مطالعه اثرات محافظتی کروسین بر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی تجربی کبد در موش صحرایی

بهرام عمواوغلی تبریزی[1]*، داریوش مهاجری[2]

۱- دانشیار گروه آموزشی علوم درمانگاهی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۲- استاد گروه آموزشی پاتوبیولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: b_tabrizi@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۴/۳/۱۴ پذیرش نهایی: ۹۴/۶/۲۸)

Archive of SID

چکیده

خونرسانی مجدد پس از ایسکمی ممکن است باعث بروز آسیب‌های متابولیکی و ساختاری در کبد شود. هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر کروسین بر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی کبد در موش‌های صحرایی بود. بدین منظور ٤٠ سر موش صحرایی نژاد ویستار به‌طور تصادفی به چهار گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند: ۱- گروه شاهد: موش‌های دستکاری نشده؛ ۲- گروه کنترل جراحی: موش‌هایی که تحت جراحی به‌جز ایسکمی-بازخونرسانی قرار گرفته و نرمال سالین دریافت کردند؛ ۳- گروه ایسکمی-بازخونرسانی: موش‌هایی که ٤٥ دقیقه تحت ایسکمی، سپس ٤٥ دقیقه دیگر در معرض خونرسانی مجدد کبد قرار گرفتند؛ ٤- گروه ایسکمی-بازخونرسانی و تیمار با کروسین: موش‌هایی که با کروسین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) مورد پیش‌درمانی قرار گرفتند. موش‌ها پس از اخذ نمونه‌های خون و بافت کبد آسان‌کشی شدند. آلانین آمینو ترانسفراز، آسپارتات آمینو ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز سرم اندازه‌گیری شد. مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در هموژنات بافت کبد اندازه‌گیری شد. همچنین، آسیب‌شناسی بافتی کبد توسط میکروسکوپ نوری انجام شد. در گروه ٤، کروسین به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) میزان افزایش‌یافته آنزیم‌های شاخص آسیب کبد را کاهش و به‌طور معنی-داری ($p<۰/۰۰۱$) میزان پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش و سطوح کاهش‌یافته آنتی‌اکسیدان‌های کبد را افزایش داد. آسیب بافتی به‌طور معنی‌داری در کبدهای تیمار شده با کروسین کاهش پیدا کرد. این نتایج نشان می‌دهد که کروسین با خواص آنتی‌اکسیدانی خود، دارای اثرات محافظتی در برابر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی کبد بوده و انتخاب مناسبی برای درمان آسیب‌های مرتبط با ایسکمی-بازخونرسانی کبد می‌باشد.

کلید واژه‌ها: کروسین، ایسکمی-بازخونرسانی، کبد، موش صحرایی.

www.SID.ir

مقدمه

خونرسانی مجدد پس از ایسکمی کبد ممکن است به آسیب متابولیک و ساختاری آن منجرشود. آسیب ایسکمی-بازخونرسانی کبد ممکن است به علت تروما، عفونت، پیوند کبد (Shin *et al*., 2008) و یا بستن ساقه کبدی در طی اعمال جراحی کبد (van Gulik *et al*., 2007) ایجاد شود. این آسیب به عنوان مشکلی جدی برای اعمال جراحی کبد مطرح می‌باشد که باعث ایجاد محدودیت در اعمال جراحی پیوند کبد می‌گردد (He *et al*., 2005).

رادیکال‌های آزاد اکسیژن که در برقراری مجدد جریان خون تولید می‌شوند، نقش مهمی را در آسیب ناشی از ایسکمی-بازخونرسانی بر عهده دارند (Hassan-Khabbar *et al*., 2008). رادیکال‌های فعال اکسیژن منجر به یک پاسخ التهابی و آسیب بافتی با فعال کردن برخی از واسطه‌ها می‌شوند. این رادیکال‌ها همچنین می‌توانند به‌طور مستقیم به محتویات و اجزای سلولی آسیب برسانند (Montalvo-Jave *et al*., 2008). تلاش‌های فراوانی برای کاهش آسیب ایسکمی-بازخونرسانی انجام شده است. حفاظت در برابر آسیب خونرسانی مجدد را می‌توان با درمان‌های مناسب از جمله کاربرد آنتی اکسیدان‌ها و داروهای ضد التهابی اجرا نمود (Polat *et al*., 2008; Pulitano *et al*., 2008; Shen *et al*., 2007).

شرایط پاتولوژیک نظیر سرطان‌ها، پیری، بیماری-های قلبی-عروقی، ایسکمی و آماس در تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن دخیل هستند (Barber and Harris, 1994; Das and Maulik, 1994). بنابراین، از بین بردن گونه‌های رادیکال اکسیژن یک راهکار تدافعی موثری در برابر بیماری‌های مختلف قلمداد می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که در صورت وجود در غذاها و بدن، حتی در مقادیر ناچیز، می‌توانند بدن را در مقابل انواع مختلف آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن محافظت کنند (Sanches-Moreno *et al*., 1999).

کروسین (crocin) به عنوان یک کاروتنوئید گلیکوزیله دارای اثرات فارماکولوژیک متعدد از جمله محافظت از آسیب ناشی بیماری‌های قلبی-عروقی (Xiang *et al*., 2006)، جلوگیری از پرولیفراسیون سلول‌های توموری (Magesh *et al*., 2006)، محافظت از سیستم عصبی (Ahmad *et al*., 2005) و محافظت از هپاتوسیت‌ها (Tseng *et al*., 2005) می‌باشد. در هر صورت، در بین مکانیسم‌های محافظتی مختلف، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کروسین مسئول اثرات فارماکولوژیکی آن قلمداد شده است (Chen *et al*., 2008).

بررسی‌های انجام شده توسط حسین‌زاده و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان داده است که کروسین قادر است بافت کلیه موش‌های صحرایی را در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از ایسکمی-بازخونرسانی به طور کامل محافظت کند (Hosseinzadeh *et al*., 2005). مطالعات انجام شده توسط زنگ و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داده است که کروسین آسیب اکسیداتیو-نیتراتیو ناشی از خونرسانی مجدد را در بافت مغز کاهش می‌دهد (Zheng *et al*., 2007). حسین‌زاده و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که کروسین آسیب ناشی از ایسکمی-بازخونرسانی را در

www.SID.ir

عضله اسکلتی موش صحرایی کاملاً بهبود می‌بخشد (Hosseinzadeh *et al.*, 2009).

با بررسی منابع مشخص شده است که تاکنون مطالعه‌ای در مورد تاثیر محافظتی کروسین در برابر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی کبد در موش صحرایی انجام نشده است. بنابراین، مطالعه حاضر برای اولین بار جهت ارزیابی اثرات محافظتی کبد در برابر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی کبد انجام می‌گردد.

با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی کروسین، این ماده احتمالاً توانایی آن را خواهد داشت که بتواند کبد را از آسیب‌های ناشی از تنش‌های اکسایشی در خونرسانی مجدد پس از ایسکمی محافظت کند.

با انجام این مطالعه خاصیت دارویی کروسین در محافظت از بافت کبد در شرایط ایسکمی-بازخونرسانی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد که در صورت تائید می‌تواند به عنوان یک منبع قابل دسترس با خاصیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی بود و در سال ۱۳۹٤ در محل مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز انجام شد. برای انجام این مطالعه، از ٤٠ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۰ ± ۲۰۰ گرم و در محدوده سنی ۹ هفته استفاده شد. شرایط تغذیه و نگه‌داری برای تمام گروه‌ها یکسان و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای ۲ ± ۲۱ درجه سلسیوس بود. جیره غذایی یکسان و آب نیز به‌طور آزاد در دسترس قرار گرفته و پس از یک هفته عادت به شرایط جدید، آزمایش شروع شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به ٤ گروه مساوی تقسیم شدند: ۱- گروه شاهد: در مورد موش‌های این گروه هیچ‌گونه مداخله جراحی و دستکاری کبد انجام نشد؛ ۲- گروه شاهد جراحی: موش‌های این گروه مشابه با گروه ایسکمی-بازخونرسانی تحت عمل جراحی قرار گرفته ولی متحمل ایسکمی-بازخونرسانی کبد نشدند. این موش‌ها به مدت برابر با گروه ایسکمی-بازخونرسانی (٤٥ دقیقه ایسکمی و ٤٥ دقیقه بازخونرسانی) تحت بیهوشی قرار گرفته و قبل از القا ایسکمی، نرمال سالین را به طور داخل صفاقی دریافت کردند؛ ۳- گروه ایسکمی-بازخونرسانی: موش‌های این گروه تحت عمل جراحی قرار گرفته و به مدت ٤٥ دقیقه تحت ایسکمی، سپس ٤٥ دقیقه دیگر تحت خونرسانی مجدد کبد قرار گرفتند؛ ٤- گروه ایسکمی-بازخونرسانی و تیمار با کروسین: موش‌های این گروه تحت عمل جراحی قرار گرفته و به مدت ٤٥ دقیقه تحت ایسکمی، سپس ٤٥ دقیقه دیگر تحت خونرسانی مجدد کبد قرار گرفتند. این موش‌ها کروسین (Fluka Chemicals, UK) را با دز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور داخل صفاقی ۱۵ دقیقه قبل از القا ایسکمی دریافت کردند. میزان و روش مصرف کروسین بر اساس مطالعات قبلی در مورد تاثیر کروسین بر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی کلیه در موش صحرایی انتخاب شد (Hosseinzadeh *et al.*, 2005). مدت زمان القاء ایسکمی در بافت کبد نیز بر اساس مطالعه گدیک و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مورد تاثیر رزوراترول بر استرس اکسیداتیو و تغییرات بافتی ناشی از آسیب ایسکمی-بازخونرسانی کبد در موش صحرایی انتخاب شد (Gedik *et al.*, 2008). در این مطالعه کلیه ملاحظات اخلاقی و

Archive of SID
www.SID.ir

پروتکل‌های کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تائید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی بود.

برای انجام جراحی، موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین هیدرو کلراید ۱۰۰ mg/kg و زایلازین mg/kg ۲۰ بیهوش شدند. بعد از تراش موها و ضدعفونی پوست ناحیه شکم، برش خط وسط (midline incision) ایجاد شد. پس از آشکارسازی ناف کبد، سرخرگ مشترک کبدی (common hepatic artery) و سیاهرگ پورتال (portal vein) مشخص و به مدت ٤٥ دقیقه به‌وسیله گیره‌های نان‌تروماتیک عروقی مسدود شدند. پس از برداشتن گیره‌ها و رفع انسداد، خونرسانی مجدد به مدت ٤٥ دقیقه انجام شد (Gedik *et al.*, 2008).

جهت اندازه‌گیری برخی فاکتورهای بیوشیمیایی شامل آلانین آمینو ترانسفراز، آسپارتات آمینو ترانسفراز (Reitman and Frankel, 1957) و لاکتات دهیدروژناز (Martinek, 1972)، ۵ میلی‌لیتر خون از آئورت شکمی موش‌ها اخذ گردید.

برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی در بافت کبد، موش‌ها به آسانی با تزریق دز بالای پنتوباربیتال سدیم (sodium pentobarbital) کشته شدند. کبد موش‌ها سریعاً خارج و به دو قسمت تقسیم شد. یک قسمت در سالین بسیار سرد شستشو و از آن هموژنات ۱۰٪ (یک حجم بافت در ۹ حجم بافر هموژناسیون) تهیه شد. به این صورت که، قطعات بافت کبد در ۱۵۰ میلی‌لیتر بافر هموژناسیون (Tris-HCl ۲۰ میلی‌مول، pH= ۷/۸ حاوی استات منیزیم و کلرید پتاسیم ۳۰ میلی‌مول و سوکروز ۰/۲۵ مول) ریخته شد، سپس توسط دستگاه هموژنایزر به مدت ۱/۵ دقیقه تحت عمل هموژناسیون قرار گرفت. هموژنات بافتی پس از صاف شدن با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و محلول شناور (supernatant) جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی (LPO) از طریق اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید (malondialdehyde; MDA) و همچنین برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (superoxide dismutase; SOD)، کاتالاز (catalase; CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (glutathione peroxidase; GPX) و گلوتاتیون ردوکتاز (glutathione reductase GR) مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی مورد مطالعه و میزان MDA با استفاده از کیت‌های تجاری موجود (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China) و طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده کیت انجام شد. مقدار MDA بافتی به صورت نانومول مالون‌دی‌آلدئید (nmol) در میلی‌گرم پروتئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به صورت واحدهای قراردادی در میلی‌گرم پروتئین عنوان گردید.

پراکسیداسیون چربی در بافت کبد با روش رنگ-سنجی (colorimetrically) به وسیله اندازه‌گیری TBARS (thiobarbituric acid reacting substances) طبق روش فراگا و همکاران در سال ۱۹۸۸ انجام شد (Fraga *et al.*, 1988). به طور خلاصه: ۰/۱ میلی لیتر هموژنات بافتی با ۲ میلی لیتر معرف (Thiobarbituric acid; TBA-trichloroacetic acid, TCA-Hcl) (۳۷٪ TBA، ۰/۲۵

www.SID.ir

مول HCL و ۱۵٪ TCA، به نسبت ۱:۱:۱) مخلوط و پس از ۱۵ دقیقه قرارگیری در بن ماری جوشان، خنک گردید و در ۳۵۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. شدت جذب محلول رویی شفاف در ۵۳۵ nm در مقابل بلانک اندازه‌گیری گردید. مقادیر به صورت نانومول بر ۱۰۰ گرم بافت بیان شدند.

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز توسط روش نیشیکیمی و همکاران تعیین گردید (Nishikimi *et al.*, 1972). در حدود ۵ میکروگرم از پروتئین‌های تام هر یک از هموژنات‌های کبد با بافر پیروفسفات سدیم، فنازین متوسولفات (phenazine methosulfate; PMT) و نیترو-بلو تترازولیوم (Nitro-blue Tertazolium; NBT) مخلوط گردید. واکنش با افزودن نیکوتین‌آمید-آدنین دی‌نوکلئوتید (Nicotinamide-adenine dinucleotide; NADH) آغاز شد. مخلوط واکنش در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه انکوبه و با افزودن ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال متوقف گردید. شدت جذب مخلوط رنگ‌زای تشکیل شده در ۵۶۰nm اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به صورت غلظت آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از تولید رنگ تا ۵۰ درصد در ۱ دقیقه، تحت شرایط مطالعه، تعیین گردید.

فعالیت کاتالاز توسط روش کلایبورن و بر اساس تجزیه پراکسید هیدروژن در ۲۴۰nm، مورد سنجش قرار گرفت (Claiborne, 1985). به‌طور خلاصه، مخلوط مورد سنجش متشکل از ۱/۹۵ میلی لیتر بافر فسفات (۰/۰۵ M, pH= ۷)، ۱ میلی‌لیتر پرکسید هیدروژن (۰/۰۱۹ M) و ۰/۰۵ میلی‌لیتر PMS (۱۰٪) در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر بود. تغییرات در جذب، در ۲۴۰nm اندازه‌گیری شد. در نهایت نتیجه به شکل "فعالیت کاتالاز در دقیقه" محاسبه گردید.

فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از روش روتراک و همکاران (Rotruck *et al.*, 1973) و بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت.

$H_2O_2 + 2GSH$ (گلوتاتیون احیاء) $\rightarrow 2H_2O +$ GSSG(گلوتاتیون اکسید)

گلوتاتیون پراکسیداز، در هموژنات بافتی، گلوتاتیون را اکسیده کرده که به طور هم زمان پراکسید هیدروژن به آب احیاء می‌گردد. این واکنش پس از ۱۰ دقیقه توسط تری‌کلرواستیک اسید متوقف و گلوتاتیون باقیمانده توسط محلول دی‌تیوبیس نیتروبنزوئیک اسید (Dithiobis nitrobenzoic acid; DTNB) مجدداً فعال گردیده و منجر به تشکیل ترکیب رنگی می‌گردد که با اسپکتروفتومتر در ۴۲۰ nm اندازه‌گیری می‌شود. مخلوط واکنشگر متشکل از ۰/۲ میلی‌لیتر اتیلن دی‌آمین تترا-استیک اسید (ethylenediamine tetra-acetic acid; EDTA) ۰/۸ mM، ۰/۱ میلی‌لیتر آزید سدیم (sodium azide) ۱۰ mM، ۰/۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۲/۵ mM و ۰/۲ میلی‌لیتر هموژنات بود که در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد متوقف و لوله‌ها با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۳ میلی‌لیتر دی سدیم هیدروژن ۰/۸ mM و ۰/۱ میلی لیتر DTNB ۰/۰۴ درصد به محلول شناور افزوده شد و بلافاصله رنگ حاصله در ۴۲۰ nm اندازه‌گیری شد. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز به

Archive of SID
www.SID.ir

صورت میلی‌گرم پروتئین/دقیقه/میکرومول گلوتاتیون اکسید بیان گردید.

فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز با استفاده از روش مهنداس و همکاران (Mohandas *et al.*, 1984) بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت.

$$NADPH + H^+ + GSSG \rightarrow NADP^+ + 2GSH$$

در حضور گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون اکسیده، احیاء گردیده و هم زمان، NADPH به +NADP اکسیده می‌شود. فعالیت آنزیم در دمای اتاق و با ناپدید شدن میزان NADPH در دقیقه با اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری کاهش جذب نوری در ۳٤۰nm، تعیین گردید.

برای آسیب‌شناسی بافتی، قسمت باقی مانده بافت کبد در فرمالین بافر ۱۰ درصد پایدار شد. از نمونه‌های فوق با استفاده از شیوه‌های رایج پاساژ بافت و تهیه مقاطع هیستوپاتولوژی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون و با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین تهیه شد (Lee and Luna, 1988). شدت آسیب کبد بر اساس یک مقیاس نیمه کمی (semiquantitative scale) و دوسو کور طبق روش ارائه شده توسط فری و همکاران در سال ۱۹۸٤ ارزیابی گردید. شدت آسیب، از صفر تا ٤ (صفر: عدم وجود آسیب، ۱: حداقل آسیب، ۲: آسیب ملایم، ۳: آسیب متوسط و ٤: آسیب شدید) رتبه‌بندی شد (Frei *et al.*, 1984). کلیه درجه‌بندی‌ها با بزرگنمایی ۱۰۰× و در ۵ میدان میکروسکوپی از هر برش، به‌طور تصادفی، با میکروسکوپ نوری مدل نیکون (ECLIPSE E200، ساخت کشور ژاپن) انجام شد.

تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های به‌دست آمده کمّی، به صورت mean±S.E.M ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) در سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ توسط نرم‌افزار آماری SPSS 17 مورد واکاوی آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

در موش‌های صحرایی گروه ۲ (کنترل جراحی)، تغییر معنی‌داری در هیچ یک از پارامترهای مورد سنجش در مقایسه با گروه ۱ (شاهد) ایجاد نشد. در موش‌های صحرایی گروه ۳ (ایسکمی-بازخونرسانی مجدد)، سطوح سرمی آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز در مقایسه با گروه ۱ (شاهد)، به‌طور معنی‌داری ($p=۰/۰۰۰$) افزایش و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز کبد به‌طور معنی‌داری ($p=۰/۰۰۰$) کاهش و میزان مالون-دی‌آلدئید آن به طور معنی‌داری ($p=۰/۰۰۰$) افزایش یافت. در گروه ٤ (ایسکمی-بازخونرسانی مجدد به-علاوه تیمار با کروسین) تیمار با کروسین مانع از افزایش آنزیم‌های شاخص آسیب کبد در اثر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی مجدد شد به‌طوری که، تفاوت معنی‌داری بین این گروه و گروه شاهد سالم برآورد نگردید. همچنین کروسین مانع از افزایش مالوندی-آلدئید و همچنین مانع از کاهش فعالیت و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در اثر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی شد به‌طوری که، تفاوت معنی‌داری بین این گروه و گروه ۱ (شاهد) برآورد نگردید (جداول ۱ و ۲).

www.SID.ir

در آسیب‌شناسی بافتی ساختار لوبولی و سلولی کبد در موش‌های صحرایی گروه ۱ (شاهد) سالم و طبیعی بود (شکل ۱). هیچگونه تغییر پاتولوژیکی خاصی نیز در بافت کبد موش‌های صحرایی گروه ۲ (کنترل جراحی)، مشاهده نشد به‌طوری‌که، ساختار بافتی کبد، کاملاً طبیعی به نظر می‌رسید (شکل ۲). در کبد موش‌های صحرایی گروه ۳ (ایسکمی-بازخونرسانی مجدد)، نکروز هپاتوسیت‌ها توام با ارتشاح متوسط سلول‌های آماسی در اطراف وریدچه مرکزی و آماس شدید در ناحیه پورتال همچنین کانون‌های پراکنده نکروز در قسمت‌های مختلف لوبول‌های کبدی مشاهده می‌شد (شکل ۳). در گروه ٤ (ایسکمی-بازخونرسانی مجدد به‌علاوه تیمار با کروسین)، تیمار با کروسین، به‌طور قابل توجهی مانع از بروز تغییرات پاتولوژیک در بافت کبد موش‌های صحرایی شده بود و تنها آسیب قابل مشاهده، واکوئولاسیون سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها به‌خصوص در اطراف وریدچه مرکزی بود (شکل ٤). مشاهدات ریزبینی بافت کبد موش‌های صحرایی گروه‌های تحت مطالعه به‌طور کمّی در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۱- تاثیر کروسین بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم موش صحرایی در آسیب کبدی ناشی از ایسکمی-بازخونرسانی

گروه	تیمار	فراسنجه‌های بیوشیمیایی		
		آلانین آمینوترانسفراز (U/L)	آسپارتات آمینوترانسفراز (U/L)	لاکتات دهیدروژناز (U/L)
۱	شاهد	۸۰/٥٤±۲/۲٥[a]	۱٥۹/۸٤±٥/۳۷[a]	٦۸٥/۳۱±۲۳/٥۲[a]
۲	کنترل جراحی	۸۲/٦۲±۲/٥٤[a]	۱٦۳/۲۱±٤/٦۲[a]	٦۹۷/٥۲±۲۱/٤۷[a]
۳	ایسکمی-بازخونرسانی	۱۸۱/٤۲±۳/۳۸[b]	۲۳٥/٦۷±۷/۱٥[b]	۱۱۲٥/٦٤±۲٦/٤۹[b]
٤	ایسکمی-بازخونرسانی به‌علاوه تیمار با کروسین	۸۳/۲٥±۲/٤۹[a]	۱٦۸/۹٥±٤/۸۱[a]	۷۱٥/۳۳±۲٤/۸۲[a]

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد برای ۱۰ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است.
a,b: حروف غیرمشابه در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار است ($p<۰/۰٥$).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- تاثیر کروسین بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کبد موش صحرایی در آسیب کبدی ناشی از ایسکمی-بازخونرسانی

گروه	تیمار	فراسنجه‌های بیوشیمیایی				
		مالون‌دی‌آلدئید (nmol/g protein)	سوپراکسید دیسموتاز (U/mg protein)	کاتالاز (U/mg protein)	گلوتاتیون پراکسیداز (U/mg protein)	گلوتاتیون ردوکتاز (U/mg protein)
۱	شاهد	٤/۲۱±۰/۱٦[a]	۱۷/۱۲±۱/۱۳[a]	۷۲/۱۱±٤/٥۲[a]	۱٥/۳۷±۰/۹٥[a]	۱۲۳/٦۱±۳/٥۲[a]
۲	کنترل جراحی	٤/۳۱±۰/۱۷[a]	۱٦/٥٥±۰/۹۳[a]	٦۷/۷٥±۳/۸۲[a]	۱٤/۱۹±۰/٦۲[a]	۱۱۷/۳٤±۳/٤۰[a]
۳	ایسکمی-بازخونرسانی	٥/٤۲±۰/۱۸[b]	۹/۸۷±۰/٦۸[b]	٤۲/۸٥±۳/۲٦[b]	۷/٦٥±۰/٤٦[b]	۷٥/٦۲±۱/۸۹[b]
٤	ایسکمی-بازخونرسانی به‌علاوه تیمار با کروسین	٤/۲۹±۰/۱۳[a]	۱٥/۸۳±۰/۷٤[a]	٦٥/۹۲±۲/۳۷[a]	۱۳/۸۲±۰/٥٤[a]	۱۲۰/۳۱±۲/۳٥[a]

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد برای ۱۰ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است.

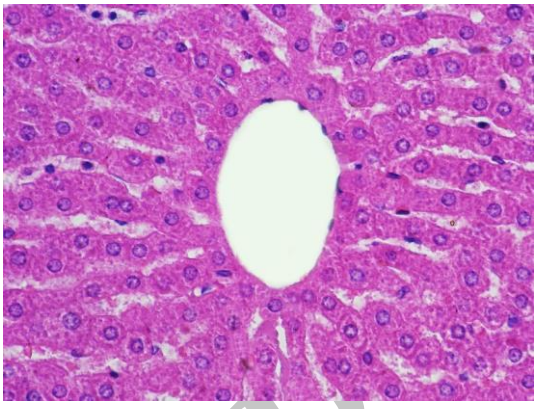
a,b: حروف غیرمشابه در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار است ($p<۰/۰٥$).

جدول ۳- تاثیر کروسین بر آسیب بافت کبد موش‌های صحرایی ناشی از ایسکمی-بازخونرسانی

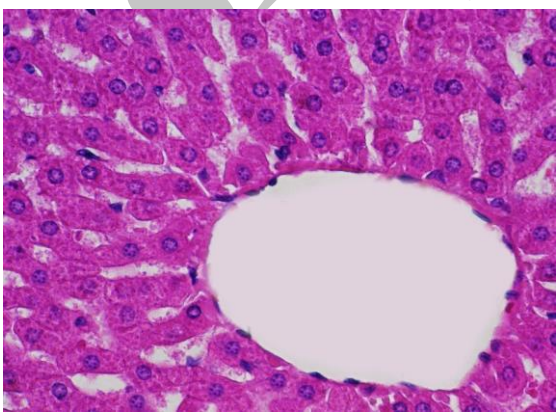
گروه‌ها	شاهد	کنترل جراحی	ایسکمی-بازخونرسانی	ایسکمی-بازخونرسانی به‌علاوه تیمار با کروسین
درجه‌بندی آسیب بافتی				
پر خونی و آماس در ناحیه پورتال				
درجه ۰	۱۰	۱۰	۰	٥
درجه ۱	۰	۰	۰	٤
درجه ۲	۰	۰	۰	۱
درجه ۳	۰	۰	۷	۰
درجه ٤	۰	۰	۳	۰
نکروز				
درجه ۰	۱۰	۱۰	۰	۸
درجه ۱	۰	۰	۰	۱
درجه ۲	۰	۰	۱	۱
درجه ۳	۰	۰	۷	۰
درجه ٤	۰	۰	۲	۰
ارتشاح بینابینی سلول‌های آماسی				
درجه ۰	۱۰	۹	۰	۷
درجه ۱	۰	۱	۰	۲
درجه ۲	۰	۰	۳	۱
درجه ۳	۰	۰	٦	۰
درجه ٤	۰	۰	۱	۰

صفر: عدم وجود آسیب، ۱: حداقل آسیب، ۲: آسیب ملایم، ۳: آسیب متوسط و ۴: آسیب شدید (۱۰ نمونه در هر گروه ارائه شده است).

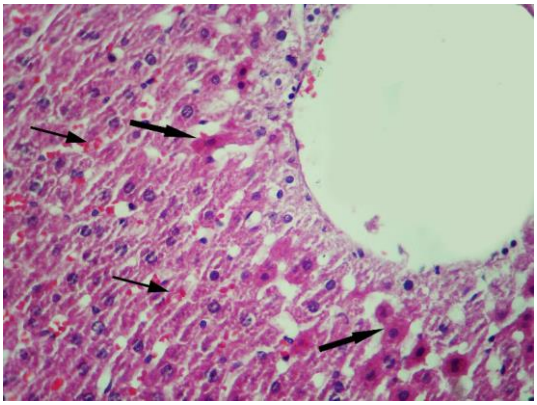
www.SID.ir



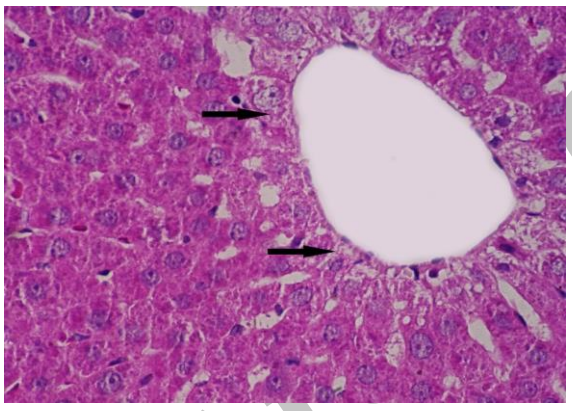
شکل ۱- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش‌های صحرایی از گروه شاهد که کاملاً سالم و طبیعی می‌باشد (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۴۰۰×).



شکل ۲- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش‌های صحرایی از گروه کنترل جراحی که سالم به‌نظر رسیده و تغییر پاتولوژیک خاصی ندارد (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۴۰۰×).



شکل ۳- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش‌های صحرایی از گروه ایسکمی-بازخونرسانی که در آن تغییرات دژنراتیو و نکروز هپاتوسیت‌ها در اطراف وریدچه مرکزی (پیکان‌های ضخیم) و خونریزی‌های پراکنده (پیکان‌های باریک) در قسمت‌های مختلف لوبول‌های کبدی مشاهده می‌شود (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۴۰۰×).



شکل ۴- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش‌های صحرایی از گروه ایسکمی-بازخونرسانی به‌علاوه تیمار با کروسین که دژنرسانس هیدروپیک خفیفی (پیکان‌ها) را در اطراف وریدچه مرکزی نشان می‌دهد (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۴۰۰×).

بحث و نتیجه‌گیری

تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به مقدار زیاد، در کبدی که دچار ایسکمی-بازخونرسانی شده، منجر به آسیب می‌شود که روندی اجتناب‌ناپذیر در تروما، عفونت، پیوند کبد و یا بستن ساقه کبدی در طی اعمال جراحی می‌باشد (El-Abhar *et al.*, 2003). در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که استفاده از زداینده‌های رایکال‌های آزاد در کاهش شدت آسیب بافت کبد ناشی از ایسکمی-بازخونرسانی مفید واقع می‌شود (Hassan-Khabbar *et al.*, 2008; Polat *et al.*, 2008).

www.SID.ir

در برخی از مطالعات برای کاهش آسیب ایسکمی-بازخونرسانی، عوامل آنتی‌اکسیدان فقط قبل از ایسکمی یا قبل از بازخونرسانی تجویز شده است و در برخی دیگر، هم قبل از ایسکمی و هم قبل از بازخونرسانی تجویز شده است (Sener *et al*., 2003). کروسین که به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی شناخته شده است، به‌صورت یک زداینده رادیکال آزاد عمل می‌کند (Hosseinzadeh *et al*., 2005). در مطالعه حاضر کروسین قبل از القاء ایسکمی تجویز شده است. در این مطالعه تیمار با کروسین به طور مشخصی فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینو ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز را که در ارتباط با آسیب پارانشیم کبد هستند، کاهش داد. افزایش فعالیت آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینو ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز در گروه ایسکمی-بازخونرسانی می‌تواند با پراکسیداسیون لیپیدی در اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده در مرحله بازخونرسانی که منجر به سیتولیز می‌شود، توجیه گردد (Chouker *et al*., 2005). کاهش فعالیت آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز در موش‌های صحرایی تیمار شده با کروسین در مقایسه با گروه ایسکمی-بازخونرسانی، اثرات محافظتی محتمل کروسین را در کبدی که در معرض آسیب ایسکمی-بازخونرسانی واقع شده، نشان می‌دهد. این اثر احتمالاً به دلیل محافظت غشاء سلول و ممانعت از نشت آنزیم‌های داخل آن حاصل می‌گردد (Thabrew *et al*., 1987). متعاقب پیش‌درمانی موش‌های گروه ایسکمی-بازخونرسانی با کروسین، فقط تغییرات خفیف دژنراتیو سلول‌های کبدی مشاهده گردید و اثری از نکروز دیده نشد که این خود اثرات حفاظتی کروسین را در این میان نشان می‌دهد. اثرات مفید فوق را می‌توان به خواص آنتی-اکسیدانی کروسین و کاهش استرس‌های اکسیداتیو مربوط دانست. به این معنا که، عصاره با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی منجر به تثبیت غشاءهای سلولی شده و مانع از نشت آنزیم‌ها می‌گردد. استرس اکسیداتیو مکانیسم‌هایی را که به تولید سیتوکائین‌های پیش‌التهابی و مولکول‌های الصاق سلولی منجر می-شوند، فعال می‌کند. بنابراین، استرس اکسیداتیو ممکن است به یک پاسخ آماسی ناشی از آندوتوکسمی، بعد از ایسکمی-بازخونرسانی کبد منجر شود. یافته‌های ما در توافق با مطالعات پیشین (Yildiz *et al*., 2008) تائید می‌کند که ایسکمی-بازخونرسانی کبد استرس اکسیداتیو را به عنوان تاثیری که نه فقط باعث آسیب مستقیم بافت می‌شود، بلکه تولید سیتوکائین‌های توکسیک را که منجر به آماس و ارتشاح لکوسیت‌ها می‌شود، افزایش می‌دهد.

در مطالعه ما افزایش میزان مالوندی‌آلدئید در کبد دچار ایسکمی-بازخونرسانی، نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد، یکی از مکانیسم‌های محتمل در پاتوژنز آسیب ایسکمی-بازخونرسانی می‌باشد. تحقیقات گدیک و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داده است که پراکسیداسیون لیپیدی متعاقب ایسکمی-بازخونرسانی در بافت کبد موش‌های صحرایی اتفاق می‌افتد که این یافته با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد (Gedik *et al*., 2008).

کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل در سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی

Archive of SID
www.SID.ir

آنزیمی، شاخصی حساس برای آسیب سلول‌های کبدی است. سوپراکسید دیسموتاز آنیون سوپراکسید را از طریق تبدیل آن به پراکسید هیدروژن پاک‌سازی کرده و بدین ترتیب اثرات توکسیک آن را کاهش می‌دهد (Curtis *et al.*, 1972). در بررسی حاضر، میزان سوپراکسید دیسموتاز در موش‌های صحرایی دچار ایسکمی-بازخونرسانی به دلیل تشکیل فراوان آنیون‌های سوپراکسید، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که متعاقب آن فعالیت آنزیم‌های زداینده پراکسید هیدروژن یعنی کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نیز در این موش‌های صحرایی به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. به نظر می‌رسد که غیرفعال شدن سوپراکسید دیسموتاز توسط آنیون‌های افزایش یافته سوپراکسید، منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌شود. کاتالاز با تجزیه پراکسید هیدروژن بافت‌ها را در مقابل رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل محافظت می‌کند. بنابراین، کاهش فعالیت کاتالاز ممکن است به برخی اثرات مخرب ناشی از رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن منجر گردد (Chance *et al.*, 1952). گلوتاتیون ردوکتاز به‌عنوان یک آنزیم سیتوزولی کبدی، در کاهش گلوتاتیون اکسید، به عنوان محصول نهایی فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز روی گلوتاتیون احیاء دخالت دارد (Naik and Panda, 2008).

در مطالعه ما، مصرف کروسین مانع از کاهش سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در اثر ایسکمی-بازخونرسانی شد که این پدیده ممکن است در اثر زدایش رادیکال‌ها توسط کروسین اتفاق افتاده باشد که باعث حفظ و بقاء این آنزیم‌ها شده است. همچنین، متعاقب ایسکمی-بازخونرسانی کاهش قابل توجهی در میزان گلوتاتیون پراکسیداز حاصل گردید که منجر به دسترسی گلوتاتیون ردوکتاز به سوبسترا شده و بدین ترتیب فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز کاهش یافت. به نظر می‌رسد که پیش‌درمانی کروسین در آسیب ایسکمی-بازخونرسانی فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز را مجدداً برقرار نموده که مصرف گلوتاتیون اکسید را جهت تشکیل گلوتاتیون احیاء و افزایش سم‌زدایی متابولیت‌های فعال توسط کونژوگاسیون با گلوتاتیون احیاء برقرار می‌کند. نتایج بررسی حاضر، گزارش سایر محققین را در خصوص اثرات آنتی‌اکسیدانی و زدایش رادیکال‌های آزاد توسط کروسین مورد تائید قرار می‌دهد (Hosseinzadeh *et al.*, 2009).

تحقیقاتی که توسط حسین‌زاده و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در مورد اثرات محافظتی کروسین در برابر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی کلیه انجام شده، نشان داده است که کروسین از طریق کاهش استرس‌های اکسیداتیو نقش حفاظتی خود را در برابر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی اعمال می‌دارد به طوری‌که، میزان پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش و فعالیت آنزیم‌های سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد (Hosseinzadeh *et al.*, 2005). مکانیسم عملکرد کروسین در مطالعه ایشان با نتایج بررسی حاضر همخوانی دارد. مطالعات انجام شده توسط حسین‌زاده و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان داده است که تیمار با کروسین از بروز آسیب در سلول‌های عضلانی واقع شده در معرض ایسکمی-بازخونرسانی نیز ممانعت می‌کند. طبق نظر ایشان اثر محافظتی

Archive of SID
www.SID.ir

کروسین به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی آن بوده است (Hosseinzadeh *et al*., 2009).

با توجه به مطالب مذکور، کروسین احتمالاً با خواص آنتی‌اکسیدانی خود، کبد موش‌های صحرایی را در برابر استرس اکسیداتیو ایسکمی-بازخونرسانی محافظت می‌کند. بنابراین، پس از انجام کارآزمایی‌های بالینی و کسب نتایج مثبت، کروسین می‌تواند به‌عنوان یک داروی موثر جهت پیش‌گیری از آسیب‌های اکسیداتیو ایسکمی-بازخونرسانی در موارد تروما، عفونت، پیوند کبد و یا بستن ساقه کبدی در طی اعمال جراحی کبد مورد استفاده قرار گیرد. لکن، چگونگی تاثیر دزهای مختلف کروسین، مکان و مکانیسم یا مکانیسم‌های مولکولی و سلولی مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن ناشناخته مانده و نیاز به مطالعات آتی و گسترده‌تری دارد.

سپاسگزاری

این مقاله از طرح تحقیقاتی که با بودجه پژوهشی و حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به انجام رسیده است، استخراج شده است. بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Ahmad, A.S., Ansari, M.A., Ahmad, M., Saleem, S., Yousuf, S., Hoda, M.N., *et al*. (2005). Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 81(4): 805-813.
- Barber, D.A. and Harris, S.R. (1994). Oxygen free radicals and antioxidants: a review. Journal of American Pharmacists Association, NS34: 26-35.
- Chance, B., Greenstein, D.S. and Roughton, R.J.W. (1952). The mechanism of catalase action. 1. Steady-state analysis. Archives of Biochemistry and Biophysics, 37(2): 301-321.
- Chen, Y., Zhang, H., Tiana, X., Zhao, C., Cai, L., Liu, Y., *et al*. (2008). Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of Gardenia jasminoides ELLIS and Crocus sativus L.: A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. Food Chemistry, 109(3):484-492.
- Chouker, A., Martignoni, A., Schauer, R.J., Dugas, M., Schachtner, T., Kaufmann, I., *et al*. (2005). Alpha-gluthathione S-transferase as an early marker of hepatic ischemia/reperfusion injury after liver resection. World Journal of Surgery, 29: 528-534.
- Claiborne, A. (1985). Catalase activity In: CRC Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton, F.L. editor. Florida: CRC Press, Boca Raton, 99: 283-284.
- Curtis, S.J., Mortiz, M. and Sondgrass, P.J. (1972). Serum enzymes derived from liver cell fractions. I. The response to carbon tetrachloride intoxication in rats. Gastroentrology, 62(1): 84-92.
- Das, D.K. and Maulik, N. (1994). Antioxidant effectiveness in ischemia–reperfusion tissue injury. Methods in Enzymology, 233: 601-610.
- El-Abhar, H.S., Abdallah, D.M. and Saleh S. (2003). Gastroprotective activity of Nigella sativa oil and its constituent, thymo-quinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. Journal of Ethnopharmacology, 84: 251-258.

Archive of SID
www.SID.ir

- Fraga, C.G., Leibovitz, B.E. and Tappel, A.L. (1988). Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. Free Radical Biology and Medicine, 4(3): 155-161.
- Frei, A., Zimmermann, A. and Weigand, K. (1984). The N-terminal propeptide of collagen type III in serum reflects activity and degree of fibrosis in patients with chronic liver disease. Hepatology, 4(5): 830-834.
- Gedik, E., Girgin, S., Ozturk, H., Obay, B.D., Ozturk, H. and Buyukbayram, H. (2008). Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. World Journal of Gastroenterology, 14(46): 7101-7106.
- Hassan-Khabbar, S., Cottart, C.H., Wendum, D., Vibert, F., Clot, J.P., Savouret, J.F., *et al*. (2008). Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: a possible strategy in liver surgery. Liver Transplantation, 14:451-459.
- He, X.S., Ma, Y., Wu, L.W., Wu, J.L., Hu, R.D., Chen, G.H., *et al*. (2005). Dynamical changing patterns of glycogen and enzyme histochemical activities in rat liver graft undergoing warm ischemia injury. World Journal of Gastroenterology, 11: 2662-2665.
- Hosseinzadeh, H., Modaghegh, M.H. and Saffari, Z. (2009). Crocus Sativus L. (Saffron) Extract and its Active Constituents (Crocin and Safranal) on Ischemia-Reperfusion in Rat Skeletal Muscle. Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine, 6(3): 343-350 .
- Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H.R., Ziaee, T. and Danaee, A. (2005). Protective effect of aqueous saffron extract (Crocus sativus L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences, 8(3): 387-393.
- Lee, G. and Luna, H.T. (1988). Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3rd ed., The Blakiston Division Mc Graw. Hill Book Company, pp: 32-107.
- Magesh, V., Singh, J.P., Selvendiran, K., Ekambaram, G. and Sakthisekaran, D. (2006). Antitumour activity of crocetin in accordance to tumor incidence, antioxidant status, drug metabolizing enzymes and histopathological studies. Molecular and Cellular Biochemistry, 287(1-2): 127-135.
- Martinek, R.G. (1972). A rapid ultraviolet spectrophotometric lactic dehydrogenase assay. Clinica Chimica Acta, 40(1): 91-99.
- Mohandas, J., Marshal, J.J., Duggin, G.G., Horvath, J.S. and Tiller, D.G. (1984). Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. Cancer Research, 44(11): 5086-5091.
- Montalvo-Jave, E.E., Escalante-Tattersfield, T., Ortega-Salgado, J.A., Pina, E. and Geller, D.A. (2008). Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. Journal of Surgical Research, 147: 153-159.
- Naik, S.R. and Panda, V.S. (2008). Hepatoprotective effect of Ginkgoselect Phytosome® in rifampicin induced liver injurym in rats: Evidence of antioxidant activity. Fitoterapia, 79(6): 439-445.
- Nishikimi, M., Appaji, N. and Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochemical and Biophysical Research Communications, 46(2): 849-854.
- Polat, K.Y., Aydinli, B., Polat, O., Aydin, U., Yazici, P., Ozturk, G., *et al*. (2008). The protective effect of aprotinin and alpha-tocopherol on ischemia-reperfusion injury of the rat liver. Transplantation Proceedings, 40: 63-68.
- Pulitano, C. and Aldrighetti, L. (2008). The protective role of steroids in ischemia-reperfusion injury of the liver. Current Pharmaceutical Design, 14: 496-503.

Archive of SID

www.SID.ir

- Reitman, S. and Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. American Journal of Clinical Pathology, 28: 56-63.
- Rotruck, I.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. and Hoekstra. W.G. (1973). Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science, 179: 588-590.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International, 32: 407-412.
- Sener, G., Tosun, O., Sehirli, A.O., Kacmaz, A., Arbak, S., Ersoy, Y., *et al*. (2003). Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. Life Science, 72: 2707-2718.
- Shen, S.Q., Zhang, Y., Xiang, J.J. and Xiong, C.L. (2007). Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. World Journal of Gastroenterology, 13: 1953-1961.
- Shin, T., Kuboki, S., Huber, N., Eismann, T., Galloway, E., Schuster, R., *et al*. (2008). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma during hepatic ischemia is age-dependent. Journal of Surgical Research, 147: 200-205.
- Thabrew, M.I., Joice, P.D. and Rajatissa, W. (1987). A comparative study of the efficacy of Pavetta indica and Osbeckia octanda in the treatment of liver dysfunction. Planta Medica, 53(3):239-41.
- Tseng, T.H., Chu, C.Y., Huang, J.M., Shiow, S.J. and Wang, C.J. (1995). Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes. Cancer Letters, 97(1): 61-67.
- van Gulik, T.M., de Graaf, W., Dinant, S., Busch, O.R. and Gouma, D.J. (2007). Vascular occlusion techniques during liver resection. Digestive Surgery, 2007, 24: 274-281.
- Xiang, M., Qian, Z.Y., Zhou, C.H., Liu, J. and Li, W.N. (2006). Crocetin inhibits leukocyte adherence to vascular endothelial cells induced by AGEs. Journal of Ethnopharmacololgy, 107(1): 25-31.
- Yildiz, F., Coban, S., Terzi, A., Ates, M., Aksoy, N., Cakir, H., *et al*. (2008).Nigella sativa relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver. World Journal of Gastroenterology, 14(33): 5204-5209.
- Yildiz, F., Coban, S., Terzi, A., Ates, M., Aksoy, N., Cakir, H., *et al*. (2008).Nigella sativa relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver. World Journal of Gastroenterology, 14(33): 5204-5209.
- Zheng, Y.Q., Liu, J.X., Wang, J.N. and Xu, L. (2007). Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. Brain Research, 1138: 86-94.

Archive of SID

www.SID.ir