

# بررسی اثر محافظتی کورکومین بر فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در کلیه موش صحرایی مواجهه شده با استامینوفن

مهریار زرگری<sup>۱</sup>

سعیده احمدی<sup>۲</sup>

سمانه شعبانی<sup>۳</sup>

عبدالکریم مهرورز<sup>۱</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** استامینوفن (پاراستامول) یک داروی متداول ضد درد و ضد تب است که به طور وسیع در سراسر دنیا مورد استفاده قرار می گیرد این دارو در دوزهای بالا منجر به نکرز کبدی و کلیوی در انسان و حیوان می گردد هر چند آسیب کلیوی و اختلالات حاد کلیوی می تواند بدون آسیب کبدی نیز ایجاد شود مکانیسم آسیب کلیوی برخلاف آسیب کبدی به خوبی شناخته نشده است و یکی از دلایل شایع مراجعه به اورژانس می باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر محافظتی کورکومین (curcumin)، مشتق شده از گیاه زردچوبه استامینوفن در آسیب کلیوی ایجاد شده توسط استامینوفن می باشد.

**مواد و روش ها:** این مطالعه روی موش های صحرایی نر نژاد ویستار انجام شد. استامینوفن در محلول ۵ درصد دی متیل سولفواکساید (DMSO) حل و به صورت داخل صفاقی به میزان ۱۰۰۰ mg/Kg وزن حیوان تزریق شد. کورکومین به میزان ۲۰۰ mg/kg در دی متیل سولفواکساید نیز به صورت داخل صفاقی در گروه های مربوطه تزریق گردید. حیوانات به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند. (I) گروه کنترل نرمال (II) گروه تیمار تحت تزریق با استامینوفن (III) گروه تیمار تحت تزریق با کورکومین و بعد از ۳۰ دقیقه از تزریق استامینوفن (IV) گروه تحت تزریق فقط با کورکومین (v) گروه vehicle تحت تزریق با DMSO. بعد از طی دوره زمانی ۲۴ ساعته از تزریق حیوانات، خونگیری انجام و سطح اوره و کراتینین در پلاسما اندازه گیری شد. میزان پراکسیداسیون لیپیدها و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در کلیه و ظرفیت کل آنتی اکسیدانی پلاسما سنجش شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزارهای آماری انجام شد.

**یافته ها:** تجویز استامینوفن باعث افزایش سطح مارکرها ییوشیمیایی اوره و کراتینین در پلاسما و پراکسیداسیون لیپیدها در کلیه به طور معنی داری شد، میزان فعالیت آنتی اکسیدانی های آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در بافت کلیوی کاهش یافت. استفاده از کورکومین در گروه های مواجهه یافته با استامینوفن به میزان قابل توجهی کاهش غلظت اوره، کراتینین و لیپید پراکسیداسیون را باعث گردید اما به طور قابل توجهی افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز و سوپراکسید و به ویژه ظرفیت کل آنتی اکسیدانی پلاسما را به همراه داشت.

**استنتاج:** نتایج ما نشان می دهد که کورکومین می تواند عامل حفاظتی قدرتمندی در برابر تغییرات بیوشیمیایی و آسیب اکسیداتیو ناشی از مواجهه با دوز حاد استامینوفن در موش صحرایی شود. اما مطالعات بیشتری برای تأیید این موضوع به ویژه از نظر مکانیسم بیوشیمیایی آن، قبل از کاربرد بالینی لازم است.

**واژه های کلیدی:** کورکومین، استامینوفن، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز

## مقدمه

و مؤثر به طور گسترده ای در سراسر دنیا مورد استفاده قرار می گیرد. امروزه مشخص شده است که کلیوی،

استامینوفن (N-acetyl-p-aminophenol; APAP) یا پاراستامول به عنوان یک داروی ضد درد و تب مفید

E-mail: zargari.mehryar@gmail.com

مؤلف مسئول: مهریار زرگری - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

۱. گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۱/۷/۲۲ تاریخ تصویب: ۹۱/۸/۲۲

گلو مرفولی مشخص می‌گردد (۱۱،۶). مکانیسم آسیب‌های کبدی حاصل از مصرف حاد استامینوفن به خوبی شناخته شده است ولی چگونگی آسیب کلیوی به درستی مشخص نمی‌باشد. فرایند استرس اکسیداتیو می‌تواند یک دلیل عمده این موضوع باشد که تجویز دوزهای زیاد استامینوفن با افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدها (۱۲) و کاهش میزان گلوکوتایون داخل سلولی (۱۳) در بافت کلیوی همراه می‌گردد (۱۳،۱۲).

امروزه از N-استیل سیستین (پیش ساز گلوکوتایون) به عنوان یک داروی شناخته شده در درمان مسمومیت با استامینوفن استفاده می‌شود و دارای اثرات حفاظتی بر روی آسیب کبدی می‌باشد ولی سودمندی آن به منظور ممانعت از آسیب‌های کلیوی مورد شک قرار دارد (۱۴). با توجه به اثرات آسیب زنده استامینوفن بر روی بافت کلیوی، استفاده از داروهای جدید یا ترکیبات محافظت کننده به ویژه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی حاصل از گیاهان از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. در چندین مطالعه ترکیبات مختلفی مانند ویتامین E و C، ملاتونین به منظور جلوگیری از ایجاد آسیب‌های کبدی و کلیوی توسط استامینوفن مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۷-۱۵). ترکیب کورکومین که یکی از مواد مؤثره گیاه زرد چوبه است. این گیاه یکی از اعضاء خانواده زنجبیل (Zingiberaceae) بوده که اثرات حفاظتی آن بر روی کبد مشخص گردیده است (۱۸). در مطالعات قبلی *in vitro* نشان داده شده که دارای ویژگی کاهش مقدار رادیکال سوپر اکسید (۱۹)، رادیکال هیدروکسیل (۲۰) و اکسیژن تکی (۲۱) می‌باشد. کورکومین علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیداتیو دارای خواص ضد التهابی (۲۲) می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد که این ماده می‌تواند تأثیر بهتری نسبت به سایر آنتی‌اکسیدانت‌ها در برابر استامینوفن داشته باشد.

هدف از این مطالعه بررسی اثرات حفاظتی کورکومین بر شدت آسیب کلیوی حاصل از تجویز حاد استامینوفن با سنجش مقادیر اوره و کراتینین نین پلاسمایی به عنوان مارکرهای عملکردی کلیوی،

نارسایی حاد کلیوی و یا حتی مرگ و میر در افراد و حیوانات آزمایشگاهی شود (۲،۱). شروع سمیت APAP حاصل متابولیسم دارو در کبد و بافت‌های خارج کبدی می‌باشد (۳). گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شامل هیدروژن پراکساید، سوپراکساید و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌توانند در سلول‌ها توسط چندین مکانیسم تولید شوند که یکی از آن‌ها متابولیسم دارو است. آسیب کبدی و کلیوی القاء شده توسط استامینوفن احتمالاً توسط رادیکال‌های آزاد انجام می‌شوند (۵،۴). مطالعات انجام یافته متعددی تأکید بر القای آسیب‌های اکسیداتیو توسط استامینوفن داشته که با وقایعی مانند پراکسیداسیون لیپیدهای بافتی، غیر فعال‌سازی آنزیم‌ها و تغییرات سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیداتیو آنزیمی و غیر آنزیمی داخل سلولی و وضعیت گلوکوتایون همراه می‌شود (۷،۶). در دوزهای درمانی APAP توسط پروسه گلوکونیداسیون و سولفوناسیون در کبد متابولیزه شده، باعث ایجاد متابولیک‌های محلول در آب می‌گردد که از طریق کلیه‌ها دفع می‌شوند. نتیجه تبدیل متابولیک APAP توسط سیستم آنزیمی میکروزومی P-450، ایجاد حد واسط بسیار فعال به نام N-استیل پارا بنزو کینون ایمین (NAPQI) است. این متابولیت الکتروفیل سپس توسط گلوکوتایون احیاء و به فرم مرکاپتوریک اسید دفع می‌شود (۸). در زمان بیش از حد استامینوفن ذخایر سولفات و گلوکوتایون کاهش می‌یابند و سبب هدایت آن به سوی سیستم میکروزومی P-450 و تولید مقادیر متنابعی از NAPQI به فرم غیر باند شده با گلوکوتایون می‌گردد و امکان اتصال به ماکرومولکول‌های پروتئینی سلول می‌یابند (۸). و با بهم خوردن هموستاز سلولی و ایجاد آپوپتوزیز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی)، نکروز سلولی و در نهایت اختلال عملکرد ارگان را سبب می‌شوند (۹،۱۰) و با نارسایی کلیوی ناشی از مصرف حاد استامینوفن همراه با نکروز توپول‌های کلیوی می‌باشد که با افزایش مقادیر کراتینین پلاسمایی و کاهش فیلتراسیون

TBARS شاخص محصولات پراکسیداسیون لیپیدها همراه با آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما به عنوان فاکتورهای ارزیابی کننده استرس اکسیداتیو در مدل تجربی حیوانی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه روی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی  $20 \pm 20$  گرم و سن ۸ هفته که از انستیتو پاستور خریداری شده بود، انجام شد. حیوانات در مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی در دانشکده پزشکی ساری تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، غذا و آب قرار گرفتند. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی، هنگام کار با حیوانات رعایت شد.

مواد شیمیایی مورد استفاده، شامل استامینوفن که از شرکت سیگما تهیه شد و در محلول ۵ درصد دی‌متیل سولفواکساید (DMSO) حل و به صورت داخل صفاقی به میزان  $1000 \text{ mg/Kg}$  وزن حیوان تزریق شد. کورکومین تهیه شده از شرکت سیگما به میزان  $200 \text{ mg/kg}$  محلول در دی‌متیل سولفواکساید نیز به صورت داخل صفاقی در گروه‌های مربوطه تزریق گردید. انتخاب دوز استامینوفن و کورکومین بر اساس مطالعات قبلی انجام شد (۱۷، ۱۵) دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز با خلوص بالا از شرکت مرک یا سیگما خریداری شد. از دستگاه‌های اسپکتروفتومتری SHIMADZU دو شعاعی مدل ۱۸۰۰ ساخت کشور ژاپن برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما و میزان محصولات پراکسیداسیون لیپیدها (TBARS) جهت قرائت جذب‌ها در طول موج‌های مربوطه استفاده شد. حیوانات به طور تصادفی به ۵ گروه (در هر گروه ۵ سر) تقسیم شدند. (I) گروه کنترل نرمال (II) گروه تیمار تحت تزریق با استامینوفن (III) گروه تیمار تحت تزریق

با کورکومین و بعد از ۳۰ دقیقه از تزریق استامینوفن (IV) گروه تحت تزریق فقط با کورکومین (V) گروه vehicle تحت تزریق با DMSO.

بعد از طی دوره زمانی ۲۴ ساعته از تزریق حیوانات با بیهوشی ملایم به کمک اتر از ورید اجوف تحتانی خونگیری با سرنگ هپارینه انجام و به لوله آزمایش انتقال یافت. نمونه‌ها در  $3500$  دور به مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفیوژ شد و پلاسما آن جدا و به فریزر  $-70$  انتقال داده شد. کلیه‌ها بلافاصله پس از جراحی حیوان با محلول نرمال سالین  $0/9$  درصد سرد و یخی موجود در پتری‌دیش شستشو داده می‌شد. بعد از قطعه قطعه کردن روی کاغذ صافی قرار داده تا خشک شود، سپس در میکروتیوب Label شده خالی قرار گرفته، بعد از توزین مجدد در زمان آزمایش مربوطه با استفاده از افتراق این دو عدد، وزن خالص بافت را برای هموزن کردن به دست می‌آوریم.

### سنجش محصولات پراکسیداسیون لیپیدها

$0/4 \text{ Ml}$  بافت هموزن شده به نسبت  $1:4$  بافر فسفات  $0/1$  مولار با  $\text{pH} = 7$  را برداشته، به آن  $0/2 \text{ ml}$  سدیم دو سیل سولفات  $8/1$  درصد،  $1/5 \text{ ml}$  اسید استیک  $20$  درصد ( $\text{PH} = 3.5$ )،  $1/5 \text{ ml}$  تیوباربتوریک اسید  $0/8$  درصد اضافه کرده، در نهایت این مخلوط را با  $1 \text{ ml}$  آب مقطر رقیق کرده، به مدت یک ساعت در دمای  $95$  درجه سانتی‌گراد در بن ماری گذاشته، سپس جذب لایه رویی را بعد از سانتریفیوژ در طول موج  $532 \text{ nm}$  می‌خوانیم. مقدار TBARS با استفاده از ضریب خاموشی مولی مالون دی‌آلدیید  $105 \times 1/56$  به دست آمد.

### فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بر اساس روش Mccord & Fridovich (۲۳) سنجش شد. ابتدا برای اندازه‌گیری فعالیت، مقدار کافی آنزیم زانتین اکسیداز (بدون حضور هموزنیت حاوی آنزیم SOD)

ارزیابی می‌کند. در این واکنش  $Fe^{3+}$  با اتصال به معرف TPTZ و سپس در حضور فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی پلاسما به  $Fe^{2+}$ -TPTZ تبدیل می‌شود. میزان FRAP از طریق ترسیم منحنی استاندارد جذب در مقابل غلظت یون فرو محلول استاندارد بر حسب  $\mu M/l$  به دست می‌آید.

#### اندازه‌گیری میزان پروتئین

سنجش پروتئین در هموژنیت بافتی با استفاده از معرف برادفورد و سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد انجام شد (۲۶). اساس روش برادفورد اتصال کوماسی بریلیانت بلو G250 به گروه آمین پروتونه در ریشه اسید آمینه زنجیره پلی‌پپتیدی و تغییر جذب نوری از ۴۶۵ به ۵۹۵ نانومتر می‌باشد. بعد از تهیه محلول‌های پروتئینی با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با استفاده از BSA و افزایش ۲/۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد ۰/۰۱ درصد در اتانول ۵ درصد و اسید فسفریک ۱۰ درصد در لوله‌های آزمایشی حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر BSA و مخلوط نمودن آن‌ها، جذب بعد از ۲۰ دقیقه در ۵۹۵ nm قرائت می‌شود. به کمک منحنی استاندارد ترسیم شده و مقایسه جذب هموژنیت‌های بافتی، غلظت پروتئین‌ها در آن‌ها محاسبه گردید. مقادیر اووه و کراتینین پلاسمایی توسط کیت تشخیصی شرکت زیست شیمی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج متغیرهای کمی به صورت  $Mean \pm SD$  آمد بعد از تست نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov (KS) test و یک‌نواخت بودن واریانس به کمک Levene test. با توجه به تعداد نمونه‌ها جهت مقایسه گروه‌های آزمایشی با گروه‌های کنترل و مقایسه میانگین‌ها مربوط به تأثیر کورکومین از آزمون‌های Student's t-test و ناپارامتری Mann-Whitney U-test، به شکل مناسب استفاده شد و برای بررسی ارتباط ضریب همبستگی اسپیرمن را بکار بردیم. تمام تست‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد ( $p < 0.05$ ).

در داخل کووت حاوی Reaction mixture، شامل ۰/۰۰۵ mM xanthine و ۰/۰۰۱ mM ferricytochrome c ریخته فعالیت آنزیم به مدت ۲ دقیقه در طول موج ۵۵۰ و محدوده جذب ۰ تا ۰/۱ بعد از تنظیم اندازه‌گیری شده تا مقدار آنزیم زانتین اکسیداز لازم برای ایجاد  $\Delta OD = 25$  mAbs/min به دست آید (محلول زانتین اکسیداز باید به مقدار کافی استفاده شود تا آنیون سوپر اکسید تولید شده از زانتین قدرت احیاء (III) cyt c را تا حد  $\Delta OD$  بالا دارا باشد. یک واحد آنزیم SOD، مقدار آنزیمی است که  $\Delta OD$  محلول زانتین اکسیداز را ۵۰ درصد کاهش دهد. پس از محاسبه واحد موجود در هر نمونه بر اساس تعریف با تقسیم آن بر مقدار پروتئین موجود در  $50 \mu l$  میکرو لیتر هموژنیت فعالیت مخصوص SOD بر حسب  $U/mgr$  pro محاسبه گردید.

#### فعالیت آنزیم کاتالاز

در هموژنیت به دست آمده تخریب  $H_2O_2$  و کاهش جذب به مدت ۱۵ ثانیه در ۲۴۰ nm توسط آنزیم کاتالاز در مخلوطی شامل بافر فسفات ۵۰ mM با  $pH=7$  و پراکسید هیدروژن 10 mM را می‌توان به طور مستقیم طبق متد (۱۹۸۴) Abei اندازه‌گیری نمود (۲۴). در این تحقیق از نسبت ثابت سرعت به مقدار وزن بافتی (K/gr tissue) به عنوان فعالیت مخصوص آنزیم کاتالاز استفاده شده است.

$$\begin{aligned} K &= (2.3/\Delta t) (\text{Log} A_1/A_2) \\ &= (2.3/15) (\text{Log} A_1/A_2) \\ &= 0.153 (\text{Log} A_1/A_2) \end{aligned}$$

#### اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما به روش FRAP استفاده از معرف TPTZ سنجش گردید (۲۵). این روش توانایی آنتی‌اکسیدان‌های موجود در پلاسما برای احیاء کمپلکس  $Fe^{3+}$ -TPTZ (ferric-tripiridyltriazine) به یون فرو ( $Fe^{2+}$ ) و جذب نور در طول موج ۵۹۳ nm را

## یافته‌ها

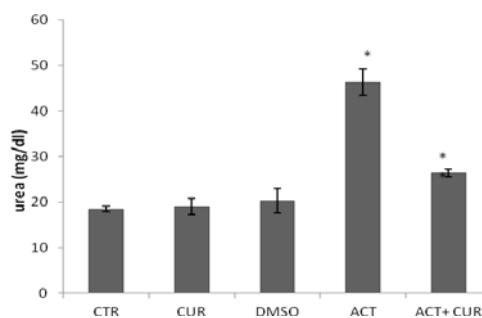
در این مطالعه اثر حفاظتی کورکومین بر شدت آسیب کلیوی ایجاد شده حاصل از مواجهه با استامینوفن از طریق ارزیابی مقادیر اوره و کراتینین به عنوان فاکتورهای نشان‌دهنده عملکرد کلیوی و برخی از مارکرهای استرس اکسیداتیو انجام شد.

### اثر کورکومین بر اوره و کراتینین پلاسمایی

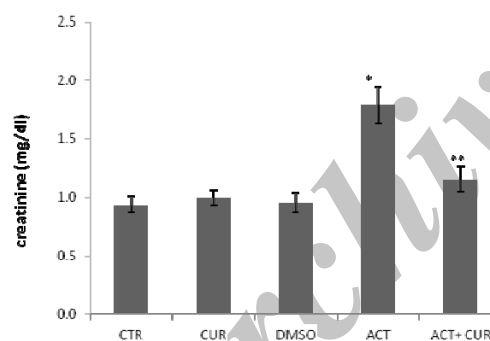
تزریق درون صفاقی حاد استامینوفن منجر به بالا رفتن اوره و کراتینین پلاسمایی در مقایسه با گروه کنترل می‌شود ( $p < 0/0001$ ) که با تزریق کورکومین بعد از ۳۰ دقیقه از تزریق استامینوفن و نمونه‌برداری بعد از ۲۴ ساعت به علت اثرات حفاظتی آنتی‌اکسیدانی این ترکیب میزان اوره (۴۳ درصد) و کراتینین پلاسمایی (۳۵ درصد) کاهش یافته است ( $p < 0/0001$ ). (نمودارهای شماره ۱ و ۲).

اثر کورکومین بر تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدها در بافت کلیوی نمودارهای ۳ و ۴ نشان می‌دهد که تزریق استامینوفن باعث کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در بافت کلیوی در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد ( $p < 0/0001$ ) و استفاده از کورکومین می‌تواند میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (۴۹ درصد) و آنزیم کاتالاز را تا (۴۱ درصد) در بافت کلیوی احیاء نماید. نتایج حاصل از سنجش میزان FRAP پلاسمایی نشان داد که استفاده از کورکومین باعث افزایش میزان این فاکتور از  $25/94 \pm$  ۳۳۳/۰۵ در گروه تحت مواجهه با استامینوفن (گروه III)، به  $27/26 \pm 703/25$  در گروه تیمار تحت تزریق با کورکومین و بعد از ۳۰ دقیقه از تزریق استامینوفن (IV) می‌شود ( $p < 0/001$ ) (نمودار شماره ۵). شدت پراکسیداسیون لیپیدها به هنگام مواجهه حیوان با استامینوفن بعد از ۲۴ ساعت در بافت کلیوی در مقایسه

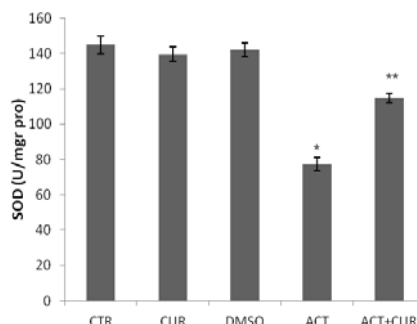
با گروه کنترل به شکل معنی‌داری افزایش می‌یابد ( $p < 0/009$ ) و تجویز کورکومین بعد از ۳۰ دقیقه از تزریق استامینوفن می‌تواند شدت پراکسیداسیون لیپید سنجش شده بعد از ۲۴ ساعت (نمودار شماره ۶) را در بافت کلیوی تا میزان (۴۳ درصد) کاهش دهد ( $p < 0/0087$ ).



نمودار شماره ۱: غلظت اوره پلاسمایی در گروه‌های مختلف آزمایشی. \* مقایسه با گروه کنترل و DMSO با  $p < 0/0001$ . \*\* مقایسه با گروه استامینوفن و  $p < 0/0001$ ، CTR = استامینوفن، کورکومین = CUR.



نمودار شماره ۲: غلظت کراتینین پلاسمایی در گروه‌های مختلف آزمایشی. \* مقایسه با گروه کنترل و DMSO با  $p < 0/0001$ . \*\* مقایسه با گروه استامینوفن و  $p < 0/0001$ ، CTR = استامینوفن، کورکومین = CUR.

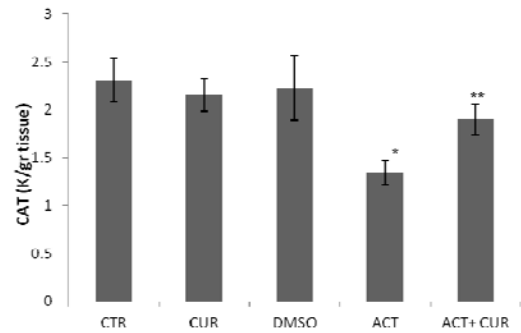


نمودار شماره ۳: فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز بافت کلیوی در گروه‌های مختلف آزمایشی. \* مقایسه با گروه کنترل و DMSO با

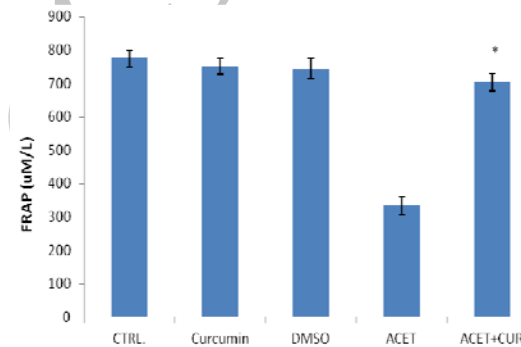
## بحث

مسمومیت حاصل از مصرف حاد استامینوفن یکی از شناخته شده ترین دلایل ایجاد آسیب کبدی و کلیوی می باشد و متابولیک های سمی تولید شده در کبد و سایر ارگان ها به عنوان مکانیسم اصلی این سمیت شناخته می شود (۳). همان طور که در یافته ها اشاره شد به منظور بررسی چگونگی اثرات حفاظتی کورکومین بر نفروتوکسیسیته حاصل از تجویز حاد استامینوفن به سنجش اوره و کراتینین به عنوان مارکرهای عملکردی کلیوی پرداختیم. نمودارهای شماره ۲ و ۱ نشان دهنده افزایش معنی دار این دو مارکر در حیوانات آزمایشی بعد از تجویز حاد استامینوفن می باشد که این موضوع نشان دهنده اختلال عملکرد کلیوی و بهبود این وضعیت بعد از تزریق کورکومین در بیماری های کلیوی تجمع اوره ناشی از کاهش پاک سازی نسبت به تولید آن در پلاسما اتفاق می افتد در حالی که افزایش کراتینین پلاسمایی در زمان آسیب به نفرون ها ایجاد می شود (۲۷). در مطالعات انجام یافته توسط Prescott و Trumper مشخص شده که استفاده از استامینوفن در دوزهای درمانی باعث کاهش جریان خون کلیوی، سرعت فیلتراسیون گلومرولی، ترشح سدیم و پروستاگلاندین E2 در انسان و رت می گردد (۲۸، ۲۹) در حالی که تجویز حاد استامینوفن (۱۵-۱۰ گرم) و ایجاد سمیت حاد با نکرز و آسیب لوله های پروکسیمال همراه است (۱۲). کورکومین به دلیل دارا بودن خواص آنتی اکسیدانی از طریق جمع آوری، خنثی سازی رادیکال های آزاد و از دسترس خارج نمودن آن ها برای واکنش های اکسیداتیو، مهار آنزیم های اکسیداتیو مانند سیتوکروم p-450، تعامل با آبشارهای اکسیداتیو و ممانعت از به نتیجه رسیدن این واکنش ها، شلاته کردن یون های فلزی مانند آهن و ممانعت از بروز خواص اکسیداتیو آن ها عمل می کند (۳۰، ۳۱). گزارشاتی مبنی بر مهار تولید آنیون سوپر اکسید و رادیکال هیدروکسیل توسط کورکومین از طریق اکسیداسیون  $Fe^{2+}$  در واکنش فنتون وجود

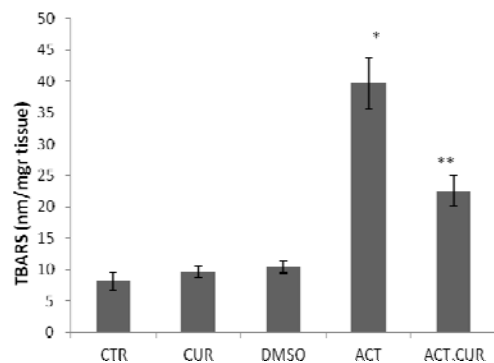
$p < 0.0001$ . \*\* مقایسه با گروه استامینوفن و  $p < 0.0001$ .  
استامینوفن = CTR، کورکومین = CUR



نمودار شماره ۴: فعالیت آنزیم کاتالاز بافت کلیوی در گروه های مختلف آزمایشی. \* مقایسه با گروه کنترل و DMSO با  $p < 0.0001$ .  
\*\* مقایسه با گروه استامینوفن و  $p < 0.0001$ . CTR = استامینوفن، کورکومین = CUR



نمودار شماره ۵: میزان FRAP پلاسمایی در گروه های مختلف آزمایشی. \* تفاوت بین گروه استامینوفن + کورکومین با گروه استامینوفن معنی دار است ( $p < 0.0001$ )



نمودار شماره ۶: میزان TBARS بافت کلیوی در گروه های مختلف آزمایشی. \* مقایسه با گروه کنترل و DMSO با  $p < 0.0009$ .  
\*\* مقایسه با گروه استامینوفن و  $p < 0.0008$ . CTR = استامینوفن، کورکومین = CUR

دارد (۳۲). به نظر می‌رسد خواص آنتی‌اکسیدانتی کورکومین توسط ناحیه بتا-دی کتوننی آن و تشکیل رادیکال‌های نسبتاً پایدار به دلیل ساختاری بندهای دوگانه مزدوج آن انجام می‌شود (۳۳). نقش رادیکال‌های هیدروکسیل در شروع و پیشرفت نفروتوکسیسیته اثبات شده است (۳۴) از آن جایی که  $H_2O_2$  و آنیون سوپراکسید در فعال‌سازی متابولیک استامینوفن توسط سیستم Cyt P-450 (۳۵) یا سم زدایی میتوکندریایی حاصل و این وقایع باعث کاهش گلوکوتاتیون و متعاقباً آسیب سلولی و افزایش محصولات این واکنش‌گرها با ماکرومولکول‌های سلولی مانند DNA، پروتئین‌ها و به ویژه لیپیدها می‌گردد (۳۶). همان‌گونه که در بخش یافته‌های مطالعه نشان داده شد (نمودار شماره ۵)، TBARS در مواجهه حاد رت با استامینوفن در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار و به هنگام استفاده از کورکومین به میزان قابل توجهی کاهش یافت. افزایش میزان TBARS به عنوان یک اندیکاتور پراکسیداسیون لیپیدها، نشان دهنده شدت آسیب بافتی ناشی از تجویز حاد استامینوفن می‌باشد. گزارشات متعددی مبنی بر افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، پراکسیدهای لیپیدی همراه با کاهش گلوکوتاتیون احیاء شده و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و نقش فرایند استرس اکسیداتیو و نیتروژاتیو و اهمیت ترکیبات پراکسی‌نتریت حاصل از یون سوپراکسید و اختلال عملکرد کلیوی در زمان مصرف ترکیباتی از قبیل سدیم فلوراید (۳۷)، vancomycin و استامینوفن تعدیل این عوارض در زمان مصرف آنتی‌اکسیدانت‌هایی مانند کورکومین، N-اسیتیل سیستئین (۳۸)، quercetin (۳۹)، Cajanus indicus (۴۰) وجود دارد. cekmen نشان داد که مصرف استامینوفن در رت، فعالیت آنزیم SOD که وظیفه جمع‌آوری یون سوپراکسید و تبدیل آن به پراکسید هیدروژن را به عهده دارد، کاهش می‌یابد و همزمان فعالیت آنزیم کاتالاز که در حذف پراکسید هیدروژن

شرکت می‌نماید نیز با کاهش همراه می‌شود (۴۱). نتایج حاصل از مطالعات yousef و همکاران (۲۰۱۰) و Ahmida (۲۰۱۲) نیز مشابه نتایج ما تأکیدی بر ایجاد استرس اکسیداتیو و کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در زمان تجویز استامینوفن به شکل حاد دارد (۴۲، ۳۹). نمودارهای شماره ۳ و ۴. اما نتایج مطالعه خرد پژوه و همکاران (۱۳۸۹) نشان داد که علی‌رغم افزایش میزان مالون دی‌آلدئید به عنوان مارکر پراکسیداسیون لیپیدی در هموزنیت بافت کلیوی، فعالیت کاتالاز با افزایش آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز کاهش نشان می‌دهد و با استفاده از آنتی‌اکسیدانت کورکومین فعالیت کاتالاز کاهش و فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز افزایش می‌یابد (۳۸). از آن جایی که عوامل مولد یا مقابله‌کننده در ایجاد استرس اکسیداتیو با یکدیگر در حال تعامل هستند سنجش جداگانه آن‌ها در بعضی موارد نتایج متناقضی را به دست می‌دهد که توجه این تفاوت‌ها در الگوی تغییرات با مشکل همراه می‌شود. از این رو می‌توان با سنجش کل آنتی‌اکسیدان‌ها در پلاسما به کمک روش‌هایی مانند FRAP وضعیت کلی این شرایط را مشاهده و بررسی نمود. نتایج FRAP حاصله در این مطالعه نشان‌دهنده تغییرات کلی مثبت و تقویت برآیند عوامل سیستم آنتی‌اکسیدانتی مؤثر پلاسمایی از قبیل عواملی مانند توتال پروتئین، بیلی‌روبین، اسید اوریک و ... بوده که می‌توان با بررسی آن‌ها در مطالعات آینده اطلاعات ارزشمندی راجع به مکانیسم مقابله با این سمیت به دست آورد. از سوی دیگر این نتایج متناقض در بررسی‌های انجام یافته، نشان دهنده پیچیدگی مسیرهای متابولیسمی ایجاد سمیت از نظر نحوه، زمان و دوز تجویز دارو و آنتی‌اکسیدان به کار گرفته از نظر درصد خلوص و نوع حلال، نوع مدل حیوانی است و لذا پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی دیگر در جهت دستیابی به شناخت هر چه بهتر این موارد صورت پذیرد.

از سوی دیگر کورکومین علاوه بر خاصیت

## سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد بیوشیمی خانم سعیده احمدی باشد. از تمام کسانی که ما را در انجام این پروژه یاری کردند کمال تقدیر و تشکر را داریم.

آنتی اکسیدانی دارای خواص ضد التهابی می باشد، لذا به نظر می رسد که این ماده می تواند تأثیر بهتری نسبت به سایر آنتی اکسیدان ها در برابر استامینوفن داشته باشد که البته این موضوع به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

## References

- Zhao C, Sheryl D, Zhou YX. *Effects of combined use of diallyl disulfide and Nacetyl-cysteine on acetaminophen hepatotoxicity in  $\beta$ -naphthoflavone pretreated mice*. World J Gastroenterol 1998; 4: 153-157.
- Proudfoot AT, Wright N. *Acute paracetamol poisoning*. Br Med J 1970; 3: 557-558.
- Gu J, C.H, Behr M, et al. *In vivo mechanisms of tissue-selective drug toxicity: effects of liver-specific knockout of the NADPH-cytochrome P-450 reductase gene on acetaminophen toxicity in kidney, lung, and nasal mucosa*. Mol Pharmacol 2005; 67: 623-630.
- Zaher H, B.J., Ward JM, et al. *Protection against acetaminophen toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 double-null mice*. Toxicol Appl Pharmacol 1998; 152: 193-199.
- Matthews AM, R.D., Hinson JA et al *Acetaminophen-induced hepatotoxicity. Analysis of total covalent binding vs. specific binding to cysteine*. Drug Metab Dispos 1996; 24: 1192-1196.
- Blakely, P., McDonald, B.R. *Acute renal failure due to acetaminophen ingestion: a case report and review of the literature*. J Am Soc Nephrol 1995; 6: 48-53.
- Kaplotis S SG, Hermann M, et al. *Paracetamol catalyzes myeloperoxidase-initiated lipid oxidation in LDL*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 2855-2860.
- Bessemers JG, V.N., *Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches*. Crit Rev Toxicol 2001; 31: 55-138.
- Khandkar MA, P.D, Das M et al. *Is activation of lysosomal enzymes responsible for paracetamol-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity?* J Pharm Pharmacol 1996; 48: 437-440.
- Lorz C, J.P, Sanz AB, et al. *Role of Bcl-xL in paracetamol-induced tubular epithelial cell death*. Kidney Int 2005; 67: 592-601.
- Cobden, I., Record, C.O., Ward, M.K., Kerr, D.N., *Paracetamol-induced acute renal failure in the absence of fulminant liver damage*. BMJ 1982; 284: 21-22.
- Balantz, R.C., *Acetaminophen: acute and chronic effects on renal function*. Am Kidney Dis 1996; 28: S3-S6.
- Li, C., Liu, J., Saavedra, J.E., Keefer, L.K., Waalkes, M.P, *The nitric oxide donor, V-PYRRO/NO, protects against acetaminophen-induced nephrotoxicity in mice*. Toxicology 2003; 189: 173-180.
- Eguia, L., Materson, B.J., *Acetaminophen related acute renal failure without fulminant hepatic failure*. Pharmacotherapy 1997; 17: 363-370.
- Abraham, P., *Vitamin C may be beneficial in the prevention of paracetamol-induced renal*



- damage. Clinical and experimental nephrology 2005; 9(1): 24-30.
16. Sener G, S.H., Kabasakal L, Abark S, Oner S, Ercan F *The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity*. Fundam Clin Pharmacol 2000; 14: 553-560.
  17. Sener, G., A.o. sehirli, and G. Ayanoglu-Dulger, *Protective effects of melatonin, vitamin E and N-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study*. Journal of pineal research 2003; 35(1): 61-68.
  18. Corson, T.W., Crews, C.M., *Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials*. Cell 2007; 130: 769-774.
  19. Reddy, A.C.P. and B.R. Lokesh, *Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron*. Molecular and cellular biochemistry 1994; 137(1): 1-8.
  20. Rao, C.V., et al., *Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound*. Cancer research 1995; 55(2): 259-266.
  21. Chandra, D. and S.S. Gupta, *Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of volatile oil of Curcuma longa (Haldi)*. The Indian journal of medical research 1972; 60(1): 138-142.
  22. Kempaiah, R.K., Srinivasan, K., *Influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on the antioxidant status of red blood cells and the liver in high-fat-fed rats*. Ann. Nutr. Metab 2004; 48: 314-420.
  23. McCord JM, F.I., *Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein*. J Biol Chem 1969; 244: 6049-6055.
  24. Aebi, H., *Catalase in vitro*. Methods Enzymol 1984; 105: 121-126.
  25. Benzie IFF, S.J., *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay*. Anal Biochem 1996; 239: 70-76.
  26. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
  27. Mayane, p.d., *the kidneys and renal calculi*. In: *Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment*, Sixth ed. London: Edward Arnold Publication 1994. p. 2-24.
  28. Trumper, L., Monasterolo, L.A., Elias, M.M., *Probenecid protects against in vivo acetaminophen-induced nephrotoxicity in male Wistar rats*. J. Pharmacol. Exp. Ther 1998; 284: 606-610.
  29. Prescott, L.F., Speirs, G.C., Critchley, J.A., Temple, R.M., Winney, R.J., *Paracetamol disposition and metabolite kinetics in patients with chronic renal failure*. Eur. J. Clin. Pharmacol 1989; 36: 291-297.
  30. Sreejayan, R.M., *Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation*. J Pharmacol 1994; 46: 1013-6.
  31. Unnikrishnan MK, R.M., *Inhibition of nitric oxide-induced oxidation of hemoglobin by curcuminoids*. Pharmazie 1995; 50: 490-2.
  32. Reddy ACP, L.B., *Effect of dietary turmeric (Curcuma longa) on iron induced lipid peroxidation in the rat liver*. Food Chem Toxicol 1994; 32: 279-283.
  33. Sumanont Y, M.Y., Tohda M, Vajragupta O, Matsumoto K, Watanabe H *Evaluation of the Nitric Oxide Radical Scavenging Activity*

- of Manganese Complexes of Curcumin and Its Derivative.* . Biol Pharm Bull 2004; 27(2): 170-173.
34. Singh P, S.M., Khemani LD *Renoprotective effects of Andrographis paniculata (Burm. f.) Nees in rats.* Ups J Med Sci 2009; 114: 136-139.
35. Dai, Y., Cederbaum, A.I, *Cytotoxicity of acetaminophen in human cytochrome P4502E1- transfected HepG2 cells.* J. Pharmacol. Exp. Ther 1995; 273: 1497-1505.
36. Knight, T.R., Kurtz, A., Bajt, M.L., Hinson, J.A., Jaeschke, H., *Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen-induced liver injury: Role of mitochondrial oxidant stress.* Toxicol. Sci 2001; 62: 212-220.
37. Nabavi, S.F.M., A. H. Eslami, S. Nabavi, S. M., *Protective Effects of Curcumin against Sodium Fluoride-Induced Toxicity in Rat Kidneys.* Biological Trace Element Research, 2011; 145(3):369-74.
38. Kheradpezhoh, E., et al. *Curcumin protects rats against acetaminophen-induced hepatorenal damages and shows synergistic activity with N-acetyl cysteine.* European journal of pharmacology, 2010; 628(1-3): 274-281.
39. Yousef, M.I.O., S. A. M. El-Guendi, M. I. Abdelmegid, L. A., *Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat.* Food and Chemical Toxicology 2010; 48(11): 3246-3261.
40. Ghosh, A. and P.C. Sil, *Anti-oxidative effect of a protein from Cajanus indicus L against acetaminophen-induced hepato-nephro toxicity.* Journal of Biochemistry and Molecular Biology 2007; 40(6): 1039-1049.
41. Cekmen M, et al. *Curcumin prevents oxidative renal damage induced by acetaminophen in rats.* Food and Chemical Toxicology 2009; 47(7): 1480-1484.
42. Ahmida, M.H.S., *Protective role of curcumin in nephrotoxic oxidative damage induced by vancomycin in rats.* Experimental and Toxicologic Pathology 2012; 64(3): 149-153.