مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هفدهم، شماره 9، شهریور1394، صفحه 51-44

اثرات پودر دانه شنبلیله بر فاکتورهای اکسیدانی و آنتی اکسیدانی در آسیب کبدی ناشی از استامینوفن در موش‌های صحرایی نر

عقیله محمدزاده (MSc)[1]، علی گل (PhD)[1*]، حکیمه علومی (PhD)[2]

1-گروه آموزشی زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان
2-پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه اکولوژی، کرمان

دریافت: 93/8/20، اصلاح:93/11/15 ، پذیرش:94/2/16

خلاصه

سابقه و هدف: استامینوفن از طریق استرس اکسیداتیو می تواند منجر به آسیب کبدی شود. هدف از این مطالعه بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی پودر دانه شنبلیله بر فاکتورهای اکسیدانی و آنتی اکسیدانی در مسمومیت کبدی ناشی از استامینوفن می‌باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی 24 سر رت نر نژاد ویستار در محدوده وزنی 280-250 گرم به 4 گروه کنترل، نرمال سالین +پودر دانه شنبلیله، استامینوفن، استامینوفنی+پودر دانه شنبلیله تقسیم شدند. بعد از 24 ساعت گرسنگی، گروه‌های نرمال و نرمال+پودر دانه شنبلیله، نرمال سالین و گروه‌های استامینوفن و استامینوفن + پودر دانه شنبلیله، استامینوفن با دوز 1000mg/kg به صورت گاواژ دریافت کردند. پس از گذشت 6 ساعت گروه‌های نرمال و استامینوفنی، نرمال سالین و گروه‌های نرمال +پودر دانه شنبلیله و استامینوفن+پودر دانه شنبلیله، پودر دانه شنبلیله با دوز 1000mg/kg را به صورت گاواژ دریافت کردند. دوازده ساعت پس از گاواژ دوم، رت‌ها کشته شده و بافت کبدی، منجمد و بررسی گردید.

یافته‌ها: پودر دانه شنبلیله باعث کاهش میزان مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن نسبت به گروه استامینوفنی شد (به ترتیب 0/0305±0/2608 و 1/56±0/15362 در مقایسه با گروه استامینوفنی 6/7±0/34431 و 2/38±0/10481؛ p<0/001 و p<0/05). همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز نسبت به گروه استامینوفنی افزایش یافت (به ترتیب 19/07±3/3666 و 1/174±0/2424 در مقایسه با گروه استامینوفنی 8/108±2/46 و 0/089±0/614).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که پودر دانه شنبلیله می تواند سبب کاهش استرس اکسیداتیو در آسیب کبدی ناشی از استامینوفن شود.

واژه‌های کلیدی: دانه شنبلیله، استامینوفن، استرس اکسیداتیو، کبد، رت.

مقدمه

آسیب کبدی ناشی از دارو (DILI=Drug-induced liver injury) یکی از شایع‌ترین دلایل برای قطع مصرف دارو است و غالبا دلیل اصلی رد دارو برای کسب مجوز بازاریابی است. این مسئله یک چالش مهم برای پزشکان، مقامات بهداشت و شرکت‌های دارویی می‌باشد (1). در حالیکه بیش از 800 دارو با سمیت کبدی در ارتباط است، تاکنون شایعترین علت DILI مصرف بیش از حد استامینوفن بوده است (2). استامینوفن (N-acetyl-p-aminophenol یا paracetamol) به عنوان داروی ضد درد و تب استفاده می‌شود. استامینوفن در سال 1955 به طور گسترده در ایالات متحده در دسترس قرار گرفت. در اواخر دهه 1990، در ایالات متحده استامینوفن به طور گسترده به عنوان یک عامل نارسایی حاد کبدی(ALF=Acute liver failure) به رسمیت شناخته نشده بود و تا آن زمان در پایگاه‌های اطلاعاتی ظاهر نشده بود. در سال 2005، Larson و همکاران گزارش دادند که استامینوفن 42%از تمام موارد ALF را به خود اختصاص دادهاست (3). به دنبال مصرف استامینوفن، 90% آن از طریق فاز دو متابولیسم به متابولیت‌های غیر سمی تبدیل می‌شود. درصد کمی از استامینوفن (10-5%>) به وسیله ایزومرهای 450CYP متابولیزه می‌شود که در نتیجه آن متابولیت سمی استامینوفن، N- استیلp- بنزوکوئینون ایمین (NAPQI) تولید می‌شود. در شرایط نرمال NAPQI به وسیله مزدوج شدن با گلوتاتیون سم‌زدایی می‌شود. در مسمومیت با استامینوفن به دنبال حذف گلوتاتیون سلولی، NAPQI به ماکرومولکول‌های سلولی باند می‌شود و به دنبال آن آسیب سلول کبدی و مرگ سلولی ایجاد می‌شود. عقیده بر این است که مسمومیت کبدی استامینوفن زمانی ایجاد می‌شود که ذخیره گلوتاتیون به کمتر از 30 درصد نرمال برسد. پس از به اتمام رسیدن ذخیره گلوتاتیون سلولی، متابولیت واکنش‌گر استامینوفن به تعداد قابل توجهی از پروتئین‌های میتوکندریایی و سیتوزولی متصل می‌شود. در پی آن، تنفس میتوکندریال مختل شده، سطح آدنوزین تری فسفات (ATP)سلول کبدی کاهش می‌یابد، و منفذ تراوایی انتقالی غشاء میتوکندری باز می‌شود و سیتوکروم C از میتوکندری آزاد می‌شود. چندین 450CYP می‌توانند استامینوفن را به

▣ این مقاله حاصل پایان نامه عقیله محمدزاده دانشجوی رشته فیزیولوژی دانشگاه شهید باهنر کرمان می باشد.
* مسئول مقاله: دکتر علی گل
آدرس: کرمان، بلوار 22 بهمن دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی. تلفن:034-33257432
E-mail:agol@mail.uk.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.9.7.0]
[DOI: 10.22088/jbums.17.9.44]

NAPQIتبدیل کنند که در این میان CYP2E1، CYP1A2 و CYP3A4 نقش برجسته‌ای را ایفا می‌کنند (4). از زمان ماقبل تاریخ، بسیاری از گیاهان دارویی در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گرفتند. این گیاهان برای هزاران سال در سراسر جهان به عنوان داروهای طبیعی دارای اثرات درمانی و دیگر اثرات فارماکولوژیک استفاده شده‌اند (5).

گیاهان دارویی حاوی میزان زیادی از آنتی اکسیدان‌ها می‌باشند که می‌توانند اکسیداسیون لیپیدها یا دیگر مواد را مهار یا به تأخیر اندازند (6). ترکیبات آنتی اکسیدانی گیاهان دارویی به آنتی اکسیدان‌های فنولی مانند اسیدهای فنولی، فلاونوئیدها، ترپن ها، توکوفرول، ویتامین C و گروهی از کاروتنوئیدها تعلق دارد (7). شنبلیله (Fenugreek) یکی از گیاهان غلافدار یکساله می‌باشد که دانه‌های آن حاوی 6-10% لیپید، 44- 59% کربوهیدرات و 20-30% پروتئین می‌باشد (8و9). در مقایسه با دیگر بقولات، دانه‌ها حاوی نسبت‌های بالاتری از مواد معدنی است (Ca, P, Fe, Zn, Mn) (10).

همچنین دانه‌ها حاوی بعضی از اجزاء آروماتیک مانند n- آلکانها، ترپنها، نونالاکتون و سرشار از ساپونین می‌باشند (11). همچنین گزارش شده است که این دانه‌ها سرشار از فلاونوئیدهای پلی فنولیک می‌باشد که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بوده و آنها ساختارهای سلولی را از آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کنند (13و12). مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر محافظتی پودر دانه شنبلیله بر برخی فاکتورهای اکسیدانی و آنتی اکسیدانی در مسمومیت کبدی ناشی از استامینوفن انجام شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از 24 سرموشهایصحراییبانژادویستارباوزن 280-250 گرم که از خانه حیوانات دانشگاه شهید باهنر تهیه شده و در همان مرکز نیز نگهداری شدند، استفاده شد. موش‌ها در شرایط استاندارد از نظر نور، دما و رطوبت نگهداری شدند و به مدت چند روز قبل از آزمایش، آب و غذای کافی به آن‌ها داده شد. دانه شنبلیله از عطاری تهیه و توسط متخصص گیاه‌شناسی تایید شد. میزان 1000 میلی گرم بر کیلوگرم پودر دانه شنبلیله در نرمال سالین حل گردید و از طریق گاواژ به موش‌ها خورانده شد. پودر استامینوفن خالص استفاده شده در این مطالعه از شرکت دارو پخش تهیه شده، سپس در نرمال سالین حل و از طریق گاواژ خورانده شد. موشها به طور تصادفی به 4 گروه 6 تایی تقسیم شدند:

گروه کنترل (C): که موش‌ها بعد از 24 ساعت گرسنگی، از طریق گاواژ نرمال سالین دریافت کردند، سپس 6 ساعت بعد نیز از طریق گاواژ به آنها نرمال سالین خورانده شد.

گروه پودر دانه شنبلیله (T): موشها بعد از 24 ساعت گرسنگی، از طریق گاواژ نرمال سالین دریافت می‌کنند، سپس6 ساعت بعدمجددا از طریق گاواژ 1000 mg/kg پودر دانه شنبلیله به آنها خورانده شد.

گروه استامینوفنی (A): موشها بعد از 24 ساعت گرسنگی، از طریق گاواژ 1000mg/kg استامینوفن دریافت کردند، سپس 6 ساعت بعد مجددا از طریق گاواژ نرمال سالین به آنها خورانده شد.

گروه استامینوفن+پودر دانه شنبلیله (A+T): موش‌ها بعد از 24 ساعت گرسنگی، از طریق گاواژ استامینوفن دریافت کردند، سپس 6 ساعت بعد از طریق گاواژ پودر دانه شنبلیله به آنها خورانده شد. پس از گذشت 12 ساعت از گاواژ دوم و پس از بیهوش نمودن موش‌ها، سر حیوان توسط گیوتین قطع گردید.

در این مطالعه از دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار (Centrifuge 5804R) از شرکت Eppendorf، دستگاه سانتریفوژ(شرکت Bio Chem آمریکا)، ترازوی دیجیتال (AND HR-200) جهت توزین دارو (استامینوفن) و پودر دانه شنبلیله با دقت 0/0001 گرم، ترازوی دیجیتال (AND EK1200 ساخت ژاپن) برای توزین موش‌های صحرایی با دقت 0/01 گرم، فریزر 75- درجه سانتیگراد جهت نگهداری بافت‌ها و عصاره‌های بافتی برای سنجش و دستگاه اسپکتروفتومتری مدل Cary 50Varian ساخت کشور استرالیا استفاده شد.

سنجش فاکتورهای آنتی اکسیدانی: برای تهیه عصاره بافتی جهت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و پروتئین از روش Bradford استفاده شد (14). در این روش 0/5 گرم از بافت مورد نظر را برداشته و در 3 ml بافر فسفات mM 50 که حاوی EDTA 1 میلی مولار می‌باشد، هموژن می‌شود و سپس عصاره حاصل در دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار در 10000 g به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد

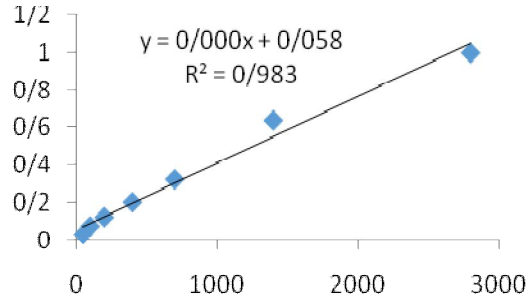
سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 (کاهش مقدار H_2O_2) در 240 nm و با روش Dhindsa و Motoweانجام شد(15). مخلوط واکنش شامل بافر فسفات 50 mM با pH=7 و پراکسید هیدروژن 15 mM می‌باشد. با اضافه کردن 100 میکرولیتر از عصاره بافتی به مخلوط ذکر شده، واکنش شروع می‌شود. تغیرات جذب، پس از شروع واکنش محاسبه گردید. میزان پراکسید هیدروژن موجود در مخلوط واکنش با استفاده از ضریب خاموشی $mM^{-1}cm^{-1}$ €=40 محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گایاکول و اندازه‌گیری میزان جذب تترا گایاکول تشکیل شده از گایاکول در نتیجه فعالیت پراکسیداز در 470nm انجام گرفت. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات 50 mM با pH=7، پراکسید هیدروژن 0/3% و گایاکول 1% می‌باشد. واکنش با افزودن 20 میکرولیتر از عصاره آنزیمی به 2/5 ml مخلوط واکنش در 25 درجه سلسیوس آغاز گردید. با استفاده از تغییرات جذب و ضریب خاموشی تترا گایاکول $mM^{-1}cm^{-1}$ €=25.5، مقدار تترا گایاکول تشکیل شده محاسبه شد (16). فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود درحجم مناسبی از عصاره به دست آمده از روش Bradford گزارش شد (14).

سنجش غلظت پروتئین: برای تهیه عصاره بافتی جهت سنجش کاتالاز، پراکسیداز و پروتئین از روش Bradford استفاده شد (14). در این روش 0/5 گرم از بافت مورد نظر را برداشته و در 3 ml بافر فسفات 50 mM هموژن می‌شود و سپس عصاره حاصل در دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار در 10000 g به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ می‌شوند.به منظور سنجش غلظت پروتئین، به لوله آزمایش مقدار 0/1 ml عصاره بافتی حاصل و 5 ml معرف بیوره افزوده و سریعا ورتکس شد. پس از 25 دقیقه جذب آنها در طول موج 595 nm خوانده شد. به منظور تهیه بیوره، 0/1 گرم کوماسی بریلیانت بلو G250 در 50 ml اتانول 95% به مدت 1 ساعت حل گردید، سپس 100 میلی لیتر اسید فسفریک 85% قطره قطره به آن افزوده شد. در پایان حجم کل محلول به کمک آب مقطر به یک لیتر رسانده شد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.9.7.0]
[DOI: 10.22088/jbums.17.9.44]

رسم منحنی استاندارد پروتئین: به منظور رسم منحنی استاندارد پروتئین، مقدار 1/4 g استاندارد آلبومین گاوی در یک لیتر آب مقطر حل شد و از این محلول غلظت‌های 50، 100، 200، 400، 700، 1400 و 2800 میلی گرم در لیتر ساخته شد. کلیه مراحل کار بر روی آن‌ها توسط معرف بیوره، همانطور که قبلا در نمونه‌های مجهول توضیح داده شده بود، تکرار گردید. جذب هر یک در طول موج 595 nm با استفاده از اسپکتوفتومتر خوانده شد. برای تهیه غلظتهای پروتئینهای نمونه‌های مجهول از منحنی استاندارد حاصل استفاده گردید(نمودار 1).



نمودار 1. منحنی استاندارد پروتئین

سنجش پراکسید هیدروژن (H_2O_2): سنجش پراکسید هیدروژن با استفاده از روش Velikova et al انجام شد (17). 0/1 گرم از بافت مورد نظر در 1 ml تری کلرو استیک اسید 0/1% (TCA) هموژن می‌شود و عصاره حاصل با استفاده از سانتریفوژ یخچال‌دار در 10000 g به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ می‌شوند. سپس 0/5 ml از محلول سانتریفوژ شده به 0/5ml بافر فسفات پتاسیم 10 ml با pH=7 و 1 ml یدید پتاسیم 1 M، اضافه می‌گردد و جذب در طول موج 390nm خوانده می‌شود. مقدار پراکسید هیدروژن در هر نمونه با استفاده از ضریب خاموشی $0/28\ mM^{-1}cm^{-1}$ محاسبه گردید و بر حسب میکرومول بر گرم وزن بافت گزارش شد.

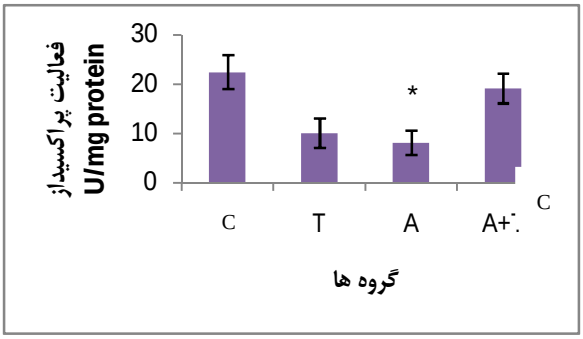
سنجش مالون دی آلدئید (MDA): اندازه‌گیری غلظت MDA به واسطه روش Heath and Packer انجام گرفت (18). طبق این روش 0/2گرم از بافت مورد نظر در 5 ml تری کلرو استیک اسید 0/1% (TCA) هموژن می‌شود و محلول حاصل با استفاده از سانتریفوژ به مدت 10 دقیقه در 10000 g سانتریفوژ شد. به یک میلی لیتر عصاره بافتی، 4 ml محلول TCA 20% که حاوی 0/5% تیوباربیتوریک (TBA) بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت 30 دقیقه در دمای 95 درجه سانتیگراد حمام آب گرم حرارت داده شد. سپس بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت 10 دقیقه در 10000 g سانتریفوژ گردید. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج 532 nm خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز (MDA-TBA) می‌باشد، جذب بقیه رنگیزه‌های غیر اختصاصی در 600 nm تعیین و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $155\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزارSPSS و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) به همراه پس آزمون Tukey آنالیز گردیدند و p<0/05معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

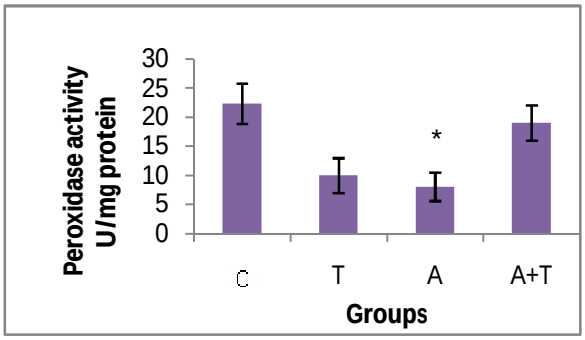
پراکسیداز (POD): فعالیت POD گروه A (8/1080 ±2/4680)، کاهش معنی‌داررا نسبت به گروهC(3/462± 22/4040) نشان می‌دهد (p<0/05). همچنین فعالیت POD گروهA+Tنسبت به گروه A به طور قابل توجهی افزایش یافته است گرچه این افزایش معنی‌دار نمی‌باشد (نمودار 2).

کاتالاز (CAT): گروهA(0/089±0/614)و گروه T(0/0872±0/346) کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه C(0/239±1/71) نشان می‌دهند (به ترتیب p<0/01، p<0/001). همچنین فعالیت CAT گروه A+T نسبت به گروه A به طور قابل توجهی افزایش یافته است گرچه این افزایش معنی‌دار نمی‌باشد (نمودار 3).



نمودار 2. بررسی تغییرات فعالیت آنزیم POD در گروه‌های مورد آزمایش. هر ستون نمایانگر Mean±SEM و N=6 می باشد. *اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه C (p<0/05).

C= کنترل، T= پودر دانه شنبلیله، A=استامینوفنی، A+T= استامینوفنی+ پودر دانه شنبلیله



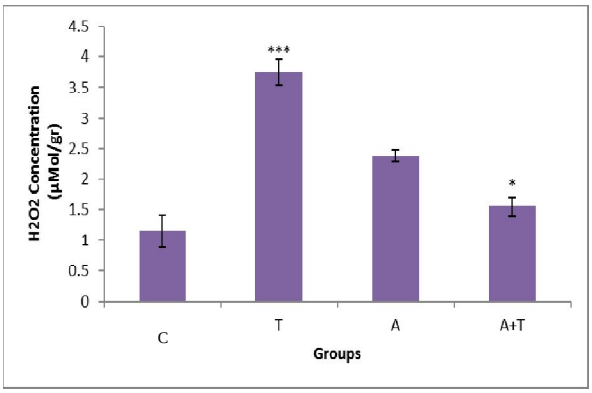
نمودار 3. بررسی تغییرات فعالیت آنزیم CAT در گروه‌های مورد آزمایش. هر ستون نمایانگر Mean±SEM و N=6می باشد. اختلاف معنی‌داری p<0/01 نسبت به گروه C می‌باشد. ***اختلاف معنی داری p<0/001 نسبت به گروه C**

C= کنترل، T= پودر دانه شنبلیله، A=استامینوفنی، A+T= استامینوفنی+ پودر دانه شنبلیله

پراکسید هیدروژن (H2O2): غلظت H2O2 گروه T افزایش معنی‌داری (p<0/001) را نسبت به گروه C، A و A+T نشان داد. علاوه بر این، گروه A+T کاهش (1/56±0/15362) معنی‌داری(p<0/05) را نسبت به گروه A(2/38±0/1048) نشان داد (نمودار 4).

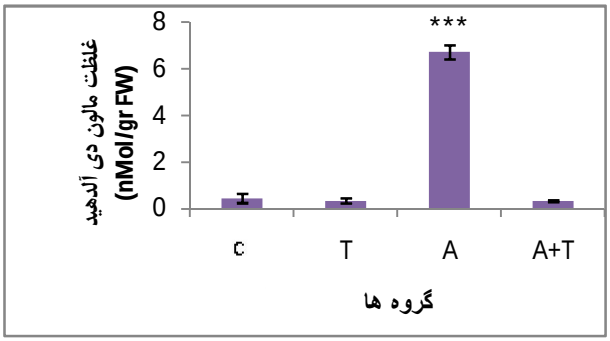
[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.9.7.0]
[DOI: 10.22088/jbums.17.9.44]

مالون دی آلدئید(MDA): غلظت MDA گروه A (0/2608±0/03015) افزایش معنی‌داری (p<0/001) را نسبت به گروه‌های C(0/61±0/2017)، A+T(0/2608±0/0301)و T(0/3414±0/103) نشان داد (نمودار 5).



نمودار4. مقایسه تغییرات غلظت H2O2 در گروه‌های مورد آزمایش، هر ستون نمایانگر Mean±SEM و N=6 میباشد. ***اختلاف معنی‌داری p<0/001 نسبت به گروه‌های C، A و A+T. *اختلاف معنی‌داری p<0/05 نسبت به گروه A.

C= کنترل، T= پودر دانه شنبلیله، A=استامینوفنی، A+T= استامینوفنی+پودر دانه شنبلیله



نمودار 5. مقایسه تغییرات غلظت MDA در گروه‌های مورد آزمایش، هر ستون نمایانگر Mean±SEM و N=6 می‌باشد. * اختلاف معنی‌داری p<0/001 با گروه‌های C، T و A+T.**

C= کنترل، T=پودر دانه شنبلیله، A=استامینوفنی، A+T=استامینوفنی+پودر دانه شنبلیله

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه دانه شنبلیله توانسته است از تغییرات برخی فاکتورهای آنتی اکسیدانی (کاتالاز و پراکسیداز) و تغییرات سطوح مالون دی آلدهید و پراکسید هیدروژن تا حد زیادی بکاهد.زمانی که استامینوفن در دوزهای بالا استفاده می شود، می تواند از طریق تشکیلNAPQIبیش از حد باعث نکروز کبدی شود. NAPQI با پروتئین‌های غشای سلول کبدی به طور کوالانسی ترکیب شده که منجر به تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) از جمله آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل می‌شود (19). در این مطالعه یک افزایش در سطح پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در موش‌های صحرایی استامینوفنی مشاهده شد که با مطالعات Cheng و همکاران وChen و همکاران در توافق است(21 و 20). ROS به طور چشمگیری غشای سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و پراکسیداسیون لیپیدها را القا می‌کند. پراکسیداسیون لیپید یک علامت از استرس اکسیداتیو می‌باشد که در برهمکنش ROS با اسیدهای چرب غیراشباع مطرح می‌شود و شکل گیری محصولاتی از قبیل MDA و 4- هیدروکسی نون انول را پیش می‌برد که سبب آسیب به ترکیبات غشاء سلول، نکروز سلول و التهاب می‌شود (22).

در این مطالعه افزایش قابل توجهی در لیپید پراکسیداسیون در کبد رتهای درمان شده با استامینوفن وجود دارد که به واسطه اندازه‌گیری MDA سنجیده شد که با مطالعه Saxena و همکاران در توافق می‌باشد (23). دوز بالای استامینوفن منجر به کاهش چشمگیری در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می-شود. کاتالاز و پراکسیداز دو آنزیم بزرگ حذف کننده ROS می‌باشند که تبدیل پراکسید هیدروژن به آب را کاتالیز می‌کنند. یک کاهش در فعالیت این آنتی اکسیدان‌ها ممکن است یک افزایش در قابلیت استفاده سوپراکسید و پراکسید هیدروژن را پیش ببرد که در حقیقت رادیکال هیدروکسیل تولید می‌کند(24). در مطالعه حاضر، کاهش در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در کبد رت‌های درمان شده با استامینوفن مشاهده می‌شود. کاهش در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در کبد رت‌های تحت درمان با استامینوفن با مطالعه Gupta و همکارانش مطابقت دارد(25). همچنین گزارش شده است که تجویز استامینوفن با دوزهای 250 و 600 میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در موش، منجر به کاهش سیتوزولی گلوتاتیون پراکسیداز می‌شود (26).

مطالعه ما نشان داد که تیمار رتهای استامینوفنی با 1000 mg/kg پودر دانه شنبلیله از افزایش در میزان پراکسید هیدروژن، MDA و کاهش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز در کبد این رت‌ها جلوگیری می‌کند. این نتایج با کاهش استرس اکسیداتیو در دیگر مطالعات مطابقت دارد که تیمار رت‌ها با پودر دانه شنبلیه در هپاتوکسیسیتی ناشی از تیواستامید به طور وسیعی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را اصلاح می‌کند و از افزایش در پراکسیداسیون لیپید جلوگیری می‌کند(27). در این مطالعه تیمار موش‌های صحرایی سالم با پودر دانه شنبلیله(N+T) منجر به افزایش پراکسید هیدروژن نسبت به گروه کنترل و کاهش بسیار جزیی MDA و کاهش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز شده است. نتایج به دست آمده با مطالعه Sakr و همکاران مطابقت دارد که تیمار موش‌های صحرایی با عصاره پودر دانه شنبلیله، میزان MDA و فعالیت آنزیم کاتالاز را کاهش و فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) را افزایش می‌دهد (28) که افزایش فعالیت این آنزیم منجر به تولید H_2O_2 می‌شود. Mitchell و همکاران نشان دادند که دانه‌های شنبلیله سرشار از فلاونوئیدهای پلی فنولی است که به افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کمک می کند (12). پلی فنول‌ها، بویژه فلاونوئیدها از جمله قویترین آنتی اکسیدان‌های گیاهی می‌باشند. پلی فنول‌ها می توانند کمپلکس‌هایی با فلزات واکنشی مانند آهن، روی و مس تشکیل و جذب آنها را کاهش دهند (29).

میزان زیاد این عناصر (کاتیونهای فلزی) در بدن می‌تواند رادیکال‌های آزاد را تولید کند و به آسیب اکسیداتیو غشای سلول و DNA سلولی کمک کند (30). علاوه براین، پلی فنول‌ها به عنوان تمیز کننده (Scavenger)رادیکال آزاد در بدن عمل می‌کنند و قبل از اینکه رادیکال‌های آزاد به سلول آسیب وارد کنند می-توانند آنها را خنثی کنند (31). گیاهان دیگری نیز وجود دارند که سرشار از

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.9.7.0]
[DOI: 10.22088/jbums.17.9.44]

فلاونوئید می‌باشند از جمله زردچوبه و زنجبیل (32) و شیر سویا (33). Yakubu و همکاران اثر شیر سویا را بر آسیب کبدی ناشی از استامینوفن بررسی کردند و مشاهده شد که این گیاه از آسیب کبدی ناشی از استرس اکسیداتیو جلوگیری می کند (33). همچنین گزارش شده است که فلاونوئید قادر به اعمال اثر پرو اکسیدانی از جمله تشکیل رادیکالهای آزاد به جای تمیز کردن (Scavenge) کردن آن‌ها می‌باشد(34). در یک مطالعه فلاونوئیدهایی مانند آپیجنین و نارینجنینبا الگوی تعویض نوع فنول در حلقه B، زمانیکه در حضور GSH و آنزیمهایی از تیموس و مغز استخوان مانند پراکسیدازها انکوبه شد، منجر به 50-30 بار افزایش در تشکیل گونه‌های اکسیژن واکنشی شد (35). مشاهده شده است که این فلاونوئیدها در غلظت‌هایی که دیگر فلاونوئیدها هنوز به عنوان آنتی اکسیدان فعال هستند و مانع پراکسیداسیون لیپید می‌شوند، به عنوان پروآکسیدان عمل می‌کنند و پراکسیداسیون لیپید ایجاد می‌نمایند. اکسیداسیون شیمیایی و آنزیمی فلاونوئیدها، رادیکال سمی کوئینون فلاونوئید تولید می‌کند که ممکن است توسط GSHتمیزشود، در نتیجه فلاونوئید بازسازی می‌شود و رادیکال Thyil از گلوتاتیون ایجاد می شود. رادیکال Thyil ممکن است با GSH واکنش دهد تا یک آنیون رادیکال دی سولفید تولید کند که به سرعت مولکول اکسیژن را به رادیکال آنیون سوپر اکسید کاهش دهد. مکانیسم دیگر فعالیت پرواکسیدانی فلاونوئید به تشکیل محصولات اکسیداسیون نوع کوئینون مربوط می‌شود و مخصوصا زمانی رخ می‌دهد که قسمت 3 و 4 کاتکول در مولکول فلاونوئید موجود است. اکسیداسیون کاتکول به کوئینون‌ها و متیدهای ایزومری کوئینون آنها، الکتروفیلهای قوی تولید می کند که می تواند DNA را آلکیله کند (36). نتایج مطالعه نشان داد که پودر دانه شنبلیله می تواند سبب کاهش استرس اکسیداتیو در آسیب کبدی ناشی از استامینوفن شود.احتمال می‌رود که نقش دانه شنبلیله در افزایش دفاع آنتی اکسیدانی مربوط به ترکیبات فلاونوئیدی باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از ریاست دانشکده علوم و پرسنل گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان که همکاری صمیمانه‌ای را در اجرای این تحقیق داشتند و تمامی کسانیکه که ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.9.7.0]
[DOI: 10.22088/jbums.17.9.44]

The Effects of Fenugreek Seed Powder on Oxidant and Antioxidant Factors in Male Rats with Acetaminophen-induced Liver Toxicity

A. Mohammadzadeh (MSc)[1], A. Gol (PhD)[*1], H.Oloumi (PhD)[2]

1.Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, I.R.Iran
2. Science and Technology Research and Environmental Sciences, Institute of Environmental Sciences, Department of Ecology, Kerman, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 17(9);Sep 2015; PP:44-51

Received: Nov11th 2014, Revised: Feb4th 2015, Accepted: May 6th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Acetaminophen can induce liver damage via oxidative stress. This study aimed to evaluate the protective effects of fenugreek seed powder on oxidant and antioxidant factors in acetaminophen-induced liver toxicity.

METHODS: In this experimental study, 24 male Wistar rats, weighing 250-280 g, were divided into four groups: control, normal saline+fenugreek seed powder, acetaminophen and acetaminophen+fenugreek seed powder. After 24 h of fasting, groups Normal and Normal+ Fenugreek received normal saline and groups Acetaminophen and Acetaminophen + Fenugreek received 1000 mg/kg acetaminophen by gavage. After six hours, the normal saline and acetaminophen groups received normal saline, whereas the groups receiving normal saline+fenugreek powder and acetaminophen+fenugreek powder were administered 1000 mg/kg of fenugreek seed powder via gavage. Twelve hours after the second gavage, the rats were sacrificed and liver tissues were frozen and assessed.

FINDINGS: A decline in malondialdehyde and hydrogen peroxide levels was observed in group acetaminophen+fenugreek, compared to the acetaminophen group (0.2608±0.03 and 1.56±0.153 vs. 6.7±0.344 and 2.38±0.104 in acetaminophen groups; $p<0.001$ and $p<0.05$, respectively). Also, the activities of peroxidase and catalase increased in these groups, compared to the acetaminophen groups (19.07± 3.366 and 1.174±0.242 vs. 8.108 ± 2.46 and 0.614±0.089 in acetaminophen groups, respectively).

CONCLUSION: The results of this study showed that fenugreek seeds could lead to reduced oxidative stress in acetaminophen-induced liver toxicity.

KEY WORDS: *Acetaminophen, Fenugreek seeds, Liver, Oxidative stress, Rat.*

Please cite this article as follows:

Mohammadzadeh A, Gol A, Oloumi H. The Effects of Fenugreek Seed Powder on Oxidant and Antioxidant Factors in Male Rats with Acetaminophen-induced Liver Toxicity. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(9):44-51.

[*] **Corresponding Author: A. Gol (PhD)**
Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, ShahidBahonar University, 22 Bahman Bulverde, Iran
Tel: +98 34 33257432
Email: agol@mail.uk.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.9.7.0]
[DOI: 10.22088/jbums.17.9.44]

References

1.Fontana RJ, Seeff LB, Andrade RJ, Bjornsson E, Day CP, Serrano J, et al. Standardization of nomenclature and causality assessment in drug-induced liver injury: summary of a clinical research workshop. Hepatology. 2010; 52(2):730-42.

2.Holt M, Ju C. Drug-induced liver injury. Handb Exp Pharmacol 2010; 196: 3-27.

3.Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, et al. Acetaminophen- induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. Hepatology. 2005;42(6):1364-72.

4.Kazemi MT, Pour Nasrollah M, Rezaei MM, Jorsaraei SGA, Maliji Gh, Kazemi S, et al. Effect of piperine pretreatment on biochemical profiles of acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. J Babol Univ Med Sci. 2012; 14(4):7-14. [In Persian]

5.WHO, IUCN, & WWF. Guidelines on the conservation of medicinal plants. Gland, Switzerland. 1993; p.38.

6.Becker EM, Nissen LR, Skibsted LH. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. Eur Food Res Technol. 2004;219(6):561-71.

7.Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules. 2010;15(10):7313-52.

8.Kaviarasan S, Naik GH, Gangabhagirathi R, Anuradha CV, Priyadarsini KI. In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (Trigonella foenum graecum) seeds. Food Chem. 2007;103(1):31-7.

9.Sauvaire Y, Baccou JC. Nutritional value of the proteins of a leguminous seed: Fenugreek (Trigonella foenum graecum). Nutr Rep Int. 1976;14:527-37.

10.Mishkinsky JS, Goldschmied A, Joseph B, Ahronson Z, Sulman FG. Hypoglycaemic effect of Trigonella foenum graecum and Lupinus termis (leguminosae) seeds and their major alkaoids in alloxan diabetic and normal rats. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1974; 210(1):27-36.

11.Dawidar AM, Saleh AA, Elmotei SL. Steroid sapogenin constituents of fenugreek seeds. Planta Med.1973;24(4):367-70.

12.Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen- induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. J Pharmacol Exp Ther. 1973;187(1):185-94.

13.Sricharoen A, Field CJ, Thompson ABR, Basu TK. The modifying effect of galac-tomannar from Canadian-grown fenugreek (Trigonella-foenum graecum L.) on the glycemic and lipidemic status in rats. J Clin Biochem Nutr. 2008;43(3):167-74.

14.Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgra quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976(1-2);72:248-54.

15.Dhindsa RS, Motowe W. Drought tolerance in two mosses: correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. J Exp Bot. 1981;32(1):79-91.

16.Plewa MJ, Smith SR, Wagner ED. Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. Mutat Res. 1991;247(1):57-64.

17.Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants Protective role of exogenous polyamines. Plant Sci. 2000; 151(1):59-66.

18.Heath RL, Packer L. Photoperoxidarion in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys. 1968;125(1):189-98.

19.Nelson SD. Mechanisms of the formation and disposition of reactive metabolites that cancause acute liver injury. Drug Metab Rev. 1995;27(1-2):147-77.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.9.7.0]
[DOI: 10.22088/jbums.17.9.44]

20.Cheng J, Ma X, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ. Rifampicin pregnane X receptor and CYP3A4 induction enhance acetaminophen-inducedtoxicity. Drug Metab Dispos. 2009;37(8):1611-21.
21.Chen C, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ. Identification of novel toxicity-associated metabolites by metabolomics and mass isotopomer analysis of acetaminophen metabolismin wild-type and Cyp2e1-null mice. J Biol Chem. 2008; 283(8):4543-59.
22.Stark G. Functional consequences of membrane damage. J Membr Biol. 2005;205(1):1-16.
23.Saxena M, Shakya A K, Sharma N, Shrivastava S, Shukla S. Therapeutic efficacy of rosa damascena mill. on acetaminophen-induced oxidative stress in albino rats. Environ Pathol Toxicol Oncol. 2012;31(3):193-201.
24.Kinalski M, Sledziewski A, Telejko B, Zarzycki W., Kinalska I. Lipidperoxidation and scavenging enzyme activity in streptozotocin-induce-diabetes. Acta Diabetol. 2000;37(4):179-83.
25.Gupta G, Krishna G, Chellappan DK, Gubbiyappa KS, Candasamy M, Dua K. Protectivee ffect of pioglitazone, a PPARy agonist against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Mol Cell Biochem. 2014;393(1-2):223-8.
26.Tirmenstein MA, Nelson SD. Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols Contribution of impaired thiol metabolizing enzymes and the breakdown of adenine nucleotides. J Biol Chem. 1990;265(6):3059-65.
27.Zargar S. Protective effect of Trigonella foenum-graecum on thioacetamide induced hepatotoxicity in rats. Saudi J Biol Sci. 2014;21(2):139-45.
28.Sakr SA, Abo-El-Yazid SM. Effect of fenugreek seed extract on adriamycin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in albino rats. Toxicol Ind Health. 2012;28(10):876-85.
29.Nwanna EE, Oboh G. Antioxidant and hepatoprotective properties of polyphenol extracts from Telfairia occidentalis (Fluted Pumpkin) leaves on acetaminophen induced liver damage. Pak J Biol Sci. 2007;10(16):2682-7.
30.Okafor OY, Erukainure OL, Ajiboye JA, Adejobi RO, Owolabi FO, Kosoko SB. Pineapple peel extractmodulates lipid peroxidation, catalase activity and hepatic biomarker levels in blood plasma of alcohol-induced oxidative stressed rats. Asian Pac J Trop Med. 2011;1(1):11-4.
31.Ara N, Nur H. In vitro antioxidant methanolic leaves and flowers extracts of Lippia Alba. Res J Med Sci. 2009;4(1): 107-10.
32.Skrovankova S, Misurkova L, Machu L. Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. Adv Food Nutr Res. 2012;67:75-139.
33.Yakubu N, Oboh G, Olalekan AA. Antioxidant and hepatoprotective properties of tofu (Curdle Soymilk) against acetaminophen-induced liver damage in rats. Biotechnol Res Int. 2013;2013:230142.
34.Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure activity relationships. Free Radic Biol Med. 1997;22(5):749-60.
35.Galati G, Moridani MY, Chan TS, O'Brien PJ. Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. Free Radic Biol Med. 2001;30(4):370-82.
36.Galati G, Chan T, Wu B, O'Brien PJ. Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. Chem Res Toxicol. 1999; 12(6):521-5.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.9.7.0]
[DOI: 10.22088/jbums.17.9.44]