مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره پنجم ـ شماره سوم ـ پاییز ۹۰
صفحات ۵ الی ۱۳
Archive of SID

مقاله پژوهشی
(Original Article)

اثر حفاظتی عصاره هیدروالکلی به دست آمده از زیره سیاه در آسیب بافت قلب و کلیه در مدل التهابی CLP

ابوالفضل دادخواه[۱]، فائزه فاطمی[۲]، ناهید داوودیان[۳]

[۱]استادیار بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.
[۲]استادیار بیوشیمی، پژوهشکده علوم هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران.
[۳]کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سپسیس نوعی پاسخ سیستمیک بدن به عفونت است که در نهایت منجر به از کار افتادن و مرگ اندام‌ها می‌شود. با توجه به عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای سنتتیک، امروزه استفاده از گیاهان دارویی در درمان سپسیس مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه با هدف تعیین اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی زیره سیاه بر روی آسیب بافت قلب و کلیه در مدل تجربی التهابی (CLP (Cecal Ligation and Puncture در رت صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه، رت‌ها به ۵ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (SOP)، گروه CLP، گروه‌های تیمار CLP+ عصاره هیدروالکلی زیره سیاه (۵۰mg/kg b.w، ۱۰۰) و گروه CLP+ ایندومتاسین (کنترل مثبت).

ابتدا ایندومتاسین و عصاره به‌صورت داخل صفاقی (i.p) بلافاصله پس از القای سپسیس به حیوانات تزریق شد و ۲۴ ساعت پس از القای سپسیس، بافت قلب، کلیه و پلاسمای آنها جدا و آنالیز گردید. تفاوت‌های بین نتایج با استفاده از آزمون واریانس و تعقیبی توکی تعیین شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، سطح پراکسیداسیون لیپیدها در بافت کلیه و نسبت اوره به کراتینین پلاسما در گروه CLP، به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد. درصورتی‌که سطح گلوتاتیون در این بافت تغییری نیافت که این امر نشان‌دهنده آسیب نسبی بافت کلیه در رت‌های سپتیکی است. برخلاف ایندومتاسین، تیمار رت‌ها با هر دو دوز عصاره هیدروالکلی زیره سیاه، هیچ‌گونه تغییری در بهبود پارامترهای فوق ایجاد نکرد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد تیمار رت‌های سپتیکی با عصاره هیدروالکلی زیره سیاه بلافاصله بعد از انجام CLP به‌صورت داخل صفاقی، تأثیری بر روی بهبود پارامترهای دخیل در آسیب بافتی کلیه ندارد و این عصاره در حفاظت از بافت کلیه در برابر آسیب اکسیداتیو ایجادشده توسط سپسیس ناتوان است.

کلید واژه‌ها: عصاره هیدروالکلی؛ زیره سیاه؛ آسیب‌های قلب؛ کلیه؛ سی ال پی؛ استرس اکسیداتیو.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران؛
آدرس پست الکترونیکی: dadkhah_bio@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۱۳ **تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۱۱**

مقدمه

سپسیس عارضه‌ای است که مشکلات بالینی و اقتصادی فراوانی را در پی دارد و تحقیقات وسیعی در زمینه‌های مختلف آن صورت گرفته است (۱). باوجود پیشرفت‌های درمانی در زمینه سپسیس، این بیماری و عواقب ناشی از آن مهم‌ترین عامل مرگ و میر در بیماران مراقبت‌های ویژه می‌باشد (۲). یکی از عوارض و مشکلات ناشی از سپسیس به‌هم خوردن تعادل سیستم استرس اکسیداتیو بدن است (۳). در شرایط فیزیولوژیک بین تشکیل گونه‌های اکسیدکننده و حذف آنها توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان تعادل وجود دارد. استرس اکسیداتیو زمانی ایجاد

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود که این تعادل در اثر تولید زیاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن (Reactive Oxygen Species) ROS و یا تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مختل شود (۴)، رخداد این دو فرآیند در سپسیس (۱)، منجر به آسیب اکسیداتیو بسیاری از بافت‌های بدن از جمله قلب، کلیه و در نهایت از کارافتادن بافت‌ها می‌گردد (۵). امروزه داروهای مختلفی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها، NSAIDها (Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) و غیره برای کاهش و یا درمان عوارض ناشی از سپسیس استفاده می‌شود. با توجه به نقش مهم و اصلی استرس اکسیداتیو در عوارض ناشی از سپسیس، استفاده از آنتی‌اکسید آنها و عوامل طبیعی در کاهش این عوارض، مورد توجه می‌باشد (۱). عصاره آبی گیاهان دارویی خواص بیولوژیکی و درمانی متفاوتی دارند. در مطالعه‌ای نشان داده شد Tempol (یک گیرنده رادیکال‌های آزاد)، فاکتورهای استرس اکسیداتیو از جمله NO (Nitric Oxide)، O_2 و IL-1ß را در پلاسمای رت‌های مدل CLP کاهش می‌دهد. همچنین شاخص‌های آسیب کبدی ALT (Alanine Transaminase)، AST (Aspartate Transaminase) و شاخص‌های آسیب کلیه (کراتینین و اوره) نیز در پلاسما کاهش می‌یابد. در این مطالعه مشخص گردید با کاهش استرس اکسیداتیو توسط Tempol، طول عمر رت‌ها نیز زیاد می‌شود (۶). ترکیب دیگری به‌نام Bicucullin نیز دارای اثرات ضد التهابی است و تیمار رت‌های مدل CLP با آن باعث کاهش $TNF-\alpha$، IL-1β، پراکسیداسیون لیپیدها و نیتریت، همچنین کاهش آسیب کبدی و مرگ و میر حیوانات می‌شود (۸،۷). تزریق آسکوربیک اسید (۱۰۰mg/kg b.w) (i.v) به رت‌های مدل CLP باعث کاهش ALT و AST، پراکسیداسیون لیپیدها، گلوتاتیون و کاهش بیان ژن‌های iNOS، اکسیژناز، $TNF-\alpha$ و COX-2 می‌گردد (۹).

زیره سیاه در قدیم به‌عنوان یک گیاه دارویی مورد استفاده بوده است. این گیاه در اروپای مرکزی و شمالی، سیبری، ترکیه، هند، افریقای شمالی و ایران کشت داده می‌شود. زیره سیاه برای اولین بار توسط اعراب و فیلینی‌های قدیمی، به خاطر برطرف کردن علائم هیستریکی و رنگ پریدگی چهره، معرفی گردید. در افسانه‌های گذشتگان آمده که جولیس سزار و سربازان والریوس، مخلوط ریشه‌های زیره سیاه با شیر "Chara" را به‌صورت نان مصرف می‌کرده‌اند. در زمان شکسپیر نیز خوردن سیب همراه با زیره سیاه به‌صورت دسر معمول بوده است (۱۰). امروزه از دانه‌های زیره سیاه به‌عنوان طعم‌دهنده نان، پنیر، شیرینی‌ها، محصولات گوشتی، سس‌ها و نوشابه‌ها استفاده می‌کنند. همچنین کاروون موجود در اسانس این گیاه معطر در وسایل آرایشی ـ بهداشتی، خمیر دندان، آدامس و داروسازی کاربرد دارد. این دانه‌ها در طب سنتی به‌عنوان ملین در درمان بیماری‌های روده‌ای (کولیک) و تازه‌کننده نفس و کمک‌کننده هضم غذا به‌خصوص در بچه‌ها، استفاده می‌شود. همچنین دانه‌های این گیاه دارای اثرات ضد اسپاسمی، ضد نفخی، ضد باکتریایی، ضد سرطانی، ازدیاد قاعدگی، خلط‌آور (اسپکتورانت)، شیرآور، اشتهاآور و نیروبخش می‌باشند (۱۰). نتایج تخلیص و بررسی ترکیبات زیره سیاه نشان می‌دهد فاز آبی این محصول دارای ترکیبات منوترپنوئید و انواع ترکیبات آروماتیک، فلاونوئیدها، گلوکوزیدها و نوکلئوزیدها است (۱۱). اجزای فلاونوئیدی زیره سیاه با کروماتوگرافی ستون سلولزی مشخص می‌شود که شامل: Quercetin 3-glucuronide, Isoquercitrin Quercetin 3-O-Caffeylglucoside و Kaempferol 3-glucoside می‌باشد (۱۲). همچنین مشخص شده است که فاز آبی زیره سیاه فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد که به دلیل حلالیت ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی در فاز آبی می‌باشد (۱۳). مطالعات نشان داده‌اند عصاره آبی گیاهان دارویی و فلاونوئیدها دارای خواص فارماکولوژیکی گوناگونی هستند. به‌عنوان مثال Quercetin موجود در زیره سیاه در کاهش سیروز کبدی القاشده توسط CCl_4 در رت‌ها مؤثر است و عمل خود را با افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش اثر پرواکسیدان‌ها انجام می‌دهد (۱۴). همچنین Quercetin، سلول‌های هپاتومای H4IIE را در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از قرار گرفتن در معرض پراکسید هیدروژن محافظت می‌کند (۱۵). با توجه به انواع ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره آبی زیره سیاه می‌توان پیش‌بینی نمود که این عصاره دارای خواص بیولوژیکی گوناگونی است. در یک مطالعه دیگر نیز مشاهده گردید خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی زیره سیاه از آسکوربیک اسید بیشتر است (۱۶). تیمار رت‌های دیابتی القاشده با Streptozotocin به‌صورت خوراکی با عصاره آبی دانه زیره سیاه (۲۰mg/kg b.w)، باعث کاهش کلسترول و تری‌گلیسرید پلاسما می‌شود (۱۷). مقاله‌ای در سال ۲۰۰۶ گزارش نمود که عصاره آبی دانه زیره سیاه باعث مهار اثر موتاژنیکی N ـ متیل ـ N′ ـ نیترو ـ N ـ نیتروزوگوانیدین در سالمونلا می‌شود (۱۸). تیمار رده سلولی کبدی Chang با

www.SID.ir

Archive of SID

Quercetin و Kaempferol (۲۰۰µmol/L ـ ۵)، به‌صورت وابسته به دوز، باعث کاهش سطح پروتئین و بیان ژن‌های iNOS و COX-2 و CRP می‌گردد (۱۹). Quercetin نیز به‌عنوان یک فلاونوئید آنتی‌اکسیدانی، وضعیت ROS را در سلول‌ها تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۰). تیمار Mcellهای صفاقی تحریک‌شده رت با عصاره آبی گیاهی حاوی Quercetin، باعث کاهش ترشح هیستامین از این سلول‌ها می‌شود (۲۱). همچنین تیمار رت با Quercetin (۲۰۰ mg/kg b.w) به‌صورت خوراکی ۲ ساعت قبل از تزریق LPS، سطح MDA و NO را در بافت این حیوانات کاهش می‌دهد (۲۲). امروزه یافتن فرمولاسیون‌های جدید به‌ویژه با منشأ گیاهی، از جمله استراتژی‌های درمانی سپسیس است. با این وجود، در مورد اثرات درمانی زیره سیاه برای کاهش عوارض ناشی از سپسیس، به‌خصوص کاهش آسیب‌های اکسیداتیو بافت‌ها در اثر سپسیس مطالعه‌ای صورت نگرفته است. بنابراین این مطالعه با هدف بررسی عملکرد عصاره هیدروالکلی استخراج‌شده از زیره سیاه در درمان سپسیس انجام شد. بدین منظور در این تحقیق تأثیر عصاره هیدروالکلی زیره سیاه بر سطح فاکتورهای استرس اکسیداتیو نظیر LP و GSH در ۲ بافت قلب و کلیه، همچنین پارامترهای آسیب بافت قلب و کلیه نظیر اوره، کراتینین و CK-MB در پلاسما موش‌های صحرایی بررسی گردید.

روش بررسی

در این تحقیق، از رت‌های نر بالغ ویستار با وزن متوسط ۱۶۰g استفاده گردید. رت‌ها از مراکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. غذای حیوانات از کارخانجات فرآورده‌های غذایی تهران به‌صورت Pellet با فرمول استاندارد، خریداری شد. حیوانات بالغ نیز دسترسی آزاد به غذا و آب آشامیدنی از طریق بطری داشتند. در این روش، پس از بیهوش کردن رت‌ها توسط مخلوط کتامین و گزیلوزین، در دیواره شکمی آنها به اندازه ۲cm برش ایجاد گردید. سپس با خارج کردن سکوم و با فشار انگشت، مدفوع درون سکوم به انتها انتقال داده شد. در ادامه، بخش سکوم تا زیر دریچه ایلئوسکال توسط نخ بخیه ۳-۰ بخیه زده شد و در سکوم (بدون آسیب به رگ‌های خونی)، ۲ سوراخ توسط سر سوزن G20 ایجاد شد. بعد از این مرحله، با برگرداندن روده به داخل محفظه شکمی، پوست و صفاق بخیه زده شد. در گروه کنترل (لاپاراتومی)، نیز، جراحی فوق بدون بستن دریچه ایلئوسکال و سوراخ کردن سکوم انجام گرفت (۲۳). سپس حیوانات مورد بررسی به پنج گروه ۶ تایی تقسیم شدند. در گروه کنترل (SOP)، رت‌ها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و DMSO به‌عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شد. در گروه CLP حیوانات تحت جراحی CLP قرار گرفته و DMSO به‌همان صورت به آنها تزریق گردید. دو گروه مختلف تیمار نیز، عصاره هیدروالکلی (H.E) استخراج‌شده از زیره سیاه (۵۰mg/kg b.w، ۱۰۰) را بلافاصله بعد از CLP به‌صورت i.p دریافت کردند. همچنین در گروه کنترل مثبت، ایندومتاسین (۱۰mg/kg b.w) بلافاصله بعد از CLP به‌صورت i.p به آنها تزریق شد. سپس ۲۴ ساعت پس از تیمار، رت‌ها را کشته و بافت قلب و کلیه آنها به‌منظور اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر جدا شد. همچنین پس از خونگیری از قلب، پلاسما جهت اندازه‌گیری مارکرهای آسیب بافتی جدا گردید.

میزان TBARS [که به‌طور عمده MDA (Malone Dialdehyde) می‌باشد] با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از معرف تیوباربیتوریک اسید (TBA)، براساس روش ارائه‌شده توسط Buege و Aust (سال ۱۹۸۷) اندازه‌گیری شد. در این روش ۰/۱۵g از بافت قلب و کلیه در ۱/۵ml بافر فسفات ۱۰۰mM هموژن گردید و به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰g سانتریفوژ شد. ۱ml از محلول رویی به لوله دربدار منتقل و به آن ۲ml از معرف TBA اضافه و ورتکس شد. سپس درب لوله بسته و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. پس از سرد شدن، لوله‌ها در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه با قدرت ۳۰۰۰g سانتریفوژ شدند و جذب محلول رویی در مقابل بلانک در ۵۳۵nm توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان TBARS با استفاده از ضریب خاموشی آن محاسبه گردید (۲۴). در مرحله بعد، GSH با استفاده از معرف Ellman's و براساس روش Seldak و Lindsay (۱۹۸۶) اندازه‌گیری شد (۲۵). در این روش به ۲۰۰mg بافت قلب و کلیه، ۸ml محلول EDTA، ۰/۰۲M اضافه و هموژن گردید. به ۵ml از این هموژنات، ۴ml آب مقطر و ۱ml محلول ۵۰٪ TCA افزوده شد و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه ورتکس گردید. سپس جهت رسوب کامل پروتئین‌های بافتی، مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰g در دمای اتاق سانتریفوژ شد. در ادامه، ۲ml از

www.SID.ir

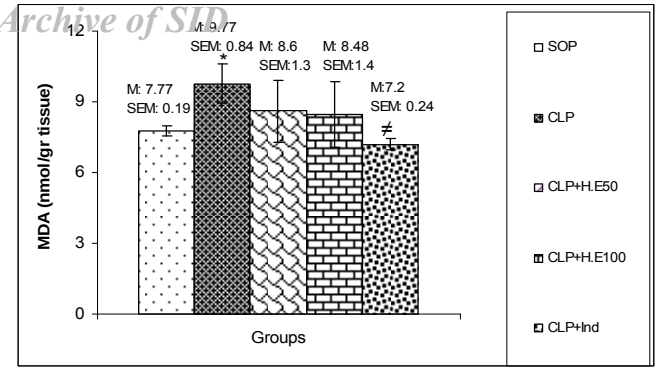
Archive of SID

محلول رویی با 4ml بافر تریس ۰/۴M حاوی EDTA، ۰/۲M (pH=۸/۹) و ۰/۱ml محلول DTNB، ۰/۰۱M (در متانول) مخلوط گردید و بلافاصله جذب آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۲nm خوانده شد. میزان GSH با استفاده از منحنی استاندارد گلوتاتیون احیا اندازه‌گیری شد.

به‌منظور بررسی آسیب احتمالی سلول‌های بافت قلب و کلیه، میزان فعالیت برخی از پارامترهای آنزیمی و غیرآنزیمی آسیب بافت کلیه و قلب (به ترتیب CK-MB, Urea, Creatinin) ۲۴ ساعت بعد از القای سپسیس در پلاسما اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری پارامترهای مذکور طبق پروتکل تأییدشده موجود در کیت‌های خریداری‌شده از شرکت پارس آزمون انجام گرفت. داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف معیار (SEM) گزارش شدند. اختلافات و تفاوت‌های بین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ و آزمون واریانس تعیین گردید. آزمون تعقیبی مورد استفاده در این آنالیز Tukey's HSD (Honestly Significant Differences) بود. معیار معنی‌دار بودن داده‌ها در کمتر از ۰/۰۵($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

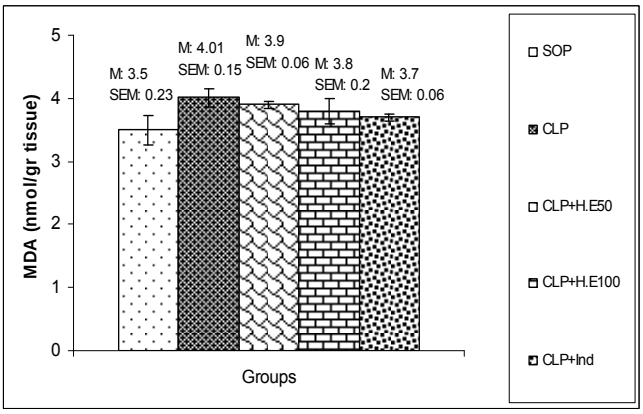
یافته‌ها

همان‌طورکه در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است، سطح MDA به‌عنوان محصول لیپید پراکسیداسیون در بافت کلیه رت‌های مبتلا به سپسیس، ۲۴ ساعت بعد از القای سپسیس (گروه CLP)، ۲۶٪ افزایش یافته است ($p<۰/۰۵$). تیمار رت‌های سپتیکی با عصاره هیدروالکلی زیره سیاه در ۲ دوز ۵۰ و ۱۰۰mg/kg b.w هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری بر روی سطح پراکسیداسیون لیپیدها ایجاد نکرده است، برخلاف عصاره، سطح MDA در گروه‌های تیمارشده با داروی ضد التهابی ایندومتاسین کاهش معنی‌داری داشته است ($p<۰/۰۵$). همان‌طورکه در نمودار شماره ۲ مشاهده می‌شود، سطح MDA در بافت قلب همه گروه‌ها در سطح یکسانی قرار دارد، به‌طوری‌که پراکسیداسیون لیپیدها در بافت قلب رت‌های گروه CLP تغییر معنی‌داری نیافته است. تیمار رت‌های مبتلا به سپسیس با عصاره حاصل از زیره سیاه نیز تغییر معنی‌داری در میزان MDA بافت قلب ایجاد نکرده است.



نمودار شماره ۱: تأثیر عصاره زیره سیاه بر روی سطح MDA در بافت کلیه رت‌های مبتلا به سپسیس

در گروه کنترل (SOP) رت‌ها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و DMSO به‌عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. در گروه CLP حیوانات تحت جراحی CLP قرار گرفته و DMSO به‌عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. در دو گروه مختلف تیمار، عصاره هیدروالکلی (H.E) استخراج‌شده از زیره سیاه (۵۰mg/kg b.w، ۱۰۰) بلافاصله بعد از CLP به‌صورت i.p به آنها تزریق شده است. گروه کنترل مثبت نیز، ایندومتاسین (۱۰mg/kg b.w) را بلافاصله بعد از CLP به‌صورت i.p دریافت کرده‌اند. مقادیر براساس میانگین ۶ نمونه± انحراف معیار گزارش شده است. علامت * نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه کنترل معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$). علامت ≠ نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی‌دار هستند ($p<۰/۰۵$).



نمودار شماره ۲: تأثیر عصاره زیره سیاه بر روی سطح MDA در بافت قلب رت‌های مبتلا به سپسیس

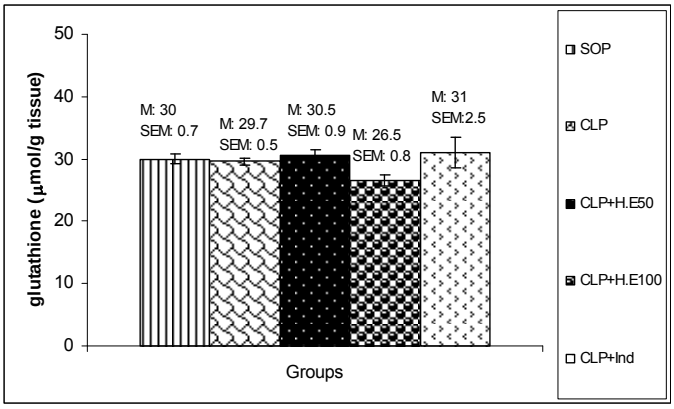
در گروه کنترل (SOP) رت‌ها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و DMSO به‌عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. در گروه CLP حیوانات تحت جراحی CLP قرار گرفته و DMSO به‌عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. دو گروه مختلف تیمار نیز، عصاره هیدروالکلی (H.E) استخراج‌شده از زیره سیاه (۵۰mg/kg b.w، ۱۰۰) را بلافاصله بعد از CLP به‌صورت i.p دریافت کرده‌اند. در گروه کنترل مثبت، ایندومتاسین (۱۰mg/kg b.w) بلافاصله بعد از CLP به‌صورت i.p به آنها تزریق شده است. مقادیر براساس میانگین ۶ نمونه ± انحراف معیار گزارش شده است.

میزان گلوتاتیون احیا (GSH) در هموژن بافت کلیه و قلب رت‌های سپتیکی در تمام گروه‌ها، ۲۴ ساعت بعد از القای سپسیس، در نمودار شماره ۳ و ۴ نشان داده شده است. طبق نمودار، سطح گلوتاتیون در بافت کلیه و قلب رت‌های مبتلا به

www.SID.ir

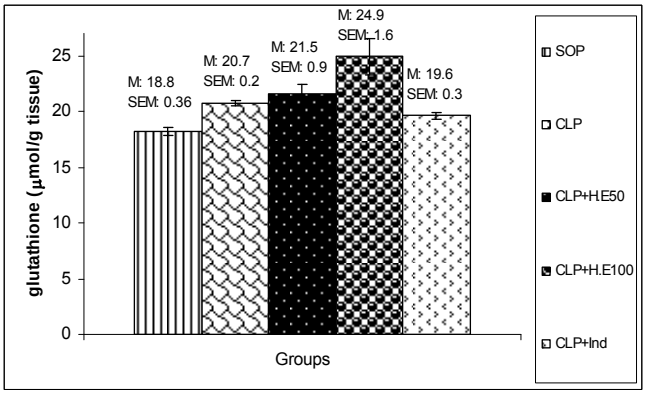
Archive of SID

سپسیس (گروه CLP) نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری نیافته است. تیمار رت‌های سپتیکی با عصاره استخراج‌شده از زیره سیاه در ۲ دوز ۵۰ و ۱۰۰mg/kg b.w نیز تأثیری بر روی میزان گلوتاتیون نداشته که این عدم تغییر در گروه تیمارشده با ایندومتاسین نیز قابل مشاهده می‌باشد.



نمودار شماره ۳: تأثیر عصاره زیره سیاه بر روی سطح GSH در بافت کلیه رت‌های مبتلا به سپسیس

در گروه کنترل (SOP) رت‌ها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و DMSO به‌عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. در گروه CLP حیوانات تحت جراحی CLP قرار گرفته و DMSO به‌عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. دو گروه مختلف تیمار، عصاره هیدروالکلی (H.E) استخراج‌شده از زیره سیاه (۵۰mg/kg b.w، ۱۰۰) را بلافاصله بعد از CLP به‌صورت i.p دریافت کرده‌اند. در گروه کنترل مثبت، ایندومتاسین (۱۰mg/kgb.w) بلافاصله بعد از CLP به‌صورت i.p به آنها تزریق شده است. مقادیر براساس میانگین ٦ نمونه ± انحراف معیار گزارش شده است.



نمودار شماره ٤: تأثیر عصاره زیره سیاه بر روی سطح GSH در بافت قلب رت‌های مبتلا به سپسیس

در گروه کنترل (SOP) رت‌ها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و DMSO به‌عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. در گروه CLP حیوانات تحت جراحی CLP قرار گرفته و DMSO به‌عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. دو گروه مختلف تیمار، عصاره هیدروالکلی (H.E) استخراج‌شده از زیره سیاه (۵۰mg/kgb.w، ۱۰۰) را بلافاصله بعد از CLP به‌صورت i.p دریافت کرده‌اند. در گروه کنترل مثبت، ایندومتاسین (۱۰mg/kg b.w) بلافاصله بعد از CLP به‌صورت i.p به آنها تزریق شده است. مقادیر براساس میانگین ٦ نمونه ± انحراف معیار گزارش شده است.

به‌منظور بررسی آسیب بافت کلیه و قلب، ۲۴ساعت بعد از CLP، مارکرهای آنزیمی و غیرآنزیمی اندازه‌گیری شدند که نتایج آن در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. نسبت اوره به کراتینین در گروه CLP به میزان زیادی (حدود ۵/۵ برابر) نسبت به گروه کنترل افزایش دارد ($p<۰/۰۵$). افزایش معنی‌دار این پارامتر که نشان‌دهنده آسیب بافت کلیه می‌باشد در گروه تیمارشده با ایندومتاسین به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است ($p<۰/۰۵$). برخلاف ایندومتاسین، تیمار رت‌های سپتیکی با عصاره هیدروالکلی زیره سیاه در هر دو دوز، هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در نسبت اوره به کراتینین در پلاسما ایجاد نکرده است. آنزیم CK-MB که نشان‌دهنده آسیب بافت قلب می‌باشد، در هیچ‌کدام از گروه‌ها تغییری نیافته است، بدان معنی که این شاخص آسیب بافتی در گروه سپسیس (گروه CLP) افزایش نیافته و همچنین تیمار رت‌ها با عصاره زیره سیاه و داروی ایندومتاسین نیز تغییری در سطح این آنزیم در پلاسما ایجاد نکرده است.

جدول: تأثیر عصاره هیدروالکلی زیره سیاه بر روی مارکرهای آسیب بافتی در پلاسمای رت‌های مبتلا به سپسیس

گروه‌ها	Urea/creatinine (mg/dl)	CK-MB (U/L)
لاپاراتومی (SOP)	۸۴/۸±۱۲	۴۷۵/۲±۳۳
CLP	۴۶۲/۵±۸۱*	۴۸۰/۷±۳۴
CLP+H.E50	۴۷۴/۳±۲۳	۳۹۷±۹۰
CLP+H.E100	۴۷۷/۳±۱۴	۶۴۹±۹
CLP+Ind10	۳۶/۸±۱۱≠	۴۲۳/۳±۶۶

در گروه کنترل (SOP) رت‌ها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و DMSO به‌عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. در گروه CLP حیوانات تحت جراحی CLP قرار گرفته و DMSO به‌عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. در دو گروه مختلف تیمار، رت‌ها عصاره هیدروالکلی (H.E) زیره سیاه (۵۰mg/kg b.w، ۱۰۰) را بلافاصله بعد از CLP به‌صورت i.p دریافت کرده‌اند. در گروه کنترل مثبت، ایندومتاسین (۱۰mg/kg b.w) بلافاصله بعد از CLP به‌صورت i.p به آنها تزریق شده است. مقادیر براساس میانگین ٦ نمونه ± انحراف معیار گزارش شده است. علامت * نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه کنترل معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$). علامت ≠ نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی‌دار هستند ($p<۰/۰۵$).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جمله انواع فلاونوئیدها، ترکیبات موجود در عصاره هیدروالکلی زیره سیاه را

www.SID.ir

Archive of SID

تشکیل می‌دهند (۲۶). بنابراین در این تحقیق، اثرات محافظتی این عصاره در آسیب بافت قلب و کلیه در سپسیس القاشده توسط مدل تجربی التهابی CLP در رت بررسی شد که در این راستا پارامترهای دخیل در آسیب اکسیداتیو بافتی از جمله LP, GSH، همچنین پارامترهای پلاسمایی شاخص آسیب بافت کلیه (اوره به کراتینین) و بافت قلب (CK-MB) اندازه‌گیری شدند. نتایج این مطالعه نشان داد سپسیس القاشده توسط مدل التهابی CLP باعث آسیب نسبی بافت کلیه می‌شود که افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، همچنین افزایش نسبت اوره به کراتینین این مطلب را تأیید می‌کند (نمودار شماره ۲). مطالعات دیگری نیز نشان داده‌اند استرس اکسیداتیو در سپسیس رابطه مستقیمی با آسیب بافتی در مدل CLP دارد. افزایش قابل توجه ROS در سپسیس می‌تواند از مسیرهای مختلف از جمله پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و نیز آسیب اکسیداتیو به پروتئین و DNA، منجر به آسیب سلولی گردد (۲۷،۲۳). همچنین در این مطالعه، گلوتاتیون به‌عنوان یک جزء مهم در مکانیسم دفاع داخل سلولی (۲۸)، در بافت کلیه رت‌های مبتلا به سپسیس تغییری ایجاد نکرد. این امر نشان‌دهنده این نکته است که آسیب بافت کلیه آن‌قدر جدی نبوده که باعث کاهش معنی‌دار GSH گردد (نمودار شماره ۳). از طرف دیگر، یافته‌ها مطالعه حاضر نشان داد بافت قلب پس از القای سپسیس توسط مدل تجربی التهابی CLP دچار آسیب جدی نشده است. عدم تغییر معنی‌دار پارامترهای دخیل در آسیب اکسیداتیو بافتی از جمله LP، GSH، همچنین CK-MB پلاسما در تمام گروه‌ها این نتیجه را تأیید می‌کند ($p<۰/۰۵$) (نمودار شماره ۲، ۴ و جدول شماره ۲).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تیمار رت‌ها با عصاره هیدروالکلی زیره در ۲ دوز ۵۰ و ۱۰۰ mg به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تأثیری در پارامترهای استرس اکسیداتیو (TBARS و GSH) در ۲ بافت قلب و کلیه ندارد ($p<۰/۰۵$) و این در حالی است که داروی ایندومتاسین باعث کاهش معنی‌داری در سطح LP و نیز کاهش نسبت اوره به کراتینین (شاخص عملکرد کلیه) در پلاسمای رت‌های تیمارشده می‌شود ($p<۰/۰۵$) (نمودار شماره ۴-۱ و جدول شماره ۲). مطالعات قبلی بر روی بافت ریه نیز نشان داد عصاره هیدروالکلی زیره سیاه در ۲ دوز ۵۰ و ۱۰۰mg به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تأثیری بر روی پارامترهای دخیل در آسیب اکسیداتیو بافتی (GSH, MPO, LP) ندارد (۲۶)؛ درصورتی‌که اثرات مثبت اسانس حاصل از زیره سیاه در مطالعات قبلی گزارش شده است. اسانس حاصل از دانه‌های زیره سیاه با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی در In Vitro (۲۶) با تعدیل فاکتورهای دخیل در سیستم استرس اکسیداتیو/آنتی‌اکسیدانی، از آسیب بافت کبد و ریه ناشی از سپسیس جلوگیری می‌کند (۲۹،۳۰). نتایج حاصل از بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس در رت‌های سپتیکی نشان می‌دهد اسانس زیره سیاه در ساعات مختلف پس از القای سپسیس باعث تعدیل سطح فاکتورهای دخیل در تعادل سیستم آنتی‌اکسیدانی/ استرس اکسیداتیو در دو بافت کبد و ریه می‌شود و این در حالی است که عصاره هیدروالکلی تأثیری بر روی پارامترهای فوق ندارد (۳۱). خواص فارماکودینامیکی و توزیع ترکیبات موجود در عصاره زیره سیاه در بدن می‌تواند یکی از دلایل عدم تأثیر عصاره هیدروالکلی بر روی پارامترهای دخیل در آسیب اکسیداتیو بافتی باشد. وجود ترکیبات آروماتیک گلوکوزیدی، آلکیل گلوکوزیدها، گلوسیدها، نوکلئوزیدها و فلاونوئیدها در عصاره هیدروالکلی زیره سیاه (۱۱)، باعث زیست دسترسی (Bioavailability) پایین این عصاره می‌شود. محدود بودن زیست دسترسی پلی‌فنل‌ها، نه تنها به دلیل خواص فیزیکوشیمیایی مولکول؛ بلکه به دلیل متابولیسم آن نیز می‌باشد که موجب ورود یک‌باره این‌گونه مولکول‌ها به فاز ۲ متابولیسم می‌شود (۳۴-۳۲). به‌علاوه، باوجود اثبات فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها، در مطالعات متعددی نیز فعالیت پرواکسیدانی این ترکیبات گزارش شده است (۳۷-۳۵). نتایج تحقیقات Robaszkiewicz و همکارانش نشان داد اثرات پرواکسیدانی فلاونوئیدها می‌تواند به‌صورت وابسته به دوز باشد. این محققین گزارش کردند تیمار رده سلولی سرطان ریه انسانی A549 با غلظت‌های پایین Quercetin (۵ و ۱۰μM) منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، کاتالاز، GST و کاهش تولید ROS در این سلول‌ها می‌شود، ولی این ترکیب فلاونوئیدی در غلظت زیاد (۱۰۰μM) به‌عنوان یک ترکیب پرواکسیدان عمل کرده و منجر به افزایش تولید ROS و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (۳۸). همچنین تیمار رده سلولی لوکمیای انسان HL-60 با یک ترکیب فلاونوئید به‌نام اپی‌ژنین منجر به تولید ROS در این سلول‌ها می‌شود. این در

www.SID.ir

Archive of SID

حالی است که تیمار همزمان این سلول‌ها با مهارکننده‌های آنزیم MPO، تولید ROS توسط اپی‌ژنین را کاهش می‌دهد. نتایج این تحقیق نشان داد اکسیداسیون اپی‌ژنین توسط آنزیم MPO و تبدیل شدن آن به رادیکال فنوکسیل، مسئول اثرات پرواکسیدانی اپی‌ژنین است (۳۹). آنزیم MPO در حضور H_2O_2 با گرفتن یک الکترون از حلقه کاتکول B موجود در فلاونوئیدها آنها را به رادیکال فنوکسیل تبدیل می‌کند که منجر به آسیب اکسیداتیو به ماکرومولکول‌های سلول می‌شود (۲۰). همچنین مطالعات نشان داده است فعالیت پرواکسیدانی پلی‌فنل‌ها در اثر واکنش با فلزاتی مانند آهن و مس ایجاد می‌شود؛ بدین صورت که پلی‌فنل‌ها به Fe^{3+} متصل شده و آن را به Fe^{2+} احیا می‌کنند. در این فرآیند، خود پلی‌فنل‌ها به سمی کوئینون (Semiquinone) اکسید می‌شوند که در ادامه قادرند یک اتم Fe^{3+} دیگر را به Fe^{2+} احیا و خود به کوئینون تبدیل شوند. Fe^{2+} حاصل از فرآیند فوق با شرکت در واکنش شبه‌فنتونی، منجر به تولید رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شود (۴۰). همچنین پلی‌فنل‌ها با فعالیتی همانند آنزیم سوپر اکسید دسموتاز با آنیون‌های سوپر اکسید واکنش داده و H_2O_2 و رادیکال‌های سمی کوئینون را ایجاد می‌کنند. از طرفی، H_2O_2 حاصل از فرآیند فوق نیز قادر است با شرکت در واکنش فنتون و در حضور Fe^{2+}، رادیکال‌های هیدروکسیل بیشتری تولید کند (۴۰). به‌طورکلی، با توجه به مطالب فوق می‌توان بیان نمود که پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها در حالت احیا مانند آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند؛ درصورتی‌که همین ترکیبات در حالت اکسیدشده (مثل رادیکال فنوکسیل یا کوئینون) می‌توانند به‌عنوان یک عامل پرواکسیدان عمل نمایند (۲۰). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد در شرایط سپسیس، میزان تولید ROS و فعالیت آنزیم MPO افزایش و سطح آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر گلوتاتیون کاهش می‌یابد. بنابراین احتمالاً در این شرایط، پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدهای موجود در عصاره هیدروالکلی زیره سیاه به حالت اکسید درآمده و به‌عنوان یک عامل پرواکسیدان عمل می‌کنند؛ به‌طوری‌که قادر به جبران آسیب‌های ناشی از سپسیس نمی‌باشند. همچنین نباید تأثیر نوع تزریق، زمان تزریق و نوع مدل التهابی را در عدم تأثیر عصاره هیدروالکلی زیره سیاه نادیده گرفت. از طرفی نیز بررسی راههای دیگر تزریق از جمله تزریق زیرپوستی، وریدی و یا تیمار به‌صورت خوراکی و زمانهای مختلف تزریق، قبل و بعد از القای سپسیس باید مدنظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد تزریق i.p عصاره هیدروالکلی زیره سیاه بلافاصله بعد از القای سپسیس، هیچ‌گونه تأثیری بر روی تعدیل پارامترهای اکسیداتیو دخیل در آسیب بافتی در کلیه و قلب نداشته است. البته در این راستا بررسی مدل‌های دیگر القای سپسیس، همچنین استفاده از راههای دیگر تیمار حیوانات نیز نباید نادیده گرفته شود.

References:

1. Victor VM, Rocha M, Fuente MD. Immune Cells: Free Radicals and Antioxidants in Sepsis. Int Immunopharmacol 2004;4:327-347.

2. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. Chest 1997;112:235-243.

3. Basu S, Eriksson M. Lipid Peroxidation Induced by an Early Inflammatory Response in Endotoxaemia. Acta Anaesthesiol Scand 2000;14:17-23.

4. Gutteridge JM, Mitchell J. Redox Imbalance in the Critically Ill. Br Med Bull 1999;55:9-75.

5. Basu S, Eriksson M. Vitamin E in Relation to Lipid Peroxidation in Experimental Septic Shock. Eur J Pharmacol 2006;534:202-209.

6. Liaw WJ, Chen TH, Lai ZZ, Chen SJ, Chen A, Tzao C, et al. Effects of a Membrane-Permeable Radical Scavenger, Tempol, on Intraperitoneal Sepsis-Induced Organ Injury in Rats. Shock 2005;23(1):88-96.

www.SID.ir

Archive of SID

7. Hsu DZ, Liu MY. Effects of Sesame Oil on Oxidative Stress after the Onset of Sepsis in Rats. Shock 2004;22(6):582-585.

8. Hsu DZ, Li YH, Chien SP, Liu MY. Effects of Sesame Oil on Oxidative Stress and Hepatic Injury after Cecal Ligation and Puncture in Rats. Shock 2004;21(5):466-469.

9. Kim JY, Lee SM. Effect of Ascorbic Acid on Hepatic Vasoregulatory Gene Expression during Polymicrobial Sepsis. Life Sci 2004;75(16):2015-26.

10. De Carvalho CCCR, Da Fonseca, MMR. Carvone: Why and Howshould one Bother to Produce This Terpene. Food Chem 2006;95:413-422.

11. Matsumura T, Ishikawa T, Kitajima J. Water-Soluble Constituents of Caraway: Aromatic Compound, Aromatic Compound Glucoside and Glucides. Phytochemistry 2002;61(4):455-459.

12. Kunzemann J, Herrmann K. Isolation and Identification of Flavon(ol)-O-Glycosides in Caraway (Carum Carvi L), Fennel (Foeniculum Vulgare Mill), Anise (Pimpinella Anisum L), and Coriander (Coriandrum Sativum L), and of Flavon-C-Glycosides in Anise. I Phenolics of Spices (Author's Transl). Z Lebensm Unters Forsch 1977;164(3):194-200.

13. Padmashree A, Roopa N, Semwal AD, Sharma GK. Star-Anise (Illicium Verum) and Black Caraway (Carum Nigrum) as Natural Antioxidants. Food Chem 2007;104:59-66.

14. Pavanato MA, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS. Quercetin Prevents Oxidative Stress in Cirrhotic Rats. Dig Dis Sci 2007;52(10):2616-21.

15. Elke Röhrdanz, Achim Bittne, Quynh-Hoa Tran-Thi, Regine Kahl. The Effect of Quercetin on the mRNA Expression of Different Antioxidant Enzymes in Hepatoma Cells. Mol Toxicol 2003;77(9):506-510.

16. Satyanarayana S, Sushruta K, Sarma GS, Srinivas N, Subba Raju GV. Antioxidant Activity of the Aqueous Extracts of Spicy Food Additives-Evaluation and Comparison with Ascorbic Acid in in-Vitro Systems. J Herb Pharmacother 2004;4(2):1-10.

17. Lemhadri A, Hajji L, Michel JB, Eddouks M. Cholesterol and Triglycerides Lowering Activities of Caraway Fruits in Normal and Streptozotocin Diabetic Rats. J Ethnopharmacol 2006;106(3):321-326.

18. Mazaki M, Kataoka K, Kinouchi T, Vinitketkumnuen U, Yamada M, Nohmi T, et al. Inhibitory Effects of Caraway (Carum Carvi L) and Its Component on N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidine-Induced Mutagenicity. J Med Invest 2006;53(2):123-133.

19. García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, et al. The Anti-Inflammatory Flavones Quercetin and Kaempferol Cause Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase, Cyclooxygenase-2 and Reactive C-Protein, and Down-Regulation of the Nuclear Factor Kappa B Pathway in Chang Liver Cells. Eur J Pharmacol 2007;557(3):221-229.

20. Galati G, O'Brien PJ. Potential Toxicity of Flavonoids and other Dietary Phenolics: Significance for their Chemopreventive and Anticancer Properties. Free Radic Biol Med 2004;37(3):287-303.

21. Haggag EG, Abou-Moustafa MA, Boucher W, Theoharides TC. The Effect of a Herbal Water-Extract on Histamine Release from Mast Cells and on Allergic Asthma. J Herb Pharmacother 2003;3(4):41-54.

22. Abd EI-Gawad HM, Khalifa AE. Quercetin, Coenzyme Q10, and l-Canavanine as Protective Agents Against Lipid Peroxidation and Nitric Oxide Generation in Endotoxin-Induced Shock in Rat Brain. Pharmacol Res 2001;43(3):257-263.

23. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD. Cecal Ligation and Puncture. Shock 2005;24:52-57.

24. Buege JA, Aust SD. Microsomal Lipid Peroxidation. Methods Enzymol 1978;52:302-311.

25. Seldak J, Lindsay RH. Estimation of Total Protein Bound and Non-Protein Sulfidryl Groups in Tissue with Elman' s Reagent. Anal Biochem 1986;25:192-205.

26. Fatemi F, Allameh A, Khalafi H, Rezaei MB, Seyhoon M. The Effect of Essential Oils and Hydroalcoholic Extract of Caraway Seed on Oxidative Stress Parameters in Rats Suffering from Acute Lung Inflammation before and after γ-Irradiation. IJMAP 2010;25:441-455.

www.SID.ir

Archive of SID

27. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. Clin Chem 1995;41:1819-28.

28. Villa P, Saccani A, Sica A. Glutathione Protects Mice from Lethal Sepsis by Limiting Inflammation and Potentiating Host Defense. J Infect Dis 2002;185:1115-20.

29. Fatemi F, Allameh A, Khalafi H, Ashrafihelan J. Hepatoprotective Effects of G-Irradiated Caraway Essential Oils in Experimental Sepsis. Appl Radiat Isot 2010;68:280-285.

30. Fatemi F, Allameh A, Khalafi H, Rajaee R, Rezaei MB. Biochemical Properties of γ-Irradiated Caraway Essential Oils. J Food Biochem 2010;In Press.

31. Davoodian N. Considering the Statues of Oxidative Stress and Antioxidant Defense System in Septic Rats Treated with Hydroalcoholic and Essential Oils Derived from Caraway seeds. Tehran: Medical Department, Tarbiat Modares Univresity; 2009. p. 45-73.

32. Lu H, Meng X, Yang CS. Enzymology of Methylation of Tea Catechins and Inhibition of Catechol-O-Methyltransferase by (–)-Epigallocatechin Gallate. Drug Metab Dispos 2003;31:572-579.

33. Lu H, Meng X, Li C, Sang S, Patten Ch, Sheng Sh, et al. Glucuronides of Tea Catechins: Enzymology of Biosynthesis and Biological Activities. Drug Metab Dispos 2003;31:452-461.

34. Yang CS, Sang S, Lambert JD, Lee MJ. Bioavailability Issues in Studying the Health Effects of Plant Polyphenolic Compounds. Mol Nutr Food Res 2008;52:139-151.

35. Panemangalore M, Bebe FN. Short-and Long-Term Exposure to Low Levels of Pesticide and Flavonoid Mixtures Modify Endogenous Antioxidants in Tissues of Rats. J Environ Sci Health 2009;44:357-364.

36. Murzakhmetova M, Moldakarimov S, Tancheva L, Abarova S, Serkedjieva J. Antioxidant and Prooxidant Properties of a Polyphenol-Rich Extract from Geranium Sanguineum L. In Vitro and In Vivo Phytother Res 2008;22:746-751.

37. Babich H, Gottesman RT, Liebling EJ, Schuck AG. Theaflavin-3-Gallate and Theaflavin-3-Gallate, Polyphenols in Black Tea with Prooxidant Properties. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2008;103:66-74.

38. Robaszkiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G. Antioxidative and Prooxidative Effects of Quercetin on A549 Cells. Cell Biol Int 2007;31:1245-50.

39. Miyoshi N, Naniwa K, Yamada T, Osawa T, Nakamura Y. Dietary Flavonoid Apigenin is a Potential Inducer of Intracellular Oxidative Stress: The Role in the Interruptive Apoptotic Signal. Arch Biochem Biophys 2007;466:274-282.

40. Perron NR, Brumaghim JL. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. Cell Biochem Biophys 2009;53:75-100.

www.SID.ir