتر از میانگین سایر کشورهای جهان است. تاریخچه اعتیاد به مواد مخدر در ایران به پنج قرن پیش برمی‌گردد و تخمین زده می‌شود که حدود ۲/۳ درصد از جمعیت بزرگسال ایران معتاد به تریاک هستند. همچنین گزارش شده است که شیوع اعتیاد در مناطق روستایی بیشتر می‌باشد (۲).

با وجود اینکه مطالعات گذشته نشان می‌دهند که اعتیاد به مواد مخدر در ارتباط با بسیاری از بیماری‌ها می‌باشد، اما در برخی جوامع، به‌ویژه در آسیا و خاورمیانه، این باور وجود دارد که تریاک در مقابل بیماری‌های عروق کرونر، اختلالات لیبیدی، پرفشاری خون و دیابت اثر پیشگیرانه دارد. لذا، بسیاری از افراد تمایل بالایی به مصرف مواد مخدر دارند (۳).

مطالعات مختلف نشان می‌دهند که مورفین، که یکی از مهم‌ترین مواد موجود در تریاک است، سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در بدن شده و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی را کاهش می‌دهد (۴). مصرف تریاک داری اثرات نامطلوب مختلفی بر سلامت بدن است. لذا استفاده طولانی مدت از این ترکیب می‌تواند با برخی از پیامدهای آسیب‌شناختی از جمله اختلالات عصبی، سمیت کبدی، اختلال عملکرد کلیه، استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در ارتباط باشد (۴). Bhat و همکاران (۵) نشان دادند که مورفین سبب القاء استرس اکسیداتیو و همچنین افزایش آپوپتوزیس در ماکروفاژها می‌شود.

رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در بیماری‌های کبدی ایفا می‌کنند. در واقع افزایش رادیکال‌های آزاد و از سوی دیگر کاهش آنتی‌اکسیدانت‌های بدن، سبب آسیب کبدی می‌شوند. استرس اکسیداتیو در اثر عدم تعادل میان تولید رادیکال‌های آزاد و عدم خنثی شدن آن‌ها در داخل بدن به‌واسطه مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانتی ایجاد می‌شود. استرس اکسیداتیو در بیماری‌های مختلف، مصرف مواد سمی و در پیری تولید می‌شوند (۶). در بدن، استرس اکسیداتیو سبب پراکسیداسیون لیپیدها و همچنین آسیب پروتئین‌های موجود در دیواره سلول‌های کبد می‌شوند که نتیجه آن التهاب و آسیب بافتی می‌باشد. در این شرایط نه تنها ساختن دیواره و عملکرد آن تحت تأثیر قرار می‌گیرد، بلکه برخی از محصولات ناشی از اکسیداسیون به‌عنوان نمونه مالون دی‌آلدهید می‌تواند با بیومولکول‌ها واکنش نشان داده و اثرات سمی از خود نشان دهد (۷).

با توجه به این که قسمت اعظم مواد مخدر، توسط هیپاتوسیت‌های کبدی متابولیزه و به وسیله سلول‌های کلیوی دفع می‌گردد. مصرف تریاک می‌تواند به‌طور مستقیم سبب آسیب سلول‌های کبدی شود. از آن‌جا که مطالعه‌ای در این زمینه انجام نشده است، لذا در این مطالعه از رده سلولی HEPG2 جهت ارزیابی اثرات مصرف تریاک بر بافت کبد به‌عنوان مهم‌ترین اندامی که مستقیماً مسئول متابولیسم و دفع تریاک می‌باشد، انجام شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

رده سلولی: در مطالعه تجربی از رده سلولی سرطانی کبد انسان (HepG2) استفاده شد. ابتدا رده سلولی در فلاسک ۲۵ میلی‌لیتر در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی ۱۰ درصد FBS، (Fetal

(bovine serum) و یک درصد آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت شده در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO<sub>2</sub> انکوبه شدند.

**بررسی زنده بودن سلول‌ها:** زنده بودن سلول‌ها با استفاده از روش MTT (2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) مورد ارزیابی قرار گرفتند. ابتدا سلول‌ها در پلیت ۹۶ تایی (با غلظت ۵ هزار سلول در هر چاهک) به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت تریاک با غلظت‌های مختلف (۰ تا ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) به سلول‌ها اضافه شد. تریاک ابتدا با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با استفاده از DMEM استریل تهیه و فیلتر شد و طی چند مرحله رقیق سازی و در نهایت به سلول‌ها اضافه شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت رویی دور ریخته شد و سلول‌ها در محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO (Dimethylsulfoxid) به هر چاهک اضافه شد و میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط الیزا ریدر خوانش شد. سپس IC<sub>50</sub> تعیین شد و همان غلظت و یک غلظت پایین‌تر و یک غلظت بالاتر (در مجموع سه غلظت) برای مطالعات بعدی استفاده شد.

**اندازه‌گیری مارک‌های استرس اکسیداتیو:** رده سلولی در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's) که حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum)، و یک درصد آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت شده در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO<sub>2</sub> به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. تریاک با غلظت‌های مختلف به سلول‌ها اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها ترپسینه و جدا شدند. رسوب سلولی سانتریفیوژ شد و در مرحله دوم با PBS شستشو و مجدد سانتریفیوژ شد. رسوب حاصله به مدت ۴۵ دقیقه بر روی یخ همراه با ۲۵۰ میکرولیتر بافر لیز انکوبه شد و سپس با ۱۰۰۰۰ rpm در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی برای اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی استفاده شد (۸).

**اندازه‌گیری میزان مالون دی‌الدهید (MDA):** پراکسیداسیون لیپیدی به روش تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شد (۹). در این واکنش نمونه هموژن شده و محلول رویی شفاف پس از سانتریفیوژ جدا و برای سنجش استفاده شد. بطور خلاصه به ۵۰ میکرولیتر نمونه مقدار یک میلی‌لیتر معرف تیوباربیتوریک اسید و ۴ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد سپس مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در حمام آب جوش حرارت داده شد. نمونه‌ها در دمای اتاق خنک شد و سپس ۵ میلی‌لیتر n-بوتانول به لوله نمونه اضافه شد و به خوبی تکان داده شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند فاز رنگی بوتانول جدا سازی شده و جذب نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. همچنین از تترا اتوکسی پروپان به عنوان استاندارد استفاده شد (۸).

**اندازه‌گیری وضعیت اکسیدانتی تام (TOS):** در این واکنش آهن فرس به فریک اکسید می‌شود که در مرحله بعدی توسط زایلنول اورنج تولید رنگ می‌کند (۹). اندازه‌گیری رنگ تولید شده نشان دهنده میزان اکسیدانت تام می‌باشد. به طور خلاصه، ۵۰ میکرولیتر نمونه را با ۹۵ میکرولیتر معرف (اسید سولفوریک ۲۵ میلی‌مولار، سوربیتول ۱۰۰ میلی‌مولار و گزلیل اورنژ ۱۵۰ میکرومولار) مخلوط و ورتکس شدند. سپس نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و جذب آن بعد از سانتریفیوژ در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد.

**میزان خاصیت آنتی اکسیدانتی تام (TAC):** اندازه‌گیری میزان آنتی اکسیدانت تام به روش FRAP (Ferric Reducing / Antioxidant Power) انجام گرفت (۹). در این روش ترکیبات آنتی اکسیدانت سبب احیا کمپلکس (Ferric TPTZ (tripirydyltriazine) Fe III به فرم فرس Fe II می‌شوند که جذب ترکیب رنگی حاصله در طول موج ۵۹۳ نانومتر نشان دهنده میزان TAC می‌باشد. به طور خلاصه، ۱۰ میکرولیتر از نمونه را به ۳۰۰ میکرولیتر معرف FRAP

(کلرید فریک ۲۰ میلی‌مولار، TPTZ ۱۰ میلی‌مولار و بافر استات ۳۰۰ میلی‌مولار، pH 3.6) اضافه و ورتکس شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد (۸).

**اندازه‌گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD):** آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سبب تبدیل رادیکالهای سوپراکسید سمی ( $O_2^\circ$ ) به پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و مولکول هیدروژن می‌شود. رادیکال‌های  $O_2^\circ$  در طی روند اکسیداتیو تولید می‌شوند (۱۰). در این روش در اثر اکسیداسیون هیدروکسیل آمین، آنیون  $O_2^\circ$  تولید می‌شود که ترکیب NBT با  $O_2^\circ$  واکنش داده و رنگ قرمز فورمازان را تولید می‌کند. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز موجود در نمونه در واکنش با  $O_2^\circ$  و تبدیل آن به هیدروژن پراکسید از واکنش سوپراکسید با NBT و تشکیل رنگ قرمز جلوگیری می‌کند. لذا فعالیت SOD به وسیله اندازه‌گیری میزان ممانعت از این واکنش انجام می‌شود. سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از کیت (ZellBio GmbH, Germany) انجام شد.

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز:** آنزیم کاتالاز، سبب تجزیه پراکسید هیدروژن می‌شود. در این واکنش پراکسید هیدروژن با مولیبدات آمونیوم ترکیب زردرنگی تشکیل می‌دهد که در طول موج ۴۱۰ نانومتر جذب دارد. لذا، نمونه در مجاورت پراکسید هیدروژن قرار می‌گیرد و آنزیم موجود در نمونه پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند. پراکسید هیدروژن باقی مانده با آمونیوم مولیبدات تولید رنگ نموده و شدت رنگ تولید شده با میزان فعالیت آنزیم رابطه عکس دارد. کاتالاز با استفاده از کیت (ZellBio GmbH, Germany) انجام شد.

**اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (GPx):** گلوتاتیون پراکسیداز واکنش اکسیداسیون گلوتاتیون و تجزیه  $H_2O_2$  را کاتالیز می‌کند. گلوتاتیون اکسید شده در حضور گلوتاتیون پراکسیداز و NADPH احیا می‌شود. همچنین در این واکنش NADPH نیز اکسید می‌شود و به فرم  $+NADP$  تبدیل می‌شود که منجر به کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر می‌شود. کاهش جذب مستقیماً با غلظت گلوتاتیون پراکسیداز متناسب است. میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از کیت (ZellBio GmbH, Germany) انجام شد.

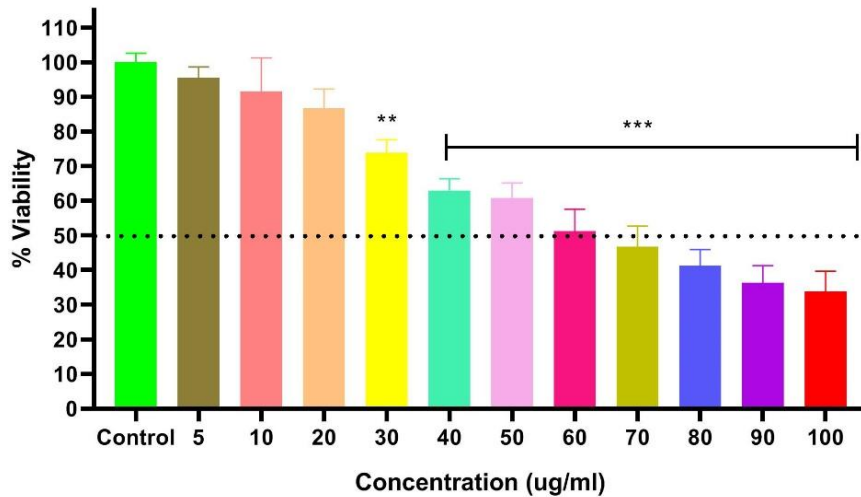
### ۳- آنالیز آماری

ابتدا داده‌ها وارد نرم افزار SPSS (ورژن ۲۰) شد و با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA و Tukey بررسی شد. P کم‌تر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

### ۴- نتایج

درصد زنده‌مانی (viability)

تجویز اپیوم به محیط کشت HepG2 سبب کاهش درصد زنده ماندن سلول‌ها به صورت وابسته به دوز شد که در شکل ۱ نشان داده شده است ( $p < 0.001$ ).

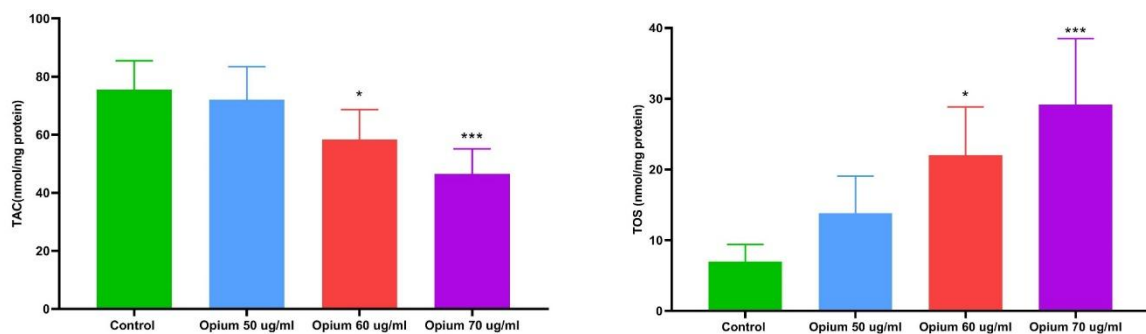


شکل ۱: درصد زنده‌مانی (viability) در رده سلولی HepG2 تیمار شده با اپیوم. معنی‌داری به صورت  $p < 0.001$  و  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل تیمار نشده نمایش داده شده است.

#### میزان آنتی‌اکسیدانت تام (TAC) و میزان اکسیدانت تام (TOS)

نتایج آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی‌دار میزان TAC در گروه‌های مختلف تحت تیمار درمان بود ( $p < 0.001$ ). در گروه دریافت‌کننده اپیوم با دوز ۶۰ و ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل میزان TAC کاهش قابل ملاحظه‌ای داشت ( $p < 0.001$ ) (شکل ۲ الف).

نتایج آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی‌داری در میزان TOS در گروه‌های مختلف تحت تیمار بود ( $p < 0.001$ ). در گروه دریافت‌کننده اپیوم با دوز ۶۰ و ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل میزان TOS کاهش قابل ملاحظه‌ای داشت ( $p < 0.001$ ) (شکل ۲ ب).

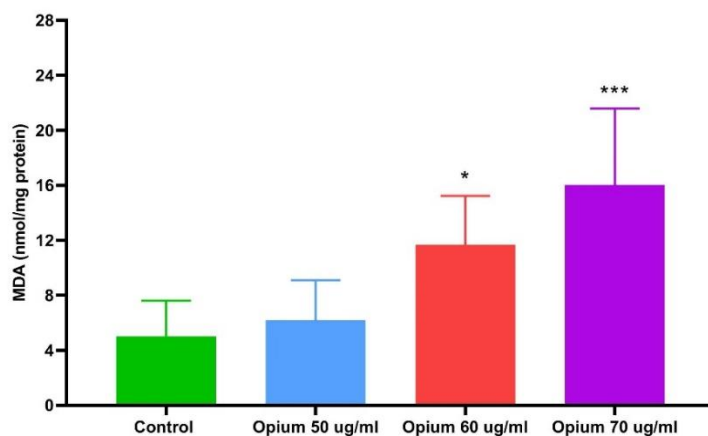


شکل ۲: الف) میزان آنتی‌اکسیدانت تام (TAC) در رده سلولی HepG2 تیمار شده با اپیوم. ب) میزان اکسیدانت تام (TOS) در رده سلولی HepG2 تیمار شده با اپیوم.

معنی‌داری به صورت  $p < 0.05$  و  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل تیمار نشده نمایش داده شده است.

### میزان مالون دی‌الدهید (MDA)

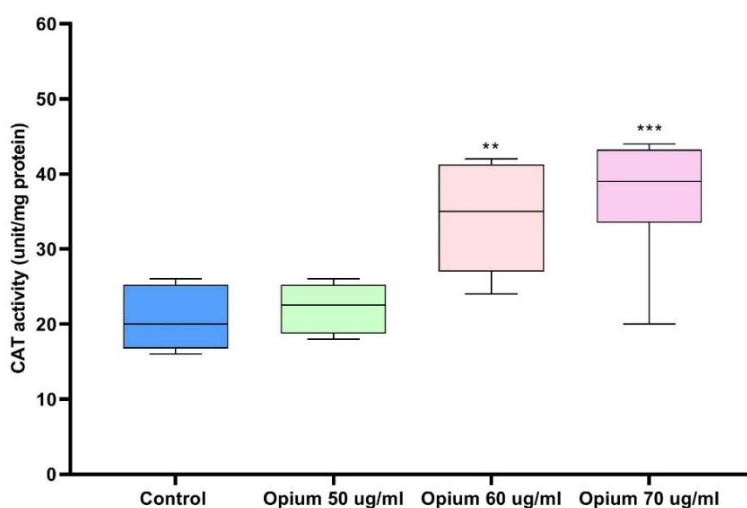
نتایج آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی‌داری در میزان MDA در گروه‌های مختلف تحت تیمار بود ( $p < 0.001$ ). در گروه دریافت‌کننده اپیوم با دوز ۶۰ و ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل میزان MDA افزایش معنی‌داری داشت ( $p < 0.001$ ) (شکل ۳).



شکل ۳: میزان مالون دی‌الدهید (MDA) در رده سلولی HepG2 تیمار شده با اپیوم. معنی‌داری به صورت  $p < 0.05$  و  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل تیمار نشده نمایش داده شده است.

### میزان فعالیت کاتالاز (CAT)

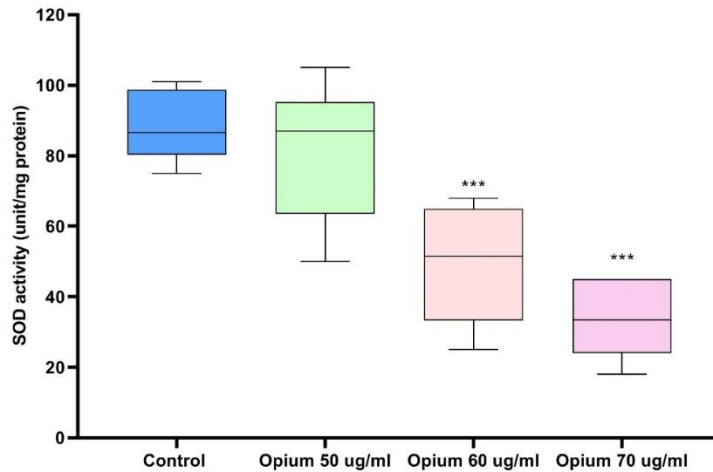
نتایج آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی‌داری در میزان CAT در گروه‌های مختلف تحت تیمار بود ( $p < 0.001$ ). در گروه دریافت‌کننده اپیوم با دوز ۶۰ و ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل میزان CAT افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت ( $p < 0.001$ ) (شکل ۴).



شکل ۴: میزان فعالیت کاتالاز (CAT) در رده سلولی HepG2 تیمار درمان شده با اپیوم. معنی‌داری به صورت  $p < 0.001$  و  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل تیمار نشده نمایش داده شده است.

### میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

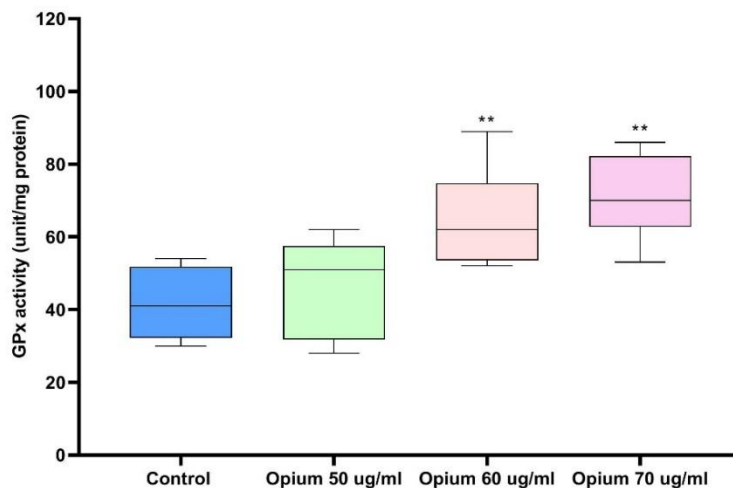
نتایج آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی‌داری در میزان SOD در گروه‌های مختلف تحت تیمار بود ( $p < 0.001$ ). در گروه دریافت‌کننده اپیوم با دوز ۶۰ و ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل میزان SOD کاهش قابل‌ملاحظه‌ای داشت ( $p < 0.001$ ) (شکل ۵).



شکل ۵: میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در رده سلولی HepG2 تیمار شده با اپیوم. معنی‌داری به صورت  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل تیمار نشده نمایش داده شده است.

#### میزان فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx)

نتایج آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی‌داری در میزان GPx در گروه‌های مختلف تحت تیمار بود ( $p < 0.001$ ). در گروه دریافت‌کننده اپیوم با دوز ۶۰ و ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل میزان GPx افزایش قابل‌ملاحظه‌ای داشت ( $p < 0.001$ ) (شکل ۶).



شکل ۶: میزان فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx) در رده سلولی HepG2 تیمار شده با اپیوم. معنی‌داری به صورت  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل تیمار نشده نمایش داده شده است.

## ۵- بحث

مطالعات مختلف نشان می‌دهند که استرس اکسیداتیو با اعتیاد به مواد مخدر از جمله کوکائین، مت‌آمفتامین و مورفین در ارتباط می‌باشد. به‌عنوان مثال مورفین سبب فعال شدن گیرنده‌های اپیوئیدی می‌شود و مصرف آن تولید رادیکال‌های آزاد از جمله گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) یا گونه‌های فعال نیتروژن (RNS) را افزایش داده و همچنین سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی می‌شوند. گزارش شده است که مورفین تولید ROS را به‌روشنی وابسته به زمان و غلظت در سلول‌های SH-SY5Y القا کند و ROS تولید شده متعاقباً از طریق درگیر کردن گیرنده‌های  $\mu$ -افیونی بر اعتیاد به مورفین تاثیر می‌گذارد (۱۱).

در این مطالعه میزان MDA به مقدار قابل ملاحظه‌ای توسط تریاک افزایش یافت. افزایش این مارکر می‌تواند نشان دهنده آسیب مستقیم کبد توسط تریاک باشد. نشان داده شده است که MDA به‌عنوان یک شاخص آسیب بافتی شناخته می‌شود و افزایش آن می‌تواند منجر به اختلال ساختاری و عملکردی و سرانجام مرگ سلولی شود (۱۲). Asgary و همکاران (۱۳) با بررسی اثر تریاک بر شاخص‌های لیپیدی و قند خون نشان دادند که مصرف تریاک تاثیری بر کاهش میزان قند خون و کلسترول، HDL، تری‌گلیسرید، کلسترول تام و HbA1C نداشت، اما میزان MDA را افزایش داد.

استفاده سیستمیک مورفین همچنین می‌تواند منجر به استرس اکسیداتیو در حیوانات شود. مطالعه Abdel-Zaher و همکاران (۱۴) نشان داد که سطح گلوتامات و MDA در مغز موش‌های تحت درمان با مورفین افزایش یافت (۱۵). علاوه بر این، مورفین سبب کاهش سطح گلوتامین (GSH) و فعالیت گلوتامین پراکسیداز (GSH-Px) در مغز موش شد.

در موش‌های صحرایی، تزریق زیر جلدی مورفین نیز سبب افزایش MDA شد و فعالیت‌های SOD و GSH-Px را کاهش داد (۱۶). در بیماران سرطانی که مورفین به‌داخل بطن مغزی آن‌ها تزریق شده بود، سطح GSH در مایع مغزی نخاعی کاهش یافت، که این وضعیت می‌تواند سیستم عصبی مرکزی را در برابر آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو آسیب پذیر کند. مورفین می‌تواند سطوح درون سلولی وضعیت ردوکس سلولی را تغییر دهد، متعاقباً بر سطوح S-آدنوزیل متیونین تاثیر بگذارد و در نهایت تغییرات متیلاسیون DNA را القا کند (۱۷). همچنین نشان داده شده است که مورفین با نیتراسیون SOD سبب کاهش فعالیت این آنزیم می‌شود (۱۱).

علاوه بر این، اپیوم بر سایر پروتئین‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو اثر می‌گذارد. در مطالعه حاضر فعالیت کاتالاز، SOD و GPx توسط تریاک کاهش داشت. نشان داده شده است که مصرف مورفین نه تنها سطح MDA را افزایش می‌دهد، بلکه فعالیت‌های SOD، گلوتامین-S-ترانسفراز (GST) و کاتالاز (CAT) را در کبد موش‌ها کاهش می‌دهد (۱۸). نتایج آنالیز پروتئومیک نشان می‌دهد مورفین پروتئین‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو، مانند پراکسی ردوکسین-۲ و پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (Hsp70) را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد (۱۹).

Lamsal و همکاران (۲۰) گزارش کردند که مصرف مزمن تریاک به مقدار قابل ملاحظه‌ای میزان GSH را در قلب موش‌ها کاهش می‌دهد، در حالی که سبب افزایش گلوتامین ردوکتاز، گلوتامین اکسید شده، SOD و GPx شده که منجر به افزایش استرس اکسیداتیو بافت قلبی می‌شود. SOD یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت خط اول دفاعی بدن است که سبب کاتالیز آنیون سوپراکسید به  $H_2O_2$  می‌شود که در مرحله بعدی توسط کاتالاز و گلوتامین پراکسیداز به آب تبدیل می‌شود. مطالعه قبلی کاهش قابل توجهی در SOD در حیوانات تحت درمان با تریاک در مقایسه با گروه کنترل گزارش کرده است. همچنین مطالعات قبلی نشان داده‌اند که تریاک سبب کاهش GSH می‌شود. مطالعه Zhang و همکاران (۲۱) نشان داد که تجویز مورفین باعث کاهش سطح گلوتامین، گلوتامین پراکسیداز، کاتالاز و آنتی‌اکسیدانت تام شده و باعث افزایش مالون دی‌دهید در کبد موش می‌شود و از این طریق سبب آسیب بافت کبد می‌شود. Samarghandian و همکاران (۲۲) نیز نشان

دادند که تجویز مورفین به رت سبب افزایش سطوح سرمی آسپاراتات آمینوترانزسفرز (AST)، آلانین آمینوترانزسفرز (ALT)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) و سطح مالون دی آلدئید کبد (MDA) می شود. آن‌ها همچنین نشان دادند که فعالیت SOD، GST و CAT در گروه مورفین به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود. این طرح همچنین دارای محدودیت‌های متفاوتی بود که یکی از آن‌ها کار با تریاک می‌باشد. از طرف دیگر اگر چه ادعا می‌شود این تریاک خالص می‌باشد اما ممکن است برخی افزودنی‌ها در آن باشند. از دیگر محدودیت‌های این طرح می‌توان به عدم بررسی اثر تریاک در مدل انسانی یا حیوانی باشد.

## ۶- نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که تریاک اثر کشندگی بر سلول های HepG2 داشت. همچنین تریاک سبب افزایش استرس اکسیداتیو در این رده سلولی شد که نشان دهنده آسیب پذیری کبد در برابر این ترکیب می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اگرچه تریاک دارای اثرات ضد دردی است اما می‌تواند به‌شدت سبب آسیب بافت کبد شود.

## ۷- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان بابت حمایت از این طرح قدردانی می‌شود (شماره گرنت ۹۶۱۱۱۷۷۳۲۶).

## ۸- منابع

1. Bekrivi M, Chehreh K, Nazemi S. Investigating the Effect of Opium Addiction on Serum Glucose and Lipid Profiles in Diabetic Patients with Acute Coronary Syndromes. *Annals of Military and Health Sciences Research*. 2024;22(3).
2. Najafipour H, Masoumi M, Amirzadeh R, Rostamzadeh F, Foad R, Shadkam Farrokhi M. Trends in the Prevalence and Incidence of Opium Abuse and its Association with Coronary Artery Risk Factors in Adult Population in Iran: Findings from Kerman Coronary Artery Disease Risk Factors Study. *Iran J Med Sci*. 2022;47(4):328-37.
3. Mohammadi A, Oshaghi EA, Sorkhani AN, Oubari F, Kia RH, Rezaei A. Effect of opium on lipid profile and expression of liver X receptor alpha (LXR $\alpha$ ) in normolipidemic mouse. *Food and nutrition sciences*. 2012;3(2):249-54.
4. Skrabalova J, Drastichova Z, Novotny J. Morphine as a potential oxidative stress-causing agent. *Mini-reviews in organic chemistry*. 2013;10(4):367-72.
5. Bhat RS, Bhaskaran M, Mongia A, Hitosugi N, Singhal PC. Morphine-induced macrophage apoptosis: oxidative stress and strategies for modulation. *Journal of leukocyte biology*. 2004;75(6):1131-8.
6. Kiran TR, Otlu O, Karabulut AB. Oxidative stress and antioxidants in health and disease. *Journal of Laboratory Medicine*. 2023;47(1):1-11.
7. Chandra R, Aneja R, Rewal C, Konduri R, Dass SK, Agarwal S. An opium alkaloid-Papaverine ameliorates ethanol-induced hepatotoxicity: diminution of oxidative stress. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2000;15(2):155-60.
8. Artimani T, Karimi J, Mehdizadeh M, Yavangi M, Khanlarzadeh E, Ghorbani M, et al. Evaluation of pro-oxidant-antioxidant balance (PAB) and its association with inflammatory cytokines in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Gynecol Endocrinol*. 2018;34(2):148-52.
9. Salehi I, Zarrinkalam E, Mirzaei F, Oshaghi EA, Ranjbar K, Asl SS. Effects of resistance, endurance, and concurrent exercise on oxidative stress markers and the histological changes of intestine after morphine withdrawal in rats. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry*. 2018;6(2):44-9.

10. Abbasi-Oshaghi E, Khodadadi I, Mirzaei F, Ahmadi M, Tayebinia H, Goodarzi MT. Alleviates Sperm Damage by Limiting Oxidative Stress and Insulin Resistance in Diabetic Rats. *The Open Medicinal Chemistry Journal*. 2020;14(1).
11. Zeng XS, Geng WS, Wang ZQ, Jia JJ. Morphine Addiction and Oxidative Stress: The Potential Effects of Thioredoxin-1. *Front Pharmacol*. 2020;11:82.
12. Rauen U, Viebahn R, Lauchart W, De Groot H. The potential role of reactive oxygen species in liver ischemia/reperfusion injury following liver surgery. *Hepato-gastroenterology*. 1994;41(4):333-6.
13. Asgari S, Naderi G, Shahrezaei J, Ahmad P. Comparison of plasma level of lipid peroxidation, lipids & blood sugar in opium addicted & control groups. *ARYA Journal*, 2005, 1(2): 72-74
14. Abdel-Zaher AO, Mostafa MG, Farghaly HS, Hamdy MM, Abdel-Hady RH. Role of oxidative stress and inducible nitric oxide synthase in morphine-induced tolerance and dependence in mice. Effect of alpha-lipoic acid. *Behav Brain Res*. 2013;247:17-26.
15. Abdel-Zaher AO, Mostafa MG, Farghly HM, Hamdy MM, Omran GA, Al-Shaibani NK. Inhibition of brain oxidative stress and inducible nitric oxide synthase expression by thymoquinone attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. *Eur J Pharmacol*. 2013;702(1-3):62-70.
16. Motaghinejad M, Karimian SM, Motaghinejad O, Shabab B, Asadighaleni M, Fatima S. The effect of various morphine weaning regimens on the sequelae of opioid tolerance involving physical dependency, anxiety and hippocampus cell neurodegeneration in rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2015;29(3):299-309.
17. Trivedi M, Shah J, Hodgson N, Byun HM, Deth R. Morphine induces redox-based changes in global DNA methylation and retrotransposon transcription by inhibition of excitatory amino acid transporter type 3-mediated cysteine uptake. *Mol Pharmacol*. 2014;85(5):747-57.
18. Asadi Akbarabadi E, Rajabi Vardanjani H, Molavinia S, Pashmforoosh M, Khodayar MJ. PMSF Attenuates Morphine Antinociceptive Tolerance and Dependence in Mice: Its Association with the Oxidative Stress Suppression. *Iran J Pharm Res*. 2021;20(3):300-9.
19. Bu Q, Yang Y, Yan G, Hu Z, Hu C, Duan J, et al. Proteomic analysis of the nucleus accumbens in rhesus monkeys of morphine dependence and withdrawal intervention. *J Proteomics*. 2012;75(4):1330-42.
20. Lamsal M, Gautam N, Bhatta N, Toora BD, Bhattacharya SK, Baral N. Evaluation of lipid peroxidation product, nitrite and antioxidant levels in newly diagnosed and two months follow-up patients with pulmonary tuberculosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2007;38(4):695-703.
21. Zhang YT, Zheng QS, Pan J, Zheng RL. Oxidative damage of biomolecules in mouse liver induced by morphine and protected by antioxidants. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2004;95(2):53-8.
22. Samarghandian S, Afshari R, Farkhondeh T. Effect of long-term treatment of morphine on enzymes, oxidative stress indices and antioxidant status in male rat liver. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(5):1449-53.