بررسی اثر کرستین و کامفرول در مقایسه با آلوپورینول بر سطح اسیداوریک سرم، بیومارکرهای استرس اکسیداتیو و فعالیت کبدی آنزیم گزانتین اکسیداز/گزانتین دهیدروژناز در موش صحرایی هایپراورسمیک

فاطمه حیدری[۱]، سید علی کشاورز[۲]، محمد رضا رشیدی[*۴،۳]، سلطانعلی محبوب[۵]، محمد رضا اشراقیان[۲] و مجید محمد شاهی[۵]

[۱] دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران [۲]دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات علوم بهداشتی کشور، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران [۳]دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران [٤]مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران [۵] مرکز تحقیقات علوم تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۸۷/٤/۵ ، تاریخ پذیرش: ۸۷/۵/۲۰

Effects of quercetin and kaempferol versus allopurinol on serum uric acid levels, biomarkers of oxidative stress and hepatic xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity in hyperuricemic rats

Haidari F.,[1] Keshavarz S.A.,[2] Rashidi M.R.,[3,4*] Mahboob S.A.,[5] Eshraghian M.R.,[2] Shahi M.M.[5]

[1] School of Para-Medical, Ahvaz Jundishapur University of Medical Science, Ahvaz, Iran. [2] School of Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [3,4] Faculty of Pharmacy and Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [5] Nutrition Science Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 25 Jun. 2008, Accepted: 10 Aug. 2008

Objectives: The aim of this study was to investigate the effect of oral administration of quercetin (5 mg/kg) and kaempferol (5 mg/kg) versus allopurinol (5 mg/kg) on serum uric acid levels, biomarkers of oxidative stress (total antioxidant capacity and malondialdehyde concentration) and liver xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity in normal and hyperuricemic rats. **Methods:** A total of 48 male Wistar rats (body weights: 180-200 g) were randomly divided into eight equal groups including normal; normal + quercetin (5 mg/kg); normal + kaempferol (5 mg/kg); normal + allopurinol (5 mg/kg); hyperuricemic; hyperuricemic + quercetin (5 mg/kg); hyperuricemic + kaempferol (5 mg/kg); hyperuricemic + allopurinol (5 mg/kg) once a day for 14 days. Experimentally hyperuricemia in rats was induced by intraperitoneal injection of potassium oxonate (250 mg/kg). **Results:** Quercetin and kaempferol treatments for 14 days significantly reduced the serum uric acid levels of hyperuricemic rats in a time-dependent manner. All treatments significantly inhibited hepatic xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity. Quercetin and kaempferol treatment led also to a significant improve in biomarkers of oxidative stress in hyperuricemic rats. Although the hypouricemic effect of allopurinol was much higher than that of quercetin and kaempferol, it could not significantly change oxidative stress biomarkers. **Conclusion:** The results indicate that these polyphenols could be as possible alternative for allopurinol, and/or as therapeutic supplements to minimize the side effects of allopurinol in treating hyperuricemia and oxidative stress diseases.

Keywords: Quercetin, Kaempferol, Hyperuricemia, Xanthine Oxidase, Oxidative Stress.

زمینه و هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثر تجویز خوراکی کرستین و کامفرول در مقایسه با آلوپورینول بر سطح اسیداوریک سرم، بیومارکرهای استرس اکسیداتیو (ظرفیت توتال آنتی اکسیدانی و میزان پراکسیداسیون لیپیدی) و فعالیت کبدی آنزیم گزانتین اکسیداز/گزانتین دهیدروژناز در موش صحرایی نرمال و هایپراورسمیک بود. روش ها: جهت ارزیابی های فوق ۴۸ سر موش صحرایی نر از نژاد Wistar، با وزن تقریبی g ۲۰۰-۱۸۰، در گروههای نرمال، نرمال + کرستین (۵ mg/kg)، نرمال + کامفرول (۵ mg/kg)، نرمال + آلوپورینول (۵ mg/kg)، هایپراورسمیک، هایپراورسمیک + کرستین (۵ mg/kg)، هایپراورسمیک + کامفرول (۵ mg/kg)، هایپراورسمیک + آلوپورینول (۵ mg/kg) روزانه یکبار به مدت ۱۴ روز قرار گرفتند. برای ایجاد مدل حیوانی هایپراورسمیک از تجویز داخل صفاقی پتاسیم اکسونات (۲۵۰ mg/kg) استفاده شد. یافته ها: تجویز کرستین و کامفرول به مدت ۱۴ روز اسیداوریک سرم گروههای هایپراورسمیک را به طور معنی داری در یک الگوی وابسته به زمان کاهش داد. در تمام موارد فعالیت گزانتین اکسیداز/ گزانتین دهیدروژناز بعد از انجام مداخله به طور معنی داری مهار شد. تجویز کرستین و کامفرول همچنین موجب بهبود قابل ملاحظه بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در گروههای هایپراورسمیک شد. با وجود آنکه اثرات هایپواورسمیک آلوپورینول در مقایسه با کرستین و کامفرول بیشتر بود، ولی آلوپورینول نتوانست بیومارکرهای استرس اکسیداتیو را به طور معنی داری تغییر دهد. نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، می توان از این پلی فنلها به عنوان آلترناتیو احتمالی آلوپورینول و یا مکمل درمانی برای کاهش عوارض جانبی آلوپورینول در درمان هایپراوریسمی و بیماریهای ناشی از استرس اکسیداتیو استفاده نمود.

واژه های کلیدی: کرستین، کامفرول، هایپراوریسمی، گزانتین اکسیداز، استرس اکسیداتیو.

*نویسنده مسئول: محمد رضا رشیدی، استاد، دانشکده داروسازي و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران تلفن: ۰٤۱۱-۳۳٦٤۰۳۸، نمابر: ۰٤۱۱-۳۳٦۳۲۳۱

**Corresponding Author: Mohammad-Reza Rashidi, Professor, Faculty of Pharmacy and Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. Tel: +98-411-3364038; Fax: +98-411-3363231; E-mail: rashidi@tbzmed.ac.ir*

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

هایپراوریسمی اختلال متابولیکی شایعی است که همراه با افزایش غیر طبیعی سطح سرمی اسید اوریک می باشد. این بیماری در ارتباط با بروز اختلال در مسیر متابولیسم پورینهاست و یکی از ریسک فاکتورهای مهم نقرس و بیماریهای ناشی از استرس اکسیداتیو مثل سرطان و بیماریهای قلبی-عروقی به شمار می رود (۱). بر اساس گزارش مطالعات اپیدمیولوژیک شیوع هایپراوریسمی در جوامع ٪۳۰-۵ می باشد (۲). کنترل تولید اسیداوریک مهمترین عامل پیشگیری کننده و درمان کننده هایپراوریسمی است (۳). گزانتین اکسیداز/گزانتین دهیدروژناز کبدی آنزیم کلیدی مسیر کاتابولیسم پورین هاست که واکنش اکسیداسیون هیپوگزانتین به گزانتین و گزانتین به اسیداوریک را کاتالیز می کند. فرم فعال آنزیم در شرایط فیزیولوژیک گزانتین دهیدروژناز (XDH) است ولی در شرایط پاتولوژیک همزمان با تجزیه ATP به آدنین و گزانتین، گزانتین دهیدروژناز به گزانتین اکسیداز (XO) تبدیل می شود. آنزیم اخیر همزمان با تولید اسیداوریک منجر به تولید رادیکالهای آزاد سوپر اکسید و پراکسید می شود و بنابراین XO یکی از منابع عمده تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) محسوب می گردد(٤). داروی آلوپورینول تنها مهار کننده این آنزیم است که موارد مصرف بالینی دارد؛ این دارو به عنوان مهمترین داروی کاهنده اسیداوریک در طی چهار دهه گذشته در درمان هایپراوریسمی و نقرس مورد استفاده بوده است. متأسفانه مصرف این دارو موجب بروز برخی اثرات جانبی مخرب مثل واکنش های آلرژیک، عدم تحمل گوارشی و اختلالات سیستم اعصاب مرکزی در بیماران می شود و لذا استفاده از آن در طب با محدودیت هایی رو به رو است(۱،۲،۵). لذا با توجه به اثرات جانبی متعدد آلوپورینول از سالها پیش جستجو برای کشف عوامل درمانی جایگزین یا تکمیلی با منشاء گیاهی که دارای خاصیت درمانی بیشتر و عوارض جانبی کمتر باشند، توجه بسیاری از محققان را به خود معطوف داشته است. مطالعات in vitro متعددی حاکی از اثرات مهار کنندگی برخی از فیتوکمیکالهای موجود در مواد غذایی مثل فلاونوئیدها بر فعالیت گزانتین اکسیداز/گزانتین دهیدروژناز می باشند(۷-۵). فلاونوئیدها ترکیبات پلی فنلی هستند که در منابع گیاهی یافت می شوند و بر اساس تفاوتهای ساختمانی شان به زیرگروههای متعددی تقسیم می شوند که عبارتند از: فلاونولها، فلاونها، فلاوانونها، کاتچینها، آنتوسیانیدینها و ایزوفلاونها(۸). بنابراین درمان ترکیبی با استفاده از فلاونوئیدهای رژیمی و دوزهای پایینتر داروهای مورد استفاده به منظور به حداقل رساندن عوارض جانبی مخرب ناشی از آنها، می تواند یکی از راهکارهای امیدبخش برای درمان هایپراوریسمی و عوارض مرتبط با آن باشد. کرستین و کامفرول از جمله مهمترین ترکیبات فلاونوئیدی هستند که توزیع فراوانی در منابع غذایی گیاهی مثل پیاز، سبزیجات برگدار، سبزیجات ریشه ای، سیب، چای و غیره دارند. از لحاظ ساختمانی این ترکیبات متعلق به گروه فلاونولها بوده و دارای طیف وسیعی از اثرات بیوشیمیایی و فارماکولوژیک می باشند (۸،٦). بر اساس مطالعات انجام یافته، مکانیسم اثرات بیولوژیک این ترکیبات مربوط به خواص آنتی اکسیدانی، توانایی scavenging رادیکالهای آزاد و مهار فعالیت آنزیمهای کلیدی مسیرهای متابولیکی می باشد(۷،٦). بر این اساس، هدف از تحقیق حاضر بررسی in vivo اثر کرستین و کامفرول در مقایسه با آلوپورینول بر سطح سرمی اسیداوریک، بیومارکرهای استرس اکسیداتیو (ظرفیت توتال آنتی اکسیدانی و میزان پراکسیداسیون لیپیدی) و فعالیت کبدی آنزیم گزانتین اکسیداز/گزانتین دهیدروژناز در موش صحرایی نرمال و هایپراورسمیک می باشد.

۲- مواد و روشها

۲-۱: مواد:

کرستین، کامفرول، پتاسیم اکسونات، گزانتین، نیکوتین آمیدآدنین دی نوکلئوتید (NAD^+)، اسیداوریک، آلوپورینول، تترااتوکسی پروپان، تری کلرواستیک اسید، تیوباربیتوریک اسید، ٦-مرکاپتوپورین، کیت Bicinchoninic acid و کیت FRAP از شرکت Sigma (Steinheim, Germany) خریداری شد. حلالهای مورد استفاده در سیستم HPLC از شرکت Merk (Darmstadt, Germany) خریداری شد.

۲-۲: حیوانات

موش های صحرایی نر آلبینو از نژاد Wistar، با محدوده وزنی ۲۰۰-۱۸۰ g در گروههای ٦ تایی در قفس های استاندارد، در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی- تاریکی در دمای معمول آزمایشگاه (۳ ±

Archive of SID

www.SID.ir

۲۲ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند و تا زمان انجام آزمایش آزادانه به آب و غذای کافی دسترسی داشتند.

۳-۲: نحوه هایپراورسمیک کردن موش های صحرایی

به منظور ایجاد مدل حیوانی هایپراورسمیک از مهار کننده آنزیم اوریکاز یعنی پتاسیم اکسونات استفاده شد (۹). داروی مذکور به صورت تزریق داخل صفاقی ۱ بار در روز و دقیقا ۱ ساعت قبل از گاواژ ماده غذایی مورد آزمایش در روزهای اول، هفتم و چهاردهم به حیوانات تزریق گردید.

٤-۲: طراحی مطالعه

حیوانات مورد مطالعه به طور تصادفی به ۸ گروه ٦ تایی شامل گروه۱: نرمال؛ گروه۲: نرمال + کرستین (۵ mg/kg)؛ گروه۳: نرمال + کامفرول (۵ mg/kg)؛ گروه٤: نرمال + آلوپورینول (۵ mg/kg)؛ گروه۵: هایپراورسمیک؛ گروه٦: هایپراورسمیک + کرستین (۵ mg/kg)؛ گروه۷: هایپراورسمیک + کامفرول (۵ mg/kg)؛ گروه۸: هایپراورسمیک + آلوپورینول (۵ mg/kg) تقسیم شدند. ترکیبات مورد آزمایش روزانه یکبار و به مدت ١٤ روز به حیوانات گروههای مربوطه گاواژ گردید. لازم به ذکر است کرستین و کامفرول قبل از گاواژ در پروپیلن گلیکول و آلوپورینول در نرمال سالین۰/۹٪ حل شدند.

۵-۲: آماده سازی نمونه های سرم و کبد

قبل از شروع مداخلات مربوطه و همچنین در طی روزهای اول و هفتم و چهاردهم مداخله، یک ساعت بعد از گاواژ ترکیب مورد آزمایش از همه گروههای مورد مطالعه یک نمونه خون گرفته شد و سرم آن جدا شد. نمونه های سرم تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

در پایان دوره مداخله حیوانات به وسیله اتر بیهوش شده و کبد آنها با باز نمودن حفره شکمی بلافاصله خارج و سپس با محلول نرمال سالین۰/۹٪ شستشو داده شد. پس از جدا نمودن صفرا و لایه های چربی، کبد باقی مانده توزین و به صورت تکه های کوچک خرد و سپس ۵ حجم بافر سدیم پیروفسفات ۸۰ mM (PH=۷/٤) به آن اضافه و با استفاده از دستگاه هموژنایزر هموژنیزه شد. مخلوط هموژن شده سپس با استفاده از سانتریفوژ یخچال دار در ٦۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد . لایه لیپیدی به دقت حذف و فراکسیون شناور باقی مانده مجددا در ۱۲۰۰۰g به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. محلول شناور بالایی که محتوی فراکسیون کبدی می باشد برای ارزیابی فعالیت آنزیم گزانتین اکسیداز/ گزانتین دهیدروژناز کبدی تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد .

٦-۲: اندازه گیری سطح اسید اوریک سرم

مقادیر اسید اوریک نمونه های سرم در روز قبل از مداخله و روز اول ، هفتم و چهاردهم مداخله (٤ مرحله)به روش HPLC و با استفاده از ستون C_{18} column {Perfectsil Target ODS-3 (5 µM), 250*4.6 mm} و با استفاده از فاز متحرک KH_2PO_4(10 mili molar):Methanol 97:3 و با سرعت جریان ۱ml/min و با استفاده از UV دتکتور در طول موج ۲۹۰ nm اندازه گیری شد. به عنوان استاندارد داخلی (internal standard) از ٦- مرکاپتوپورین با غلظت ۵۰ µM استفاده شد. مقادیر مربوطه به صورت µM گزارش گردید. پروتئین نمونه های سرمی قبل از تزریق به سیستم HPLC به کمک متانول رسوب داده شد.

۷-۲: ارزیابی فعالیت آنزیم گزانتین اکسیداز/ گزانتین دهیدروژناز کبدی

فعالیت آنزیم گزانتین اکسیداز/ گزانتین دهیدروژناز کبدی به وسیله کنترل تشکیل اسید اوریک با استفاده از روش اسپکتروفتومتری ارزیابی شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات ۵۰ µM (PH=۷/۵) و ۱۰۰ µl هموژن کبدی بود. برای ارزیابی فعالیت XDH ، NAD^+ ۲۰۰ µM نیز به محیط اضافه شد. بعد از آنکوباسیون اولیه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ °c واکنش با افزودن ۰/۵ ml گزانتین ۵۰µM شروع شد و بعد از ۱۰ دقیقه واکنش با افزودن ۰/۵ ml HCL (M ۰/٦) متوقف گردید. سپس جذب محلول در ۲۹۰ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر UV اندازه گیری گردید. فعالیت آنزیم XDH/XO به صورت nmol/min/mg-protein بیان و هر آزمایش ۲ بار انجام شد.

۸-۲: اندازه گیری غلظت پروتئین فراکسیون کبدی

غلظت پروتئین فراکسیون کبدی با استفاده از کیت Pierce Bicinconinic Acid (BCA) و روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری گردید (۱۰).

۹-۲: ارزیابی ظرفیت توتال آنتی اکسیدانی سرم

Archive of SID

www.SID.ir

برای ارزیابی ظرفیت توتال آنتی اکسیدانی از کیت FRAP (Reducing Ability of Plasma) استفاده شد (۱۱). ظرفیت توتال آنتی اکسیدانی سرم بر حسب µM بیان شد.

۱۰-۲: ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدی

جهت ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدی، سطح مالون دی آلدهید سرم به عنوان مهمترین شاخص پراکسیداسیون لیپیدی به روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد (۱۲). غلظت MDA برحسب µM گزارش شد.

۱۱-۲: تجزیه و تحلیل آماری

کلیه داده ها به صورت Mean ± SD بیان شده و تفاوتهای موجود بین هریک از گروههای مداخله (تحت درمان با کرستین، کامفرول و آلوپورینول) با گروه نرمال و گروه هایپراورسمیک (کنترل بیمار) با آزمون آماری Independent sample T-test بررسی شدند. مقادیر (p<۰/۰۵) معنی دار تلقی گردید.

۳- نتایج

همانگونه که در جدول شماره ۱ مشاهده می شود تجویز خوراکی کرستین و کامفرول به مدت ۱٤ روز موجب کاهش معنی دار سطح اسیداوریک سرم در گروههای هایپراورسمیک شد (p<۰/۰۰۱) ، ولی در گروههای نرمال کاهش مشاهده شده از نظر آماری معنی دار نبود (p>۰/۰۵). در مقابل، تجویز آلوپورینول پس از ۱٤ روز توانست سطح سرمی اسیداوریک را به طور معنی داری هم در موشهای صحرایی نرمال (p<۰/۰۱) و هم در موشهای صحرایی هایپراورسمیک (p<۰/۰۰۱)کاهش دهد. نتایج همچنین نشان می دهد که اثر هایپواورسمیک کرستین و کامفرول در موشهای صحرایی هایپر اورسمیک وابسته به زمان بود.

اثر تجویز خوراکی کرستین و کامفرول در مقایسه با آلوپورینول بر فعالیت آنزیم گزانتین اکسیداز/گزانتین دهیدروژناز کبدی پس از ۱٤ روز در جدول شماره ۲ خلاصه شده است. نتایج نشان می دهد که در گروههای نرمال درمان شونده با کرستین و کامفرول، فعالیت گزانتین دهیدروژناز به طور معنی داری کاهش یافت (به ترتیب ۱۷/۱۰٪ (p<۰/۰۵) و ۱۹/۲۱٪ (p<۰/۰۵)، ولی کاهش مشاهده شده در فعالیت گزانتین اکسیداز در این گروهها از لحاظ آماری معنی دار نبود (p>۰/۰۵). در مقابل آلوپورینول توانست به طور معنی داری فعالیت هر دو آنزیم فوق را در موشهای صحرایی نرمال مهار کند[به ترتیب ۶۱/۳۱٪ (p<۰/۰۰۱) و ۵۳/۲۰٪ (p<۰/۰۰۱)]. در گروههای هایپراورسمیک، درمان با کرستین و کامفرول منجر به کاهش معنی دار فعالیت آنزیمهای فوق گردید. درصد مهار آنزیم گزانتین دهیدروژناز و گزانتین اکسیداز در گروه هایپراورسمیک درمان شونده با کرستین به ترتیب ٤۱/۸۸٪ (p<۰/۰۰۱) و ۳٤/۵۳٪ (p<۰/۰۱) و در گروه هایپراورسمیک درمان شونده با کامفرول به ترتیب ٤۱/۶۲٪ (p<۰/۰۰۱) و ۳۱/۳۲٪ (p<۰/۰۵) بود.

در نمودار شماره ۱ اثر تجویز خوراکی کرستین و کامفرول در مقایسه با آلوپورینول بر ظرفیت توتال آنتی اکسیدانی سرم نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود درمان با کرستین و کامفرول موجب افزایش معنی دار ظرفیت توتال آنتی اکسیدانی سرم در گروههای نرمال و هایپراورسمیک شده است، ولی این افزایش در گروههای نرمال از لحاظ آماری معنی دار نبود (p>۰/۰۵). همچنین اثر دریافت آلوپورینول بر افزایش ظرفیت توتال آنتی اکسیدانی سرم در هیچیک از گروهها معنی دار نبود (p>۰/۰۵).

اثر تجویز خوراکی کرستین و کامفرول در مقایسه با آلوپورینول بر سطح مالون دی آلدهید سرم پس از ۱٤ روز در نمودار شماره ۲ خلاصه شده است. همانطور که نمودار ۲ نشان می دهد سطح سرمی مالون دی آلدهید، به عنوان بیومارکر پراکسیداسیون لیپیدی، در گروه هایپراورسمیک کنترل به طور معنی داری بالاتر از سطح سرمی آن در گروه نرمال بود (p<۰/۰۰۱). درمان با کرستین و کامفرول موجب کاهش معنی دار سطوح افزایش یافته MDA در این حیوانات شد (p<۰/۰۵)، ولی نتوانست مقادیر آن را به حد نرمال برساند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. **اثر تجویز خوراکی کرسنین و کامفرول در مقایسه با آلوپورینول بر سطح اسیداوریک سرم موشهای صحرایی نرمال و هایپراوریسمیک**

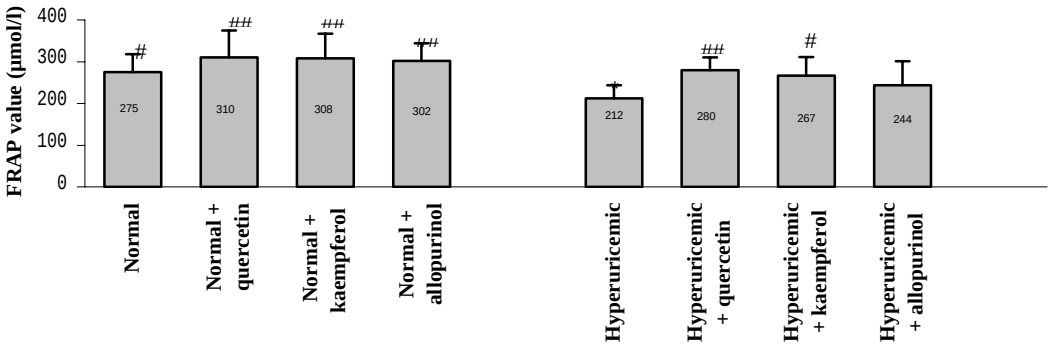
گروه	غلظت اسیداوریک سرم (µM)		
	روز اول	روز هفتم	روز چهاردهم
نرمال	###۹۸/۰۹ ±۱۵/۸۰	###۹۶/۳۱ ± ۱٤/۰۱	###۹۹/۸۷ ±۱۷/٤٤
نرمال+کرسنین(۵ mg/kg)	###۹۸/۲۹ ±۱۲/۲۲	###۹۵/٦۲ ±۱٦/۱۹	###۹٤/۸۲± ۱۵/۷۲
نرمال+کامفرول(۵ mg/kg)	###۹۷/۸۵ ±۱۵/۸۷	###۹٦/٦۰ ±۱۱/۱۱	###۹٤/۹۱ ±۱۰/۸۷
نرمال+آلوپورینول(۵ mg/kg)	###۹۰/۲۹ ±۲۰/٤۲	* و ###۸۱/۲۸ ±۱۰/۸٦	** و ###۵۳/۰۳ ± ۹/۳۹
هایپراورسمیک (کنترل)	***۲۰۷/۱٤± ۳۳/٤۱	***۲۱/٤۷ ±۳٤/٦۳	***۲۱٤/۳٦± ۲٦/٤۲
هایپراوریسمیک+کرسنین(۵ mg/kg)	***۱۰۹/۰۵ ±۲٦/٤٦	*** و #۱٦۸/۲۹±۱۵/٦٦	* و ###۱۲۵/۰۸ ±۱۸/۱٦
هایپراوریسمیک+کامفرول(۵ mg/kg)	***۲۰۵/۲۸ ±۳۰/۷۸	***۱۷۷/۷۵± ۲۵/۳۳	** و ###۱۳۸/۷۷ ± ۲۲/٦٤
هایپراوریسمیک+آلوپورینول(۵ mg/kg)	*** و ##۱٤۸/۰۵± ۳۱/٦۱	###۱۱٤/۱٦ ±۲۵/٦۲	* و###۷۲/۳۸ ±۱۹/۲٤

داده ها به صورت Mean ± SD بیان شده اند (n=٦). * معادل (p<۰/۰۵)، ** معادل (p<۰/۰۱) ، * معادل (p<۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه نرمال و # معادل (p<۰/۰۵) ، ## معادل (p<۰/۰۱)، ### معادل (p<۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه هایپراورسمیک می باشد.**

جدول ۲. **اثر تجویز خوراکی کرسنین و کامفرول در مقایسه با آلوپورینول بر فعالیت کبدی آنزیم گزانتین اکسیداز/گزانتین دهیدروژناز موشهای صحرایی نرمال و هایپراوریسمیک**

گروه	فعالیت آنزیمی (nmol/mg/min)		درصد مهار (٪)	
	گزانتین اکسیداز	گزانتین دهیدروژناز	گزانتین اکسیداز	گزانتین دهیدروژناز
نرمال	۲/۵۰ ±۰/٦۳	۳/۸۰ ±۰/۳۸	–	–
نرمال+کرسنین(۵ mg/kg)	۲/۳۲ ±۰/۳۱	* ۳/۱۵± ۰/٤٦	۷/۲۰	۱۷/۱۰
نرمال+کامفرول(۵ mg/kg)	۲/۳۹± ۰/۲٦	# و* ۳/۰۷ ±۰/٤۲	٤/٤۰	۱۹/۲۱
نرمال+آلوپورینول(۵ mg/kg)	### و*** ۱/۱۷ ±۰/۲۸	### و*** ۱/٤۷ ±۰/٤۰	۵۳/۲۰	٦۱/۳۱
هایپراورسمیک	۲/٤۹ ±۰/۵۲	۳/۸۲± ۰/٦۲	–	–
هایپراوریسمیک+کرسنین(۵ mg/kg)	## و* ۱/٦۳ ±۰/۳۹	### و*** ۲/۲۲± ۰/۳۸	۳٤/۵۳	٤۱/۸۸
هایپراوریسمیک+کامفرول(۵ mg/kg)	# و * ۱/۷۱± ۰/۳۷	### و*** ۲/۲۳± ۰/۵۱	۳۱/۳۲	٤۱/٦۲
هایپراوریسمیک+آلوپورینول(۵ mg/kg)	### و*** ۱/۰۵± ۰/۱۸	### و*** ۱/۲۷ ±۰/۳۳	۵۷/۸۳	٦٦/۷۵

داده ها به صورت Mean ± SD بیان شده اند (n=٦). * معادل (p<۰/۰۵) و ** معادل (p<۰/۰۱) ، * معادل (p<۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه نرمال و # معادل (p<۰/۰۵) ، ## معادل (p<۰/۰۱) ، ### معادل (p<۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه هایپراورسمیک می باشد.**

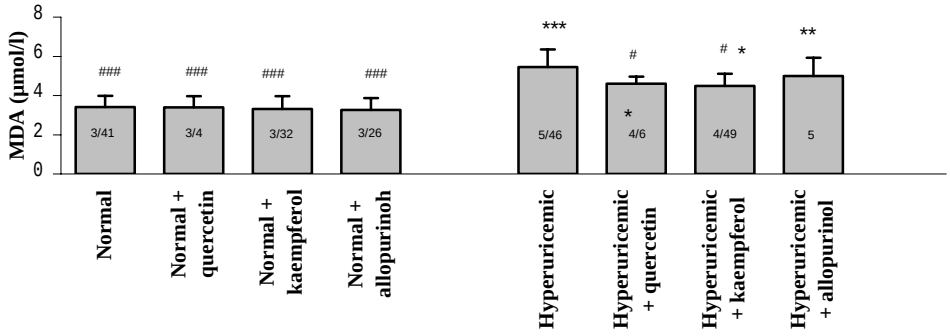


نمودار ۱. **اثر تجویز خوراکی کرسنین و کامفرول در مقایسه با آلوپورینول بر ظرفیت توتال آنتی اکسیدانی سرم پس از ۱٤ روز (Mean ± SD, n=6).**

*** معادل (p<۰/۰۵) در مقایسه با گروه نرمال؛ # معادل (p<۰/۰۵) و ## معادل (p<۰/۰۱) در مقایسه با گروه هایپراورسمیک می باشد.**

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۲. اثر تجویز خوراکی کرستین و کامفرول در مقایسه با آلوپورینول بر غلظت مالون دی آلدهید سرم پس از ١٤ روز (Mean ± SD, n=6).
*** معادل (p<۰/۰۵) و ** معادل (p<۰/۰۱) ، *** معادل (p<۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه نرمال؛ # معادل (p<۰/۰۵) ، ## معادل (p<۰/۰۱) ، ### معادل (p<۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه هایپراورسمیک می باشد.**

٤- بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که تجویز خوراکی کرستین و کامفرول در دوزهای مورد استفاده اثرات هایپواورسمیک قابل ملاحظه ای در in vivo دارد. شدت اثرات کاهش دهندگی اسیداوریک در گروههای هایپراورسمیک درمان شونده با این فلاونوئیدها بیشتر از گروههای نرمال بود. Kong و همکاران نیز نشان دادند که عصاره آبی Ermiao wan (نوعی گیاه دارویی که در چین برای درمان بیماری نقرس به کار می رود) و آلوپورینول در گروههای نرمال اثر کمتری بر کاهش سطح اسیداوریک در مقایسه با گروههای هایپراورسمیک داشت (۱۳).

مقایسه اثرات هایپواورسمیک آلوپورینول - به عنوان مهمترین داروی کاهش دهنده اسیداوریک- با کرستین و کامفرول نشان می دهد که هم در گروههای نرمال و هم در گروههای هایپراورسمیک اثر آلوپورینول در مقایسه با کرستین و کامفرول بیشتر بود. همانطور که در جدول شماره ۱ نشان داده شد در گروهای نرمال تجویز کرستین و کامفرول به مدت ١٤ روز تغییری در سطح سرمی اسیداوریک آنها ایجاد نکرد. همچنین در گروههای هایپراورسمیک تحت درمان با کرستین و کامفرول نیز هرچند اثرات هایپواورسمیک مشاهده شده پس از ١٤ روز معنی دار بود ولی در مقایسه با اثرات هایپواورسمیک آلوپورینول شدت کمتری داشت؛ به طوریکه آلوپورینول توانست در طی مدت مشابه سطح سرمی اسیداوریک را در هر دو گروه هایپراورسمیک و نرمال به کمتر از حد نرمال کاهش داد. عدم بروز اثر هایپواورسمیک کرستین و کامفرول در گروههای نرمال را می توان یک مزیت برای این فلاونوئیدها به شمار آورد. زیرا همانطور که می دانیم اسیداوریک دارای فعالیت دوگانه پرواکسیدانی/آنتی اکسیدانی می باشد و هرچند که افزایش سطح سرمی اسیداوریک موجب هایپراوریسمی و پیامدهای اکسیداتیو ناشی از آن می شود (١٤)، ولی در عین حال اثرات آنتی اکسیدانی آن ومخصوصا جلوگیری از آسیب دیدگی مولکولهای اسیدهای نوکلئیک نیز به خوبی ثابت شده است (۱۵). بنابراین کاهش بیش از حد آن (مقادیر کمتر از محدوده نرمال)، ممکن است به دلیل ایجاد اختلال در فعالیت آنتی اکسیدانی اسیداوریک، برای سلولها و بافتهای بدن مضر باشد. به این ترتیب با توجه به نتایج به دست آمده، تصور می شود که کرستین و کامفرول نسبت به آلوپورینول اثرات جانبی کمتری داشته باشند.

از سوی دیگر همانطور که در جدول شماره ۱ می بینیم الگوی تغییرات سطح اسیداوریک سرم در گروههای هایپراورسمیک درمان شونده با کرستین و کامفرول وابسته به زمان بود. به این ترتیب که در موشهای صحرایی هایپراورسمیک درمان شونده با کرستین کاهش سطح اسید اوریک در روز اول مداخله معنی دار نبود، ولی در روز هفتم و چهاردهم مداخله کاهش مشاهده شده از لحاظ آماری معنی دار بود [به ترتیب (p<۰/۰۵) و (p<۰/۰۰۱)] و در گروه موشهای صحرایی هایپراورسمیک درمان شونده با کامفرول تنها پس از طی ١٤ روز از انجام مداخله سطح اسیداوریک به طور معنی داری کاهش یافت (p<۰/۰۰۱) ؛ این در حالی است که اثر هایپواورسمیک آلوپورینول در موشهای صحرایی هایپراورسمیک حتی

Archive of SID

www.SID.ir

در روز اول مداخله معنی دار بود که حاکی از اثر هایپواورسمیک مستقل از زمان و شروع سریعتر اثر آلوپورینول در مقایسه با کرستین و کامفرول می باشد.

در تحقیق حاضر اثر مهارکنندگی کرستین و کامفرول بر فعالیت گزانتین اکسیداز/گزانتین دهیدروژناز در شرایط in vivo مورد تأیید قرار گرفت. گزانتین اکسیداز/گزانتین دهیدروژناز از جمله مهمترین آنزیمهای شرکت کننده در کاتابولیسم پورینهاست که در تولید اندوژن اسیداوریک نقش به سزایی دارد. ترکیبات فلاونوئیدی به دلیل شباهت ساختمانی با سوبستراهای آنزیم گزانتین اکسیداز/گزانتین دهیدروژناز به جایگاه فعال آنزیم متصل و موجب مهار فعالیت آن می گردند(۲). Lin و همکاران در سال ۲۰۰۲ ارتباط بین ساختمان و فعالیت (SAR)[1] فلاونوئیدها را در in vitro مورد مطالعه قرار دادند. آنها نشان دادند که در بین ترکیبات فلاونوئیدی، بیش از همه فلاونولها اثر مهاری بر فعالیت گزانتین اکسیداز دارند (٦). بنابراین بخش عمده ای از اثرات هایپواورسمیک ناشی از کرستین و کامفرول در مطالعه حاضر را می توان به اثر مهاری آنها بر فعالیت گزانتین اکسیداز/گزانتین دهیدروژناز نسبت داد. البته اثر مهاری آلوپورینول، به عنوان مهمترین مهار کننده آنزیم گزانتین اکسیداز، بیشتر از اثرات مهاری فلاونوئیدهای مذکور در دوزهای مورد استفاده بود. نتایج مشابهی توسط سایر محققان گزارش شده است(١٦-١٨). بر اساس این مطالعات مکانیسمهای دیگری همچون افزایش کلرانس اسیداوریک و یا مهار دیگر آنزیمهای متابولیزه کننده پورینها ممکن است در ایجاد بخشی از اثرات هایپواورسمیک مشاهده شده کرستین و کامفرول نقش داشته باشد. از سوی دیگر به نظر می رسد اثرات مهاری کرستین و کامفرول بر فعالیت گزانتین اکسیداز/گزانتین دهیدروژناز در موشهای صحرایی هایپراورسمیک بیشتر از موشهای صحرایی نرمال باشد (جدول شماره ۲). Zhao و همکاران در مطالعه ای که در سال ۲۰۰٦ در مورد اثرات هایپواورسمیک Cassia Oil انجام دادند، نتایج مشابهی گزارش کردند (۱۷).

از سوی دیگر در این تحقیق وضعیت هایپراوریسمی در ارتباط با افزایش سطح استرس اکسیداتیو بود. به طوری که سطح اسیداوریک با غلظت مالون دی آلدهید ارتباط مثبت (p= ۰/۰۰۰ ، r=۰/٦٥) و با سطح توتال آنتی اکسیدانی ارتباط منفی (p= ۰/۰۰۰ ، r=۰/٥٥) داشت. تصور می شود کاهش مشاهده شده در ظرفیت توتال آنتی اکسیدانی سرم و افزایش مشاهده شده در سطح مالون دی آلدهید سرم در گروه هایپراورسمیک کنترل مربوط به تزریق داخل صفاقی پتاسیم اکسونات می باشد این ترکیب موجب مهار انتخابی آنزیم اوریکاز و در نتیجه افزایش سطح اسیداوریک می گردد(۹). همانگونه که قبلا اشاره شد هرچند اسیداوریک در غلظتهای طبیعی و در شرایط فیزیولوژیک نرمال به عنوان آنتی اکسیدان عمل می کند و موجب جلوگیری از آسیبهای اکسیداتیو مولکولی می گردد ولی در عین حال، افزایش تولید اسیداوریک در شرایط پاتولوژیک به دلیل افزایش تبدیل فرم گزانتین دهیدروژناز به فرم گزانتین اکسیداز، در ارتباط با افزایش تولید رادیکالهای آزاد می باشد که این مسأله نقش مهمی در پیشرفت استرس اکسیداتیو دارد(١٤). اخیرا ثابت شده است که گزانتین اکسیداز یکی از منابع مهم تولید رادیکالهای آزاد می باشد. این مسأله به درک ارتباط مثبت میان هایپراوریسمی و بیماریهای ناشی از استرس اکسیداتیو کمک می کند. به علاوه افزایش اسیداوریک سرم موجب اکسیژناسیون ذرات LDL-C می گردد و به این ترتیب پراکسیداسیون لیپیدی را تسهیل می کند(٤).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که تجویز خوراکی کرستین و کامفرول در دوزهای مورد استفاده اثرات آنتی اکسیدانی (افزایش ظرفیت توتال آنتی اکسیدانی و کاهش سطح پراکسیداسیون لیپیدی) قابل ملاحظه ای در in vivo دارد. البته لازم به ذکر است که اثرات آنتی اکسیدانی کرستین و کامفرول در گروههای هایپراورسمیک بیشتر از گروههای نرمال بود. به نظر می رسد کرستین و کامفرول عمدتا بر ظرفیت کاهش یافته توتال آنتی اکسیدانی سرم و سطوح افزایش یافته مالون دی آلدهید در شرایط هایپراوریسمی مؤثرند و قادرند تغییرات اکسیداتیو ناشی از هایپراوریسمی را متوقف نمایند. مطالعات متعدد نشان می دهند که فلاونوئیدها به دلیل دارا بودن عوامل OH متعدد در ساختمانشان، توانایی خنثی کردن رادیکالهای اکسیژن آزاد و جلوگیری از آسیبهای اکسیداتیو در in vitro و in vivo دارند(٦،٨). بر خلاف کرستین و کامفرول، درمان با آلوپورینول با دوز مشابه نتوانست به طور معنی داری بیومارکرهای

Archive of SID

www.SID.ir

استرس اکسیداتیو را در حیوانات مورد مطالعه بهبود بخشد. با اینحال Lee و همکاران گزارش کردند که مهار آنزیم گزانتین اکسیداز به وسیله آلوپورینـــول می تواند تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن و آسیبهای کبدی مرتبط با آن را کاهش دهد (۱۹). به نظر می رسد تفاوت مشاهده شده در نتایج به علت استفاده از دوز mg/kg ۵۰ آلوپورینول در مطالعه Lee و همکاران در مقایسه با دوز mg/kg ۵ آلوپورینول در مطالعه حاضر باشد.

۵- نتیجه گیری

با توجه به اینکه تا کنون هیچگونه علائم مسمومیت ناشی از مصرف خوراکی کرستین و کامفرول در دوزهای به کار رفته گزارش نشده است، می توان در آینده از این فلاونوئیدها و مواد غذایی غنی از آنها به عنوان آلترناتیو احتمالی برای آلوپورینول یا حداقل در ترکیب با آلوپورینول برای به حداقل رساندن عوارض جانبی ناشی از آن بهره برد. بدیهی است لزوم تحقیقات وسیعتر در مورد بررسی کینتیک پلاسمایی، تعیین دوز اپتیمم و سایر اثرات بیولوژیک این ترکیبات در نمونه های انسانی به چشم می خورد.

٦- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در تأمین هزینه های مالی این پژوهش سپاسگزاری می نماید.

References:

1. Strazzullo P., Puig J.G. Uric acid and oxidative stress, Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases, 2007, 17(6): 409-414.
2. Mo S.F., Zhou F., Lv Y.Z., Hu Q.H., Zhang D.M., Kong L.D. Hypouricemic action of selected flavonoids in mice: structure–activity relationships, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2007, 30(8): 1551-1556.
3. Liote F. Hyperuricemia and gout, Current Rheumatological Reports, 2003, 5: 227-234.
4. Maia L., Duarte R.O., Freire A.P., Moura J.J.G., Mira L. NADH oxidase activity of rat and human liver xanthine oxidoreductase: potent role in superoxide production, Journal of Biological & Inorganic Chemistry, 2007, 12: 777-787.
5. Nguyen M.T.T., Awale S., Tezuka Y., Tran Q.L., Watanabe H., Kadota S. Xnthine oxidase inhibitory activity of Vietnames medicinal plants, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2004, 27(9): 1414-1421.
6. Potapovich A.I., Kostyuk V.A. Comparative study of antioxidant properties and cytoprotective activity of flavonoids, Biochemistry, 2003, 68(5): 514-519.
7. Lin C.M., Chen C.S., Chen C.T., Liang Y.C., Lin J.K. Molecular modeling of flavonoids that inhibits XO, Biochemistry and Biophysics Research Communication, 2002, 294(1): 167–172.
8. Kinoshita T., Lepp Z., Kawai Y., Terao J., Chuman H. An integrated database of flavonoids, Biofactors, 2006, 26(3): 179-188.
9. Hall I.H., Scoville J.P., Reynolds D.J., Simlot R., Duncan P. Substituted cyclic imides as potential anti-gout agents, Life Science, 1990, 46(26): 1923-1927.
10. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk C. Measurement of protein using bicinchoninic acid, Analytical Biochemistry, 1985, 150(1): 76-85.
11. Benzie I.F., Strain J.J. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay, Analytical Biochemistry, 1996, 239: 70–76.
12. Yoshioka T., Kawada K., Shimada T., Mori M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood, American Journal of Obstetric Gynecology, 1979, 135(3): 372-376.
13. Kong L.D., Yang C., Ge F., Wang H.D., Song Guo Y. A Chinese herbal medicine Ermiao wan reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice, Journal of Ethnopharmacology, 2004, 93(2-3): 325–330.
14. Nuki G. Gout, Medicine, 2006, 34(10): 417-423.
15. Stinefelt B., Leonard S.S., Blemings K.P., Shi X., Klandorf H. Free radical scavenging, DNA protection, and inhibition of lipid peroxidation mediated by uric acid, Annals of Clinical and Laboratory Science, 2005, 35(1): 37-45.
16. Wang Y., Zhu J.X., Kong L.D., Yang C., Cheng C.H.K., Zhang X. Administration of procyanidins from grape seed reduces serum uric acid levels and decreases hepatic xanthine dehydrogenase/oxidase activities in oxonate-treated mice, Basic Clinical and Pharmacological Toxicology, 2004, 94(5): 232-237.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Zhao X., Zhu J.X., Mo S.F., Pan Y., Kong L.D. Effects of cassia oil on serum and hepatic uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver, Journal of Ethnopharmacology, 2006, 103(3): 357–365.
18. Zhu J.X., Wang Y., Kong L.D., Yang C., Zhang X. Effects of Biota orientalis extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver, Journal of Ethnopharmacology, 2004, 93(1): 133-140.
19. Lee Y.W., Lee M.S. Synergistic protective effect of ischemic preconditioning and allopurinol on ischemia/reperfusion injury in rat liver, Biochemistry and Biophysics Research Communication, 2006, 349(3): 1087–1093.

Archive of SID

www.SID.ir