مجله علوم زیست پزشکی پیشرفته | سال دهم | شماره ٤ | زمستان ۱۳۹۹

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 5th 2021

مقاله پژوهشی

اثر رزمارینیک اسید بر تعادل اکسیدان- آنتی‌اکسیدان در هپاتوتوکسیسیتی القاء شده توسط استامینوفن در موش صحرایی نر

ناهید آذرمهر[۱]، پریسا افشار[۱]، زینب خیزاب[۱]، زهرا مسلمی[۱]، امیر حسین دوستی مطلق[۲*]

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

۲- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۷/۰۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۷/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: دوز بالای استامینوفن سبب عوارض جانبی نامطلوبی مانند هپاتوتوکسیسیتی می‌شود. در مطالعه حاضر اثرات رزمارینیک اسید بر تعادل اکسیدان-آنتی‌اکسیدان در هپاتوتوکسیسیتی القاء شده توسط استامینوفن در موش صحرایی نر بررسی شد.

مواد و روش‌ها: درمجموع ۱۸ موش صحرایی نر نژاد ویستار به سه گروه تقسیم شدند: کنترل (C)، استامینوفن (2 g/kg) و استامینوفن+ رزمارینیک اسید (20 mg/kg). در روز هفتم، پس از خون‌گیری رت‌ها قربانی شدند و میزان پارامترهای بیوشیمیایی، مارکرهای استرس اکسیداتیو و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شد. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (V.17) استفاده شد.

نتایج: در گروه استامینوفن فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینو ترانسفراز و آلانین آمینو ترانسفراز به‌طور معنی‌دار و مقدار پروتئین کربونیل به‌طور غیر معنی‌دار نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد. همچنین فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و توتال تیول در گروه استامینوفن نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. تجویز رزمارینیک اسید فعالیت آنزیم‌های AST، ALT و مقدار پروتئین کربونیل را در مقایسه با گروه استامینوفن به‌طور معنی‌دار کاهش داد درحالی‌که فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز را به‌طور چشم‌گیری افزایش داد.

نتیجه‌گیری: رزمارینیک اسید با جلوگیری از اکسیداسیون پروتئین و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز استرس اکسیداتیو را در آسیب کبدی ناشی از استامینوفن کاهش می‌دهد. تأثیر محافظت کبدی رزمارینیک اسید ممکن است ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن و به دام انداختن رادیکال‌های آزاد توسط این ترکیب باشد.

کلمات کلیدی: استامینوفن، اکسیدان، آنتی‌اکسیدان، هپاتوتوکسیسیتی، رزمارینیک اسید

مقدمه

اختلالات کبدی از دلایل اصلی بیماری و مرگ‌ومیر در سراسر جهان هستند. آسیب کبدی ناشی از دارو یکی از شایع‌ترین عوامل ایجادکننده این اختلالات است (۱). استامینوفن (N-Acetyl-p-Aminophenol -APAP) یکی از معمول‌ترین داروهایی است که به‌عنوان ضد درد و ضد تب در مراقبت‌های درمانی مثل سردرد و میالژی مورداستفاده قرار می‌گیرد و علی‌رغم اثرات هپاتوتوکسیک، در دوزهای معمول یک داروی مفید و بی‌خطر است. مصرف APAP تا ۴ گرم در روز در افراد بالغ مشکلی ایجاد نمی‌کند؛ بااین‌وجود برخی مطالعات نشان داده‌اند که در افراد مستعد ازجمله بیماران الکلی حتی دوزهای درمانی APAP می‌تواند اثرات مضر داشته باشد (۲). اثر هپاتوتوکسیک این دارو ممکن است باعث نارسایی حاد کبدی و مرگ‌ومیر شود. ۹۰٪ از APAP توسط گلوکورونیداسیون و سولفاسیون به

*نویسنده مسئول: امیر حسین دوستی مطلق، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران
Email: amirhosseindoustimotlagh@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-9166-419X

www.SID.ir

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 5th 2021

متابولیت‌های غیر سمی و قابل دفع تبدیل‌شده و کمتر از ۱۰٪ APAP از طریق سیتوکروم P450 به NAPQI (N-acetyl-p-benzoquinone imine) متابولیزه می‌شود (۳). سپس NAPQI که یک مولکول واکنشگر هپاتوتوکسیک است در اثر واکنش با گلوتاتیون به مولکول‌های غیر واکنشگر متعدد سمیت زدایی می‌شود؛ بعد از یک دوز سمی APAP حدود ۹۰٪ گلوتاتیون تام کبدی تخلیه می‌شود و هپاتوتوکسیسیتی اتفاق می‌افتد. در هپاتوتوکسیسیتی ناشی از APAP، میزان فعالیت آنزیم‌های AST و ALT ۲۴ ساعت بعد از مصرف دارو افزایش می‌یابد (۴). همچنین در مصرف بیش‌ازحد APAP، NAPQI به‌واسطه‌ی افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species –ROS) تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد را به هم می‌زند و درنتیجه باعث استرس اکسیداتیو می‌شود (۳، ۵). عوامل پیشرفت بیماری‌های مزمن کبدی، استرس اکسیداتیو ایجادشده به‌وسیله رادیکال‌های آزاد و التهاب مزمن ناشی از آن در اثر آزاد شدن سیتوکاین‌های پیش التهابی از سلول‌های کوپفر کبد است (۶). سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی سلول‌های نرمال کبد آن‌ها را در برابر رادیکال‌های آزاد و واکنش‌دهنده‌ها حفظ می‌کند؛ سیستم دفاع آنزیمی شامل گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) است که به‌سرعت با ROSs مثل سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل واکنش داده و آن‌ها را حذف می‌کنند (۷). سلول می‌تواند استرس اکسیداتیو ملایم را تحمل کند، اما در حالت شدیدتر، ترکیبات اکسیدان (ROS) با اجزای سلولی مانند لیپید، پروتئین و DNA غشای سلولی واکنش داده و متعاقباً عوارض پاتولوژیکی ایجاد می‌کنند (۸). یکی از رایج‌ترین تغییرات اکسیداسیون پروتئین، تشکیل کربونیل پروتئین‌ها است (۹) که به‌عنوان مارکر مطالعه تغییرات ناشی از اکسیژن فعال در پروتئین‌ها استفاده می‌شوند (۱۰).

رزمارینیک اسید (a-o-caffeoy1-3,4 dihydroxyphenyllacticacid- Rosmarinic acid- RA) یک ترکیب معمول دی فنولیک گیاهی از خانواده براژیناسه و لامیاسه است (۱۱، ۱۲). RA به‌عنوان یک داروی گیاهی بالقوه محسوب شده و به خاطر خواص آنتی‌اکسیدانی قوی آن موردتوجه قرارگرفته است. گیاهانی که حاوی RA هستند به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی در جنوب اروپا، ژاپن و هند برای درمان بسیاری از بیماری‌ها ازجمله سردرد، درد معده، دیابت شیرین، رفع نیش حشرات و آکنه استفاده می‌شوند (۱۱). علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی (۱۳، ۱۴) خصوصیات ضدالتهابی، ضد توموری (۱۵)، ضد باکتریایی و ضدویروسی (۱۶) RA نیز نشان داده‌شده است. اثرات محافظت کبدی گیاهان حاوی رزمارینیک اسید مانند رزماری، بادرنجبویه و مریم‌گلی در مطالعات پیشین اثبات‌شده است (۱۷). مطالعات گذشته اثرات محافظت کبدی RA را در مقابل آسیب کبدی القاشده با الکل (۱۸)، تترا کلرید کربن (CCL_4) (۱۹) و t-BHP (tert-Butyl hydroperoxide) (۲۰) بررسی کرده‌اند؛ بنابراین با توجه به خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و محافظت کبدی رزمارینیک اسید و همچنین نقش اکسیدان‌ها در بروز هپاتوتوکسیسیتی القاشده توسط استامینوفن در مطالعه حاضر تصمیم گرفته شد که اثر محافظتی احتمالی ان بر تعادل اکسیدان- آنتی‌اکسیدان در این نوع از آسیب کبدی بررسی شود.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در مطالعه حاضر، از ۱۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵ ± ۲۲۵ گرم و سن ۸ هفته استفاده شد. موش‌ها در محفظه‌های مخصوصی در دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۵ تا ۶۰ درصد تحت چرخه تاریکی / روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند و از یک رژیم غذایی استاندارد و آب تغذیه کردند. این مطالعه طبق پروتکل آزمایشگاه حیوانات انجام‌شده و توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی یاسوج تأییدشده است.

طراحی مطالعه

حیوانات به‌صورت تصادفی به سه گروه شش‌تایی به‌صورت زیر تقسیم گردیدند:

گروه کنترل (C): دریافت آب مقطر به‌صورت خوراکی به مدت هفت روز

گروه استامینوفن (APAP): دریافت آب مقطر به‌صورت خوراکی به مدت هفت روز؛ دریافت APAP به‌صورت خوراکی با دوز ۲ g/kg BW در روز ششم (۲۱)،

گروه Rosmarinic acid +APAP: دریافت رزمارینیک اسید به‌صورت خوراکی با دوز 20 mg/kg BW به مدت هفت روز (۲۲)، دریافت APAP به‌صورت خوراکی با دوز ۲ g/kg BW در روز ششم.

www.SID.ir

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 5th 2021

در پایان مطالعه، از موش‌های صحرایی خون‌گیری شد، پس از کشته شدن رت‌ها قسمتی از بافت کبدی با دستگاه هموژنایزر در بافر پتاسیم فسفات (pH= ۷/۴ و ۱۰mM) هموژنه و در ۲۰- درجه ذخیره شد. نمونه خون در لوله‌های حاوی هپارین جمع-آوری، پلاسما تهیه و فعالیت آنزیم‌های کبدی (ALT و AST) در آن اندازه‌گیری شد. مارکرهای استرس اکسیداتیو مانند میزان توتال تیول (tSH)، پروتئین کربونیل (PC) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما و بافت هموژنه کبد نیز سنجش شد. علاوه بر این، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GPx، SOD و CAT در بافت هموژنه کبد تعیین شد.

آنالیزهای بیوشیمیایی

میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی (شامل ALT و AST) با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و به روش کالریمتری اندازه-گیری شد.

مارکرهای استرس اکسیداتیو

تعیین مقدار پروتئین کربونیل (PC)

نمونه‌های بافت هموژنه و پلاسما به مدت ۶۰ دقیقه در شرایط تاریکی و در دمای اتاق با معرف ۲، ۴-دی‌نیتروفنیل هیدرازین (۱۰ میلی مول در لیتر) در ۲ HCl مولار انکوبه شدند. سپس تری‌کلرو استیک اسید ۵۰٪ به نمونه‌ها اضافه و بعد از سانتریفوژ رسوب حاصل با محلول اتانول/ اتیل استات (نسبت ۱:۱) شستشو داده شد. به رسوب حاصل از سانتریفوژ محلول گوانیدین هیدروکلراید (۶ مولار) اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و درنهایت جذب محلول رویی در طول‌موج ۳۷۰ نانومتر قرائت شد و میزان پروتئین کربونیل با استفاده از ضریب جذب مولی 2.2×10^4 $M^{-1}cm^{-1}$ محاسبه شد (۲۳).

تعیین مقدار توتال تیول (TSH)

مقدار TSH بر اساس واکنش DTNB با گروه‌های تیول و تشکیل ترکیبات TNB (۲-نیترو-۵-تیوبنزوئیک اسید) و دی-سولفید تعیین شد. به‌طور خلاصه، ۲۵ میکرولیتر نمونه، ۱۰ میکرولیتر DTNB، ۱۵۰ میکرولیتر Tris-EDTA و ۷۹۰ میکرولیتر متانول مطلق به یک میکروتیوب اضافه شد. سپس میکروتیوب به‌آرامی مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. جذب محلول رویی در طول‌موج ۴۱۲ نانومتر قرائت شد و مقدار tSH با استفاده ضریب جذب مولی $13600\ M^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه گردید (۲۴).

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام به روش FRAP (Ferric Reducing antioxidant power)

در این روش توانایی آنتی‌اکسیدانی تام در احیای یون‌های فریک (Fe^{3+}) اندازه‌گیری می‌شود. با احیای یون‌های فریک (Fe^{3+}) و تبدیل آن به یون‌های فرو (Fe^{2+}) در pH اسیدی و در حضور TPTZ (Tripyridyl-s-triazine)، کمپلکس Fe-TPTZ تشکیل می‌شود که رنگ آن آبی است. شدت رنگ حاصله در طول‌موج ۵۹۳ نانومتر و به‌صورت اسپکتروفتومتریک قابل‌اندازه‌گیری است. این واکنش غیراختصاصی است و هر مولکولی که تحت شرایط فوق قابلیت احیای یون فریک را داشته باشد می‌تواند در آن شرکت نماید (۲۵).

تعیین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GPx، SOD و CAT در بافت هموژنه کبد با استفاده از کیت الایزای (ZellBio GmbH, Ulm, Germany) و بر اساس دستورالعمل کیت اندازه‌گیری شد.

روش تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

برای مطالعات آماری از نرم‌افزار SPSS (V.17) استفاده شد و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آماری واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با Post hoc تصحیح Tukey و LSD انجام گرفت. لازم به ذکر است که (P< ۰/۰۵) معنی‌دار در نظر گرفته شد و نتایج به‌صورت Mean±S.E.M نشان داده شد.

نتایج

پارامترهای بیوشیمیایی

آسیب کبدی با تعیین سطح پلاسمایی آنزیم‌های کبد مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده‌شده است، سطوح پلاسمایی AST و ALT در گروه APAP نسبت به گروه C به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (P< ۰/۰۵). درحالی‌که تجویز RA این مارکرها را به‌طور معنی‌داری کاهش داد (P<۰/۰۵) (جدول ۱).

مارکرهای استرس اکسیداتیو

یافته‌های ما نشان داد که میزان پروتئین کربونیل پلاسما و بافت کبد در گروه APAP نسبت به گروه کنترل افزایش ناچیزی نشان داد درحالی‌که میزان توتال تیول بافت کبد نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار پیدا کرد (P<۰/۰۵). میزان پروتئین کربونیل (به‌عنوان شاخص اکسیداسیون پروتئین) در بافت هموژنه کبد گروه APAP دریافت‌کننده RA نسبت به گروه

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 5th 2021

APAP به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد (P<۰/۰۵). درمان رت‌های APAP با RA میزان tSH را در بافت هموژنه کبد کاهش داد. سطح پلاسمایی FRAP در گروه APAP افزایش و در بافت کبد گروه RA + استامینوفن کاهش نشان داد (P<۰/۰۵) (جدول ۲).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده‌شده است، فعالیت آنزیم GPx در گروه استامینوفن نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵)، بااین‌وجود فعالیت این آنزیم در گروه دریافت‌کننده RA نسبت به گروه استامینوفن افزایش

جدول ۱- تأثیر رزمارینیک اسید بر روی سطح پلاسمایی آنزیم‌های کبد در موش‌های صحرایی القاشده با APAP

گروه	ALT (U/L)	AST (U/L)
کنترل	۲۸/۴۰±۳/۴۸	۱۰۵/۱۳±۱۱/۳۶
استامینوفن	۷۳/۶۸±۷/۸۸[a]	۲۲۶/۸۲±۱۱/۳۳[a]
استامینوفن + RA	۳۸/۶۴±۱۰/۲۰[b]	۱۴۳/۰۳±۲۷/۰۵[b]

ALT: آلانین آمینو ترانسفراز؛ AST: آسپارتات آمینو ترانسفراز. هر مقدار نشان‌دهنده Mean± SEM است. [a] تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل (۰/۰۵ >P). [b] تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه استامینوفن (۰/۰۵ >P).

جدول ۲- تأثیر رزمارینیک اسید بر روی سطح مارکرهای استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی القاشده با APAP

گروه	FRAP (µmol/L)	PC (µmol/L)	FRAP (µmol/g tissue)	PC (µmol/g tissue)	tSH (µmol/g tissue)
کنترل	۹۹۸/۰۰±۵۷/۴۵	۱/۳۸±۰/۰۷	۱۳۷۹/۰۰±۱۴۵/۴۴	۳/۰۵±۰/۰۶	۳/۲۲±۰/۱۱
استامینوفن	۲۲۶۶/۰۸±۱۴۹/۴۴[a]	۱/۷۲±۰/۲۲	۱۶۶۷/۴۱±۶۲/۹۷	۳/۱۵±۰/۰۳	۲/۲۷±۰/۲۷[a]
استامینوفن+ RA	۱۸۹۲/۷۵±۱۷۷/۰۶	۱/۳۵±۰/۱۵	۱۰۱۷/۷۵±۹۳/۶۳[b]	۲/۸۷±۰/۰۵[b]	۱/۳۶±۰/۱۹[b]

FRAP: توانایی آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما؛ PC: پروتئین کربونیل؛ tSH: توتال تیول. هر مقدار نشان‌دهنده Mean± SEM است. [a] تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل (۰/۰۵ >P). [b] تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه استامینوفن (۰/۰۵ >P).

جدول ۳- تأثیر رزمارینیک اسید بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GPx، SOD و CAT در موش‌های صحرایی القاشده با APAP

گروه	SOD (U/ml)	GPx (U/ml)	CAT (U/ml)
کنترل	۲۹/۶۳±۱/۴۴	۳۸۲/۴۹±۴۴/۶۳	۲۶/۸۸±۱/۰۸
استامینوفن	۳۷/۲۷±۳/۲۷	۱۶۰/۱۱±۳۱/۸۵[a]	۲۶/۴۵±۰/۸۱
استامینوفن + RA	۲۷/۷۸±۵/۷۲	۳۸۶/۵۳±۴۸/۵۵[b]	۳۰/۵۷±۰/۲۲[b]

SOD: سوپر اکسید دسموتاز؛ GPx:گلوتاتیون پراکسیداز؛ CAT: کاتالاز. هر مقدار نشان‌دهنده Mean± SEM است. [a] تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل (۰/۰۵ >P). [b] تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه استامینوفن (۰/۰۵ >P)

www.SID.ir

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 5th 2021

معنی‌دار داشت. همچنین تجویز RA فعالیت آنزیم کاتالاز را نیز افزایش داد ($P\leq0.05$). فعالیت آنزیم SOD در گروه RA + استامینوفن نسبت به گروه‌های دیگر تغییر معنی‌داری نشان نداد (جدول ۳).

بحث

در مطالعه حاضر مدل هپاتوتوکسیسیتی القاشده با APAP ایجاد شد تا اثر محافظت کبدی و آنتی‌اکسیداتیو رزمارینیک اسید بر روی این آسیب کبدی بررسی شود. هپاتوتوکسیسیتی القاشده با APAP یک مدل قابل‌اعتماد برای بررسی عوامل محافظت‌کننده کبدی است که در مطالعات متعدد، از دوزهای مختلف آن به‌صورت داخل صفاقی و خوراکی برای القا هپاتوتوکسیسیتی استفاده‌شده است (۴، ۲۶ و ۲۷). ALT و AST آنزیم‌های ترانس آمیناز هستند که نقش اساسی در تبدیل اسیدهای آمینه به کتو اسیدها دارند. AST عمدتاً در میتوکندری سلول‌های کبدی و ALT بیشتر در سیتوپلاسم سلول‌های کبدی وجود دارد، افزایش میزان آنزیم ALT معمولاً با افزایش سطح AST همراه است (۲۸)؛ ولی بااین‌وجود ALT برای بافت کبد اختصاصی‌تر است و بنابراین مارکر بهتری برای بررسی آسیب کبدی است (۱). همان‌طور که مشاهده شد میزان ALT و AST در رت‌های گروه APAP نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد که علت این افزایش آسیب سلول‌های کبدی توسط APAP، کاهش تمامیت غشای سلول‌ها، نشت سلولی و درنتیجه آزاد شدن این آنزیم‌ها به جریان خون است (۲۸). مشابه بامطالعه ما در مطالعاتی که توسط Aycan و El-Sayed در سال ۲۰۱۴ و ۲۰۱۵ انجام شد افزایش معنی‌دار ALT و AST در موش‌های دچار آسیب کبدی با APAP مشاهده شد (۴، ۲۹). مطابق با مطالعات Ahmed (۱۸) و Hasanein (۳۰) که تأثیر RA را بر آسیب کبدی ناشی از الکل بررسی کردند، تجویز RA در این مطالعه مقدار آنزیم‌های ALT و AST را به‌طور چشمگیری کاهش داد که نشان‌دهنده بازسازی بافت کبد و ترمیم سلول‌های کبدی در گروه‌های درمان شده با رزمارینیک اسید است. همچنین در مطالعه پیشین که تأثیر RA بر آسیب کلستاتیک کبد بررسی شد مشاهده گردید که این ترکیب باعث کاهش مارکرهای ALT و AST می‌شود (۲۲).

NAPQI متابولیت فعال حاصل از APAP است که به‌طور کووالانسی به ماکرومولکول‌های لیپید، پروتئین و DNA متصل می‌شود، علاوه بر این NAPQI قادر است با گلوتاتیون موجود در بافت کبد واکنش داده و سبب تخلیه این ترکیب آنتی‌اکسیدانی شود (۲۷). اگرچه محصولات استرس اکسیداتیو با لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA واکنش می‌دهند، پروتئین‌ها به دلیل اینکه اغلب به‌عنوان آنزیم در سلول‌ها فعالیت می‌کنند، آسیب‌پذیرتر هستند. در میان تغییرات اکسیداتیو متفاوتی که روی پروتئین‌ها اتفاق می‌افتد احتمالاً پروتئین کربونیل اولین شاخصی است که از واکنش رادیکال‌های آزاد با پروتئین تشکیل می‌شود (۳۱، ۳۲). میزان PC در خون و بافت یک مارکر قابل‌اعتماد از اکسیداسیون پروتئین است (۳۳). در توافق با مطالعات پیشین ما (۳۴، ۳۵) که بر روی آسیب کبدی ناشی از APAP انجام شد، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان PC در گروه APAP با دوز خوراکی ۲ g/kg نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد، بااین‌وجود این افزایش معنی‌دار نبود که این تفاوت ممکن است ناشی از دوز کمتر APAP استفاده‌شده در این مطالعه باشد. Cristani و همکاران نشان دادند که تجویز دوز ۳ g/kg از APAP میزان PC را در بافت هموژنه کبد افزایش می‌دهد (۳۶). مطابق بامطالعه Ahmed در آسیب کبدی ناشی از الکل (۱۸)، در این مطالعه، RA میزان PC بافت هموژنه کبد را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه APAP کاهش داد. RA در گیاهان متنوعی از خانواده لامیاسه مثل رزماری وجود دارد (۳۷). ازآنجایی‌که خصوصیات آنتی‌اکسیدانی این گیاهان به‌واسطه‌ی وجود ترکیبات فنولی و دی‌ترپن‌ها از طریق به دام انداختن رادیکال‌های آزاد اثبات‌شده است (۴۰-۳۸)، بنابراین RA ممکن است به دلیل داشتن این فعالیت در جلوگیری از اکسیداسیون پروتئین‌ها نقش داشته باشد.

همه گروه‌های تیول موجود در پلاسما مربوط به پروتئین‌ها هستند، این گروه‌ها شاخص‌های حساس استرس اکسیداتیو هستند که نقش حیاتی در سیستم دفاعی در برابر ROS ایفا می‌کنند (۴۱). توتال تیول (tSH) شامل گروه‌های تیول پروتئین (P-SH) و گلوتاتیون (GSH) است؛ به خاطر ناچیز بودن میزان GSH، اختلاف کمی بین مقدار tSH و P-SH وجود دارد (۴۲). نتایج مطالعه ما در تطابق بامطالعه Cristani و همکاران در سال ۲۰۱۶، نشان داد میزان tSH بافت کبدی در رت‌های القاشده با APAP در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (۳۶). همچنین مطالعه Fakurazi و همکاران نشان داد که میزان GSH در بافت کبد رت‌های القاشده با APAP نسبت به گروه

www.SID.ir

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 5th 2021

کنترل به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌یابد (۴۳). GSH یک تعدیل‌کننده فرایندهای دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن است. این ترکیب رادیکال آزاد را به دام انداخته و مانع از دست رفتن گروه-های سولفیدریل پروتئین‌ها می‌شود. GSH یک منبع مهم برای کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از ROS است (۴۴). کاهش گروه‌های تیول به دنبال مصرف APAP در مطالعه حاضر احتمالاً به خاطر تولید متابولیت فعال NAQPI است که این ترکیب در کبد از APAP تولیدشده و سبب تخلیه گروه‌های تیول‌دار مانند GSH می‌شود. میزان tSH بافت هموژنه کبد در گروه دریافت‌کننده RA نسبت به گروه APAP کاهش نشان داد.

خط دفاعی اصلی ارگانیسم‌ها در مقابل ROS شامل آنزیم‌های جاروب کننده مثل SOD، CAT و GPx و همچنین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مثل اسکوربیک اسید، GSH، Vit A و فلاونوئیدها است. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در حذف رادیکال سوپر اکسید و هیدروژن پراکسید دارند (۴۵). در مطالعاتی که توسط Reshi و همکاران در سال ۲۰۱۷ (۴۶) و Aydogan و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۴۷) صورت گرفت نشان داد شد که تجویز APAP فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، GPx و CAT را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. در مطالعه حاضر فعالیت GPx در گروه APAP به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرد، درحالی‌که فعالیت SOD افزایش ناچیزی نشان داد. رادیکال‌های آزاد اصلی شامل آنیون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و H_2O_2 هستند (۴۸). SOD آنزیم اصلی سیستم آنتی‌اکسیدانی در احیا رادیکال‌های سوپراکسید (۴) و GPx آنزیم اصلی در احیا رادیکال هیدروکسیل است (۴۹). کاهش فعالیت GPx بعد از تجویز APAP ممکن است به خاطر افزایش تولید رادیکال هیدروکسیل باشد. گفته‌شده که NAPQI حاصل از APAP تولید آنیون سوپر اکسید، هیدروژن پراکسید و رادیکال هیدروکسیل را افزایش می‌دهد (۵۰). نتایج ما نشان داد که تجویز RA، فعالیت GPx و CAT را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد که این یافته با نتایج مطالعه Yang و همکاران که تأثیر RA را بر آسیب کبدی ناشی از t-BHP بررسی کردند (۲۰) مطابقت داشت. اگرچه مکانیسم دقیق تأثیر رزمارینیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نامشخص است ولی ممکن است این ترکیب از طریق کاهش تشکیل رادیکال هیدروکسیل و افزایش میزان بیان ژن GPx و CAT فعالیت این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تجدید کند.

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، این مطالعه نشان می‌دهد که رزمارینیک اسید از طریق کاهش مقدار شاخص‌های عملکردی کبد (AST و ALT) هپاتوتوکسیسیتی القاشده با APAP را بهبود می‌بخشد. همچنین، رزمارینیک اسید با جلوگیری از اکسیداسیون پروتئین (کاهش PC) و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی CAT و GPx استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد. تأثیر محافظت کبدی رزمارینیک اسید ممکن است ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن و به دام انداختن رادیکال‌های آزاد توسط این ترکیب باشد. نتایج ما پیشنهاد می‌کند که رزمارینیک اسید ممکن است یک عامل جایگزین مؤثر برای بهبود هپاتوتوکسیسیتی القاشده با APAP باشد.

تشکر و قدردانی

این کار با کد اخلاق IR.YUMS.REC.1397.114 در دانشگاه علوم پزشکی یاسوج انجام شد. بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج جهت حمایت مالی از این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Parmar SR, Vashrambhai PH, Kalia K. Hepatoprotective activity of some plants extract against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. J Herbal Med Toxicol. 2010;4(2):101-6.
2. Larson AM. Acetaminophen hepatotoxicity. Clinics in liver disease. 2007;11 (3): 525-548.
3. Tezcan AH, Ozturk O, Ustebay S, Adali Y, Yagmurdur H. The beneficial effects of ozone therapy in acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. Pharmacological Reports. 2018;70(2):340-5.

www.SID.ir

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 5th 2021

4. Aycan İÖ, Tüfek A, Tokgöz O, Evliyaoğlu O, Fırat U ,Kavak GÖ, et al. Thymoquinone treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. International Journal of Surgery. 2014;12(3):213-8.
5. Jaeschke H. Acetaminophen: dose-dependent drug hepatotoxicity and acute liver failure in patients. Digestive diseases. 2015;33(4):464-71.
6. López-Reyes AG, Arroyo-Curras N, Cano BG, Lara-Díaz VJ, Guajardo-Salinas GE, Islas JF, et al. Black bean extract ameliorates liver fibrosis in rats with CCl. Annals of hepatology. 2008;7(2):130-5.
7. Lee JY, Lee SH, Kim HJ, Ha J-M, Lee S-H, Lee J-H, et al. The preventive inhibition of chondroitin sulfate against the CCI 4-lnduced oxidative stress of subcellular level. Archives of pharmacal research. 2004;27(3):340-5.
8. Geetha A, Priya ML, Jeyachristy SA, Surendran R .Level of oxidative stress in the red blood cells of patients with liver cirrhosis. Indian Journal of Medical Research. 2007;126(3):204.
9. Bayr H. Reactive oxygen species. Critical care medicine. 2005;33(12):S498-S501.
10. Iwai I, Shimadzu K, Kobayashi Y ,Hirao T, Etou T. Increased carbonyl protein level in the stratum corneum of inflammatory skin disorders: A non-invasive approach. The Journal of dermatology. 2010;37(8):693-8.
11. McCue PP, Shetty K. Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 2004;13(1): 10-106
12. Pérez-Tortosa V, López-Orenes A, Martínez-Pérez A, Ferrer MA, Calderón AA. Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated Thymus membranaceus shoots. Food Chemistry. 2012;130(2):362-9.
13. Lucarini R, Bernardes WA, Tozatti MG, da Silva Filho AA, Andrade ML, Momo C, et al. Hepatoprotective effect of Rosmarinus officinalis and rosmarinic acid on acetaminophen-induced liver damage. Emirates Journal of Food and Agriculture. 2014:878-84.
14. Lin S-Y, Wang Y-Y, Chen W-Y, Liao S-L, Chou S-T, Yang C-P, et al. Hepatoprotective activities of rosmarinic acid against extrahepatic cholestasis in rats. Food and chemical toxicology. 2017;108:214-23.
15. Li G-S, Jiang W-L, Tian J-W, Qu G-W, Zhu H-B, Fu F-H. In vitro and in vivo antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis. Phytomedicine. 2010;17(3-4):282-8.
16. Jayanthy G, Subramanian S. Rosmarinic acid, a polyphenol, ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet–STZ induced experimental diabetes mellitus. Biomedicine & Preventive Nutrition. 2014;4(3):431-7.
17. Amoah SK, Sandjo LP, Kratz JM, Biavatti MW. Rosmarinic acid–pharmaceutical and clinical aspects. Planta medica. 2016;82(05):388-406.
18. Ahmed MM. Rosmarinic acid attenuates the hepatotoxicity induced by ethanol in rats. American Journal of Biochemistry. 2016;6(3):82-90.
19. Domitrović R, Škoda M, Marchesi VV, Cvijanović O, Pugel EP, Štefan MB. Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. Food and chemical toxicology. 2013;51:370-8.
20. Yang S-Y, Hong C-O, Lee GP, Kim C-T, Lee K-W. The hepatoprotection of caffeic acid and rosmarinic acid, major compounds of Perilla frutescens, against t-BHP-induced oxidative liver damage. Food and chemical toxicology. 2013;55:92-9.
21. Hanafy A, Aldawsari HM, Badr JM, Ibrahim AK, Abdel-Hady SE-S. Evaluation of hepatoprotective activity of Adansonia digitata extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2016; 1-7.
22. Azarmehr N, Bardestani F, Jafari M, Dousti Motlagh A. Hepatoprotective and Antioxidative Effect of Rosmarinic Acid Against Bile Duct Ligated (BDL)-Induced Cholestatic in Male Rats. Armaghane danesh. 2019;24(6):1039-53. [in persian].
23. Kholari FS, Dehpour AR, Nourbakhsh M, Doustimotlagh AH, Bagherieh M, Golestani A. Erythrocytes Membrane Alterations Reflecting Liver Damage in CCl_4-Induced Cirrhotic Rats: The Ameliorative Effect of Naltrexone. Acta Medica Iranica. 2016;54(10):631-9.
24. Doustimotlagh AH, Dehpour AR, Nourbakhsh M, Golestani A. Alteration in Membrane Protein, Antioxidant Status and Hexokinase Activity in Erythrocytes of CCl^ sub 4^-Induced Cirrhotic Rats. Acta Medica Iranica. 2014;52(11):795.

www.SID.ir

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 5th 2021

25. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry. 1996; 1 (239): 70-76.
26. Henning C, Smuda M, Girndt M, Ulrich C, Glomb MA. Molecular basis of maillard amide-AGE formation in vivo. Journal of Biological Chemistry. 2011:jbc. M111. 282442.
27. Drochioiu G, Ciobanu CI, Bancila S, Ion L, Petre BA, Andries C, et al .Ultrasound-based protein determination in maize seeds. Ultrasonics sonochemistry. 2016;29:93-103.
28. VIDELA LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quinones L, et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. Clinical science. 2004;106(3):261-8.
29. El-Sayed ESM, Mansour AM, Nady ME. Protective effects of pterostilbene against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Journal of biochemical and molecular toxicology. 2015;29(1):35-42.
30. Hasanein P, Seifi R. Beneficial effects of rosmarinic acid against alcohol-induced hepatotoxicity in rats. Canadian journal of physiology and pharmacology. 2018;96(1):32-7.
31. Alou-El-Makarem MM, Moustafa MM, Fahmy MA-A, Abdel-Hamed AM, El-fayomy KN, Darwish MMA-S. Evaluation of carbonylated proteins in hepatitis c virus patients. Modern Chemistry & Applications. 2014; 2 (2): 1-5.
32. Sadeghi H, Azarmehr N, Razmkhah F, Sadeghi H, Danaei N, Omidifar N, et al. The hydroalcoholic extract of watercress attenuates protein oxidation, oxidative stress, and liver damage after bile duct ligation in rats. Journal of cellular biochemistry. 2019;120(9):14875-84.
33. Fernando N, Wickremesinghe S, Niloofa R, Rodrigo C, Karunanayake L, de Silva HJ, et al. Protein carbonyl as a biomarker of oxidative stress in severe leptospirosis, and its usefulness in differentiating leptospirosis from dengue infections. PLoS One. 2016;11(6):e0156085.
34. Mansourian M, Mirzaei A, Azarmehr N, Vakilpour H, Kokhdan EP, Doustimotlagh AH. Hepatoprotective and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of Stachys pilifera. Benth on acetaminophen-induced liver toxicity in male rats. Heliyon. 2019;5(12):e03029.
35. Azarmehr N, Afshar P, Moradi M, Sadeghi H, Sadeghi H, Alipoor B, et al. Hepatoprotective and antioxidant activity of watercress extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Heliyon. 2019;5(7):e02072.
36. Cristani M, Speciale A, Mancari F, Arcoraci T, Ferrari D, Fratantonio D, et al. Protective activity of an anthocyanin-rich extract from bilberries and blackcurrants on acute acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. Natural product research. 2016;30(24):2845-9.
37. Shetty K. Rosmarinic acid biosynthesis and mechanism of action. Functional Foods and Biotechnology: CRC Press; 2006. p. 207-28.
38. Del Bano MJ, Lorente J, Castillo J, Benavente-García O, Del Rio JA, Ortuño A, et al. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of Rosmarinus officinalis. Antioxidant activity. Journal of agricultural and food chemistry. 2003;51(15):4247-53.
39. Selmi S, Rtibi K, Grami D, Sebai H, Marzouki L. Rosemary (Rosmarinus officinalis) essential oil components exhibit anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant effects in experimental diabetes. Pathophysiology. 2017;24(4):297-303.
40. Hamzawy MA, El-Denshary E, Hassan NS, Manaa F, Abdel-Wahhab MA. Antioxidant and hepatorenoprotective effects of Thyme vulgaris extract in rats during aflatoxicosis. Glob J Pharmacol. 2012;6:106-17.
41. Terzioglu D, Uslu L, Simsek G, Atukeren P, Erman H, Gelisgen R, et al. The effects of hyperbaric oxygen treatment on total antioxidant capacity and prolidase activity after bile duct ligation in rats. Journal of Investigative Surgery. 2017;30(6):376-82.
42. Hu M-L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. Methods in enzymology. 1994;233:380-5.
43. Fakurazi S, Hairuszah I, Nanthini U. Moringa oleifera Lam prevents acetaminophen induced liver injury through restoration of glutathione level. Food and Chemical Toxicology. 2008; 46 (8): 2611-2615.
44. El-Newary SA, Shaffie NM, Omer E. The protection of Thymus vulgaris leaves alcoholic extract against hepatotoxicity of alcohol in rats. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2017;10(4):361-71.

www.SID.ir

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 5th 2021

45. Mansour MA, Nagi MN, El-Khatib AS, Al-Bekairi AM. Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. Cell biochemistry and function. 2002;20(2):143-51.
46. Reshi MS, Yadav D, Uthra C, Shrivastava S, Shukla S. Acetaminophen-induced renal toxicity: preventive effect of silver nanoparticles. Toxicology Research. 2020;9(4):406-12.
47. Aydoğan MS, Polat A, Vardı N, Erdoğan MA, Yücel A, Yıldız A, et al. Protective effects of melatonin and and 914 D Glucan against acetaminophen toxicity in rats. 2016; 5 (2): 539-543.
48. Fukuhara R, Kageyama T. Structure, gene expression, and evolution of primate glutathione peroxidases. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2005;141(4):428-36.
49. Vieira EK, Bona S, Di Naso FC, Porawski M, Tieppo J, Marroni NP. Quercetin treatment ameliorates systemic oxidative stress in cirrhotic rats. ISRN gastroenterology. 2011; 1-6.
50. Fouad AA, Yacoubi MT, El-Bidawy MH. Therapeutic potential of hemin in acetaminophen nephrotoxicity in rats. Environmental toxicology and pharmacology. 2009;27(2):277-82.

www.SID.ir

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 8:46 +0330 on Sunday December 5th 2021

Original Article

The Effect of Rosmarinic Acid on Oxidant-Antioxidant Balance in Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Male Rats

Azarmehr N[1], Afshar P [1], Khizab Z[1], Moslemi Z [1], Doustimotlagh AH[2*]

1. Student Research Committee, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
2. Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 09 Sep 2020 Accepted: 13 Oct 2020

Abstract

Background & Objective: High dose of acetaminophen (APAP) causes detrimental side effects such as hepatotoxicity. In the present study, the effects of Rosmarinic acid on oxidant-antioxidant balance in APAP-induced hepatotoxicity in male rats were investigated.

Materials & Methods: A total of 18 male Wistar rats were divided into three groups: control (C), APAP (2 g / kg) and APAP + Rosmarinic acid (20 mg/kg). On the seventh day, after blood sampling, the rats were sacrificed and the number of biochemical parameters, oxidative stress markers and activity of antioxidant enzymes was measured. Statistical analysis was performed by SPSS software (V.17).

Results: It was observed that the activity of alanine transaminase and aspartate transaminase enzymes significantly increased and the amount of protein carbonyl slightly increased in the APAP group compared to the control group. Glutathione peroxidase activity and total thiol levels were significantly reduced in the APAP group compared to the control group. Rosmarinic acid administration markedly reduced the activity of AST, ALT enzymes and amount of protein carbonyl compared to the APAP group while it significantly increased the activity of glutathione peroxidase and catalase enzymes.

Conclusions: Rosmarinic acid reduces oxidative stress by preventing protein oxidation and increasing the activity of the antioxidant enzymes including glutathione peroxidase and catalase. The effect of hepatic protection of Rosmarinic acid may be due to its antioxidant properties and the trapping of free radicals by this compound.

Keywords: Acetaminophen, Oxidant, Antioxidant, Hepatotoxicity, Rosmarinic acid

***Corresponding Author: Doustimotlagh Amir Hossein,** Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
Email: amirhosseindoustimotlagh@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-9166-419X

Journal of Advanced Biomedical Sciences; 10 (2020): 2796-2805

www.SID.ir