Archive of SID.ir

زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره چهارم، تابستان ۱۴۰۲، صفحات ۱۴۶- ۱۳۳

مقاله پژوهشی

# بررسی اثر تزریق داخل صفاقی کارواکرول بر استرس اکسیداتیو کلیه ناشی از لیپوپلی‌ساکاریدها در موش‌های صحرایی نر

علیرضا مرتضوی[۱]، حسین محمدپورکارگر[۱]*، فریماه بهشتی[۲،۳] ، غلامحسن واعظی[۱]، محمود حسینی[٤]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

۳- گروه فیزیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

٤- مرکز تحقیقات کاربردی زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

*مسئول مکاتبات: pourkargar@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۸

DOI: 10.22034/ascij.2023.1978481.1461

## چکیده

کارواکرول یک فنل مونوترپن طبیعی است که فعالیت ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدسرطانی و ضدالتهابی قابل توجهی را از خود نشان می‌دهد. با این حال، اثر کارواکرول بر استرس اکسیداتیو در آسیب حاد کلیوی ناشی از لیپوپلی ساکارید (LPS) هنوز گزارش نشده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات حفاظتی کارواکرول بر استرس اکسیداتیو کلیه ناشی از لیپوپلی‌ساکاریدها و پاسخ‌های التهابی در موش‌های صحرایی نر انجام شد. موش‌های صحرایی نر ویستار به گروه‌های زیر تقسیم شدند (n = ۷): ۱) کنترل، ۲) گروه دریافت‌کننده LPS ۳) گروه دریافت‌کننده LPS +کارواکرول ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، ٤) گروه دریافت کننده‌ی LPS +کارواکرول ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و ۵) گروه دریافت‌کننده LPS +کارواکرول ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم. برای ایجاد آسیب حاد کلیوی، LPS با دوز ۱میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۲ هفته به صورت داخل صفاقی تزریق شد. دوزهای مختلف کارواکرول، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق LPS به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. بعد از بیهوش نمودن حیوانات، کلیه راست خارج و در بافر فسفات هموژنه شد. سطوح سیتوکین التهابی اینترلوکین یک بتا (IL-1β) و شاخص‌های استرس اکسیداتیو (مالون دی آلدئید، تیول تام، فعالیت کاتالاز و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز) به ترتیب با روش الایزا و اسپکتروفتومتری تعیین گردیدند. نتایج نشان داد که تزریق LPS باعث افزایش مالون دی‌آلدئید و IL-1β می‌شود در حالی که تیول تام، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را در بافت کلیه کاهش می‌دهد. اما پیش تیمار با کارواکرول نه تنها سطوح مالوندی‌آلدئید و-IL 1βرا کاهش داد، بلکه باعث افزایش تیول تام، فعالیت کاتالاز و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز گردید. مقدار مالون دی آلدئید با سطح IL-1β همبستگی مثبت دارد. با این حال، بین مقادیر مالوندی‌آلدئید و تیول تام، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز همبستگی منفی معنی‌داری وجود داشت. کارواکرول با کاهش التهاب و جلوگیری از استرس اکسیداتیو از کلیه در برابر LPS محافظت می‌کند.

**کلمات کلیدی:** کارواکرول، IL-1β، استرس اکسیداتیو، لیپوپلی‌ساکارید، آسیب حاد کلیوی.



Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



**مقدمه**

سپتی‌سمی (Septicemia) با پاسخ قوی سیستم ایمنی به عفونت مشخص می‌شود و عملکرد فیزیولوژیکی کلیه‌ها، کبد، قلب و ریه را مختل می‌کند (۱۲). آسیب حاد کلیوی یکی از عوارض شایع سپسیس (Sepsis) در بیماران است (۳۴). لیپوپلی‌ساکاریدها (LPS)، اجزای اصلی غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی می‌باشند که باعث فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی می‌گردند. ترکیبات LPS اندوتوکسین‌های مقاوم در برابر حرارت بوده و به عنوان یک عامل کلیدی در القای شوک سپتیک شناخته می‌شوند (۷). نشان داده شده است که LPS به گیرنده‌های TLR4 در سلول‌های ایمنی متصل شده و با فعال کردن این گیرنده‌ها، سیتوکین‌های پیش‌التهابی مختلفی مانند IL-1β، TNF-α و IL-6 از سلول‌های ایمنی تولید می‌کند که در نهایت منجر به استرس اکسیداتیو می‌گردد (۱۴). در بدن سیتوکین پیش التهابی اینترلوکین یک بتا (IL-1β) توسط انواع سلول‌هایی از جمله مونوسیت‌ها، ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اندوتلیال تولید می‌شود. مشخص شده است که LPS نه تنها مسیر التهابی را فعال می‌کند (۴۰)، بلکه گونه‌های اکسیژن فعال فراوانی را تولید می‌کند که باعث استرس اکسیداتیو می‌شود (۱). استرس اکسیداتیو با عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌ها شروع می‌شود که در نهایت منجر به افزایش رادیکال‌های آزاد در بدن می‌گردد. افزایش رادیکال‌های آزاد، اکسیداسیون پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها را در پی دارد که در نهایت باعث آغاز آپوپتوز سلولی و آسیب بافتی می‌شود (۳۱). میتوکندری‌ها، پراکسی-زوم‌ها، سلول‌های التهابی، NADH اکسیدازها، پرتوهای یونیزان و داروهای ضد سرطان منابع اصلی اکسیژن فعال در سلول هستند. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند کاتالاز (CAT) ، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) یا آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند ویتامین‌های C، E و فلاونوئیدها رادیکال‌های آزاد را حذف کرده و استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهند (۳۱). استرس اکسیداتیو مسئول شرایط پاتولوژیکی مانند سرطان، آلزایمر و آسیب حاد کلیوی است (۱۸). ترکیب LPS نه تنها بر سلول‌های توبولی در کلیه تأثیر گذاشته و عملکرد آنها را مختل می‌کند، بلکه گردش خون در کلیه را نیز تضعیف می‌کند (۵). در نفرون‌های کلیوی، سلول‌های پروگزیمال نسبت به سمیت کلیوی ناشی از LPS حساس تر هستند (۲۵). مشخص شده است که LPS با افزایش رادیکال‌های آزاد درون سلولی که باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود و آسیب حاد کلیوی را القا می‌کند (۴). بررسی‌ها نشان داده‌اند که LPS باعث افزایش سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو و همچنین کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD و کاتالاز می‌گردد. ثابت شده است که استرس اکسیداتیو در سلول‌های پروگزیمال کلیوی آپوپتوز را القا می‌کند و با ایجاد تخریب سلولی، در عملکردکلیه اختلال ایجاد می‌کند (۳). گزارش شده است که تجویز سیستمیک LPS باعث کاهش میزان فیلتراسیون گلومرولی و کاهش فشار خون در کلیه می‌گردد. در چنین شرایطی جذب آب و نمک مختل شده و نارسایی حاد کلیه رخ می‌دهد (۴۱).

از قدیم الایام، گیاهان و مشتقات آنها به عنوان خاستگاه عناصر درمانی مورد توجه بوده‌اند. امروزه تمایل زیادی به استفاده از ترکیبات گیاهی برای درمان بیماری‌های مختلف وجود دارد، چرا که عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی دارند (۷، ۸). کارواکرول (۵-ایزوپروپیل-۲- متیل فنل) یکی از ترکیبات فنلی مونوترپن در گیاهانی مانند آویشن، مرزنجوش، نعناع و مرزه می‌باشد (۳۸). کارواکرول،



Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



بعنوان طعم دهنده طبیعی و نگهدارنده مواد غذایی، اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد سرطانی و ضد التهابی بارزی از خود نشان می‌دهد (۳۵). علاوه بر این، دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قوی بوده و رادیکال‌های آزاد مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و اکسید نیتریک را خنثی می‌نماید (۳۷). نشان داده شده است که کارواکرول نه تنها آسیب DNA ناشی از پراکسید هیدروژن را در سلول‌های ریه کاهش می‌دهد، بلکه با کاهش استرس اکسیداتیو از مرگ سلول‌های کبدی به دنبال القا ایسکمی–خونرسانی مجدد نیز جلوگیری می‌کند (۳۰). این ترکیب، آپوپتوز و نکروز را در سلول‌های کلیوی به دنبال ایسکمی–خونرسانی مجدد، به طور موثری کاهش می‌دهد (۱۵). همچنین کارواکرول باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های GPx و SODشده و از آسیب به DNA در لنفوسیت‌هایی جلوگیری می‌کند که تحت اثر اشعه ماوراء بنفش قرار گرفته‌اند. همچنین تحقیقات نشان داده‌اند که تزریق کارواکرول باعث کاهش استرس اکسیداتیو در مغز و افزایش فعالیت SOD و کاتالاز در موش‌های تحت درمان با LPS می‌شود (۳۲). با وجود تحقیقات گسترده، هیچ درمان موثری برای جلوگیری از آسیب حاد کلیوی در افراد مبتلا به سپسیس وجود ندارد (۲۵). باید به این نکته اشاره کرد که حتی اگر باکتری‌ها توسط آنتی بیوتیک‌ها از بین بروند، التهاب ناشی از LPS به عنوان یک مشکل بالینی همچنان به قوت خود باقی می‌ماند. بنابراین، ارایه یک شیوه درمانی موثر در برابر LPS بسیار حیاتی می‌باشد. با توجه به اینکه کارواکرول دارای خواص آنتی اکسیدانی قوی در جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها می‌باشد لذا در این تحقیق، اثرات محافظتی کارواکرول بر استرس اکسیداتیو ناشی از LPS در کلیه مورد بررسی قرار گرفت است.

## مواد و روش‌ها

موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۴۰ موش صحرایی) با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه شدند. موش‌ها در شرایط استاندارد آزمایشگاهی نگهداری شده و به طور آزاد به غذا و آب دسترسی داشتند. مربیان کمیته اخلاقی علوم پزشکی (دانشگاه مشهد) حیوان و کلیه مراحل آزمایشی را کنترل می‌کردند. حیوانات به گروه‌های زیر تقسیم شدند: ۱) کنترل، ۲) گروه دریافت کننده LPS ۳) گروه دریافت کننده LPS+کارواکرول ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، ۴) گروه دریافت‌کننده LPS + کارواکرول ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و ۵) گروه دریافت‌کننده LPS + کارواکرول ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم. دوزهای کارواکرول بر اساس مقالات و همچین تحقیقات قبلی انتخاب شد (۲۱). برای ایجاد آسیب حاد کلیوی، LPS با دوز ۱میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲ هفته به صورت داخل صفاقی تزریق شد. دوزهای مختلف کارواکرول، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق LPS به صورت داخل صفاقی تزریق گردید .

**نمونه‌گیری از بافت:** موش‌ها با استفاده از کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند و کلیه راست به سرعت خارج شد. با سرم نمکی شسته و روی کاغذ صافی خشک شده و در نهایت توزین شد. سپس ۱۰ درصد هموژن بافتی در بافر فسفات سرد یخ (۵۰ میلی‌مولار، Ph = ۷/٤ تهیه شد. مایع رویی که پس از سانتریفیوژ کردن هموژن در ٤۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه به دست آمد، برای اندازه‌گیری IL-1β، مالون دی آلدئید، تیول تام، فعالیت‌های آنزیم‌های کاتالاز و SODاستفاده شد.

**اندازه‌گیری IL-1β در بافت کلیه توسط روش ELISA:** سایتوکین IL- در ایجاد بیماری‌های



Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



باواسطه ایمنی سلولار نقش زیادی دارد. همچنین این سایتوکین به‌عنوان یک شاخص التهابی کاربرد فراوانی در مطالعات آزمایشگاهی برای بررسی اثرات التهابی و یا ضدالتهابی یک دارو دارا می‌باشد. اندازه‌گیری توسط کیت سنجش سیتوکین IL-1β موش صحرایی، (RandD Systems) با دقت تشخیص ۱۴/۴ pg/m انجام گردید. این کیت حاوی آنتی بادی های ضد IL-1β با بیوتینیلات و streptavidin-horse radish peroxidase بود. مراحل انجام الایزا بر اساس دستورالعمل کارخانه‌ای بدین ترتیب انجام شد:

۱۰۰ میکرولیتر از استانداردهای با غلظت مختلف و هموژن بافتی به ترتیب در چاهک‌های مربوط به استاندارد و نمونه ریخته شد. ۵۰ میکرولیتر از آنتی-بادی ضد Interleukin-1β به چاهک ها اضافه شد. سطح چاهک‌ها پوشانده شده و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق (۱۸–۲۵ سانتیگراد) انکوبه شد. پس از خالی کردن محلول‌ها و ۶ مرتبه شست و شوی چاهک‌ها با بافر، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول Streptavidin-Horse Radish به همه چاهک‌ها اضافه گردید تا سطح آنها پوشانده شود. دوباره به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس محلول چاهک ها مجددا خالی و با بافر شست و شو، ۶ مرتبه شست و شو داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متیل بنزیدین اضافه گردید و میکروپلیت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق (۱۸–۲۵ درجه سانتیگراد) و محلی تاریک انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده (Stop solution) اضافه شد. جذب نوری همه چاهک ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه Elisa Reader خوانده شد.

**سنجش پراکسیداسیون لیپیدی:** سطح MDA بافتی به روش Ohkawa اندازه‌گیری شد. این روش توانایی واکنش MDA را با تیوباربیتوریک اسید در شرایط اسیدی ارزیابی می‌کند که منجر به تولید رنگ صورتی می‌شود. به طور خلاصه، ۰/۳ میلی‌لیتر مایع رویی هموژن بافتی را به ۰/۲ میلی‌لیتر سدیم دودسیل سولفات (۸/۱ درصد)، ۱/۵ میلی‌لیتر اسید استیک ۲۰ درصد، ۱/۵ میلی‌لیتر TBA (۸/۱ درصد) و آب مقطر (نیم میلی لیتر) اضافه گردید. این مخلوط در حمام آب گرم در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه حرارت داده شد. پس از خنک شدن با آب لوله کشی، مقدار جذب در نانومتر ۵۳۲ اندازه‌گیری شد (۲۱).

**اندازه‌گیری فعالیت‌های SOD و CAT:** فعالیت SOD با روش توصیف شده توسط Beauchamp و Fridovich تعیین شد. به طور خلاصه، مایع رویی هموژن بافت کلیه (۰/۳ میلی‌لیتر) به ۱/۳ میلی‌مولار ریبوفلاوین (۱/۵ میلی‌لیتر)، ۱۳ میلی‌مولار متیونین (۱/۵ میلی‌لیتر) و NBT ۶۳میلی‌مولار (میلی‌لیتر ۱/۵) اضافه گردید. مخلوط‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در لوله‌های آزمایش نور دهی شدند. واکنش به ترتیب با روشن و خاموش کردن چراغ شروع و به پایان رسید. هیچ مقدار قابل تشخیصی از واکنش زیر نور اتاق در طول آماده‌سازی محلول‌ها وجود نداشت. در نهایت مقدار جذب در نانومتر ۵۶۰ اندازه گیری شد (۲۲).

فعالیت CAT با روش توصیف شده توسط Yi Li و Schell horn تعیین شد. به طور خلاصه، ۰/۳ میلی لیتر مایع رویی هموژن بافتی به پراکسید هیدروژن ۳۰ میلی‌مولار اضافه شد و سپس بلافاصله با اسپکتروفتومتر در طول موج نانومتر ۲۴۰ = λ در هر ۱۰ ثانیه و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی-گراد اسکن شد. فعالیت کاتالاز بر اساس سرعت تجزیه پراکسید هیدروژن محاسبه شد که متناسب با کاهش جذب در ۲۴۰ نانومتر است. (۲۳).

**تجزیه و تحلیل آماری:** برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS (نسخه بیست و دو) استفاده شد. فرض نرمال بودن با آزمون کولموگروف- اسمیرنوف



Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



مورد آزمایش قرار گرفت. سپس گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و بعد آزمون تعقیبی LSD مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. علاوه بر این، از ضریب همبستگی پیرسون برای تجزیه و تحلیل روابط بین MDA وIL-1β ، SOD، CAT و سطح تیول تام استفاده شد. نتایج P<0.05 معنی دار در نظر گرفته شد و به صورت SEM ± میانگین بیان شد.

## نتایج

برای تعیین نقش محافظتی کارواکرول در برابر پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو ناشی از LPS، سطوح MDA و گروه‌های تیول را در بافت کلیه اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از ANOVA یک طرفه و به دنبال آن آزمون تعقیبی LSD نشان داد که LPS باعث افزایش غلظت MDA ($p < ۰/۰۰۱$) و کاهش سطح تیول تام ($p <۰/۰۰۱$) و فعالیت آنزیم‌های SOD و کاتالاز ($p >۰/۰۰۱$) در بافت کلیه می‌گردد (شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ٤). تجویز کارواکرول قبل از تزریق LPS، غلظت MDA را در دوزهای ۲۵ ($p > ۰/۰۱$)، ۵۰ و ۱۰۰ میلی-گرم/کیلوگرم کاهش داد ($p < ۰/۰۰۱$ شکل ۱). پیش تیمار با کارواکرول باعث افزایش مقادیر تیول تام در دوزهای ۲۵ ($p > ۰/۰۵$)، ۵۰ و ۱۰۰ میلی-گرم/کیلوگرم ($p > ۰/۰۰۱$) گردید (شکل ۲).

همچنین کارواکرول باعث افزایش فعالیت SOD در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ($p > ۰/۰۰۱$، شکل ۳) و کاتالاز در دوزهای ۵۰ ($p <۰/۰۵$) و دوز ۱۰۰ ($p > ۰/۰۰۱$) گردید (شکل ٤). با توجه به دخالت قابل توجه واسطه‌های التهابی در موش‌های تحت درمان با LPS، سطوح IL-1β در بافت کلیه با روش الایزا نیز بررسی شد. سطح IL-1β در گروه LPSبه طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($p >۰/۰۰۱$، جدول ۱). پیش تیمار با کارواکرول سطوح IL-1β را در حیوانات تحت درمان به طور قابل توجهی کاهش داد ($p > ۰/۰۰۱$، جدول ۱). علاوه بر این، تحلیل رگرسیون پیرسون نشان داد که مقادیر MDA با سطح IL-1β همبستگی مثبت ($r = ۰/۹۹$، $p > ۰/۰۰۱$ شکل A۵) دارد. اما بین سطح MDA و تیول کل ($r = -۰/۶۹$، $p < ۰/۰۰۰۱٤$ شکل B۵)، فعالیت SOD ( $r =-۰/۸$، $p < ۰/۰۰۰۰۲$ شکل C۵) و فعالیت کاتالاز ($r =-۰/۷۳$، $p < ۰/۰۰۰۰۲$ شکل D۵) همبستگی منفی وجود دارد. مطابق جدول ۱، اثر تیمار با کارواکرول بر مقادیر IL-1β (pg/g tissue) در آسیب حاد کلیه ناشی ازLPS : تزریق LPS باعث افزایش سطح IL-1β شد. پیش درمانی با کارواکرول (Car) مقادیر IL-1β را در حیوانات تحت درمان با LPS در تمام دوزها بطور معنی داری کاهش داد.

جدول ۱- بررسی اثر تیمار با کارواکرول بر مقادیر IL-1β (پیکوگرم/گرم بافت) در آسیب حاد کلیه ناشی ازLPS

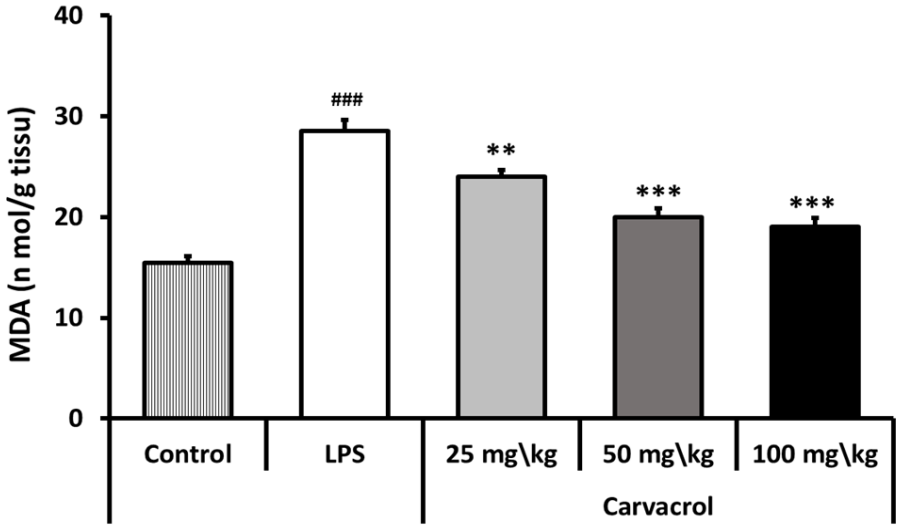
| | کنترل | LPS | LPS +کارواکرول (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) | LPS +کارواکرول (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) | LPS +کارواکرول (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) |
|---|---|---|---|---|---|
| IL-1β | ۲٤٤/۸۰±۲۰/۷ | ۱۳٤۳/۵±٤۱/۲۱### | ۹۵۰/٦۷±۹۰/۵۱*** | ۳۸٦/۲٤±۲٦/۸۳*** | ۳٤۸/٤۳±۲٦/۸*** |



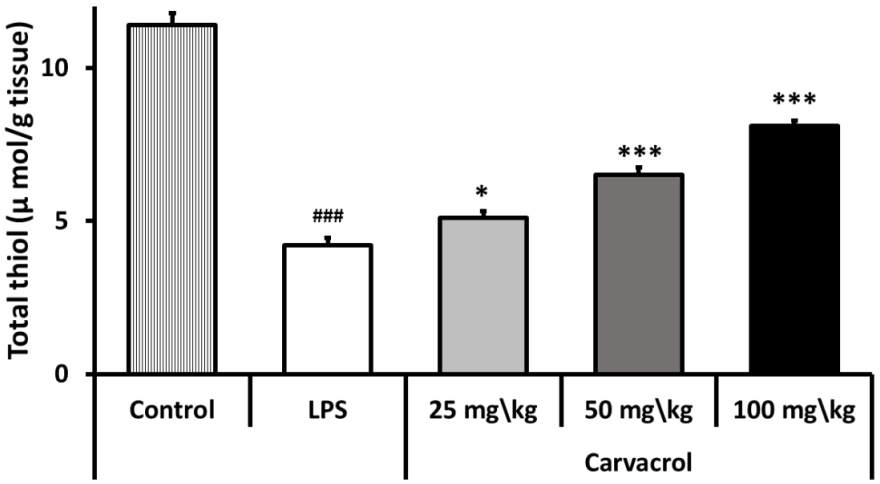
Archive of SID.ir

Archive of SID.ir






شکل ۱- بررسی اثر تزریق کارواکرول بر سطح MDA در آسیب حاد کلیوی ناشی از LPS: داده نشان می‌دهد که تزریق LPS باعث افزایش سطح MDA می‌شود. تزریق کارواکرول سطوح MDA را در حیوانات تحت درمان با LPS به طور قابل توجهی کاهش داد. داده‌ها به صورت SEM ± میانگین ارائه شدند (n= ۷، ### $p <$ ۰/۰۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل، ** $p <$ ۰/۰۱ و *** $p <$ ۰/۰۰۰۱ در مقایسه با گروه LPS)



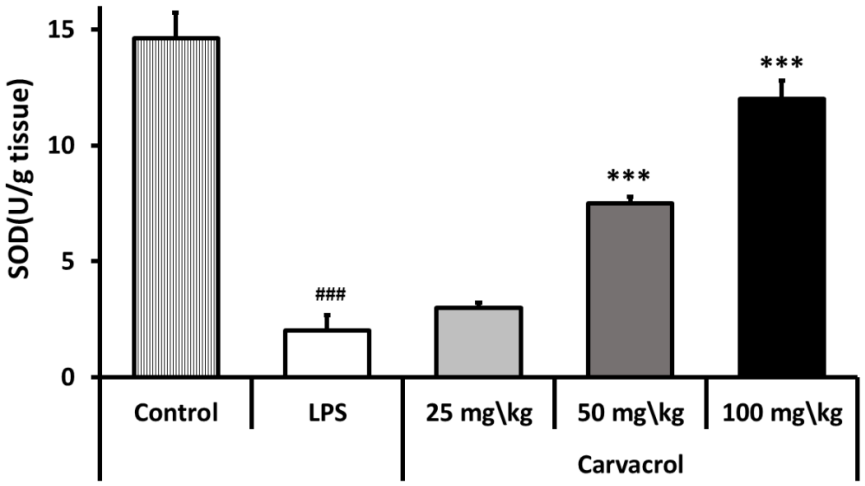

شکل ۲- بررسی اثر کارواکرول بر تیول تام در آسیب حاد کلیه ناشی از LPS. تزریق LPS گروه‌های تیول کل را کاهش داد در حالی که پیش تیمار کارواکرول گروه‌های تیول تام را در همه دوزها افزایش داد. داده‌ها به صورت SEM ± میانگین نشان داده شده‌اند (n= ۷، ### $p <$ ۰/۰۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل. * $p <$ ۰/۰۵ و *** $p <$ ۰/۰۰۰۱ در مقایسه با گروه LPS)



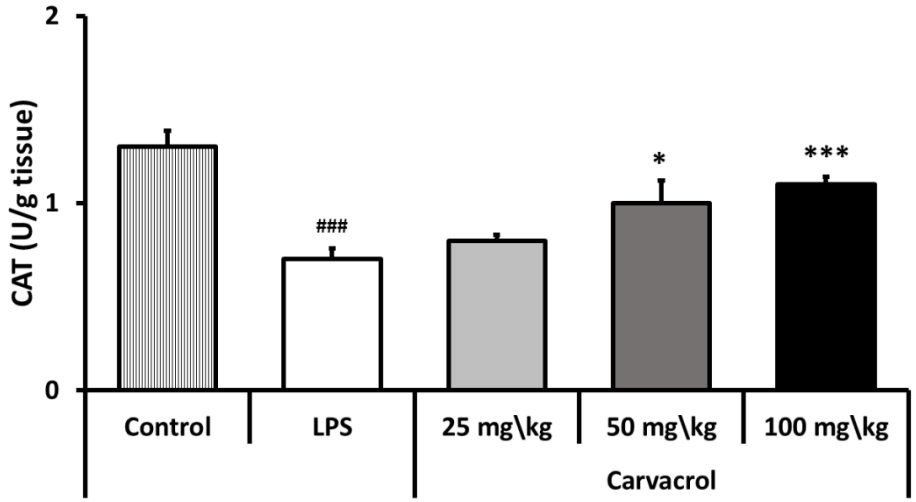
Archive of SID.ir

Archive of SID.ir






شکل ۳- بررسی اثر کارواکرول بر فعالیت SOD (Superoxide dismutase) در آسیب حاد کلیه ناشی از LPS. تزریق LPS فعالیت SOD را کاهش داد. در حالی که پیش تیمار با کارواکرول فعالیت SOD را در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش داد. داده‌ها به صورت SEM ± میانگین نشان داده شده‌اند (n= ۷، ### $p$ <۰/۰۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل، *** $p$ <۰/۰۰۰۱ در مقایسه با گروه LPS)



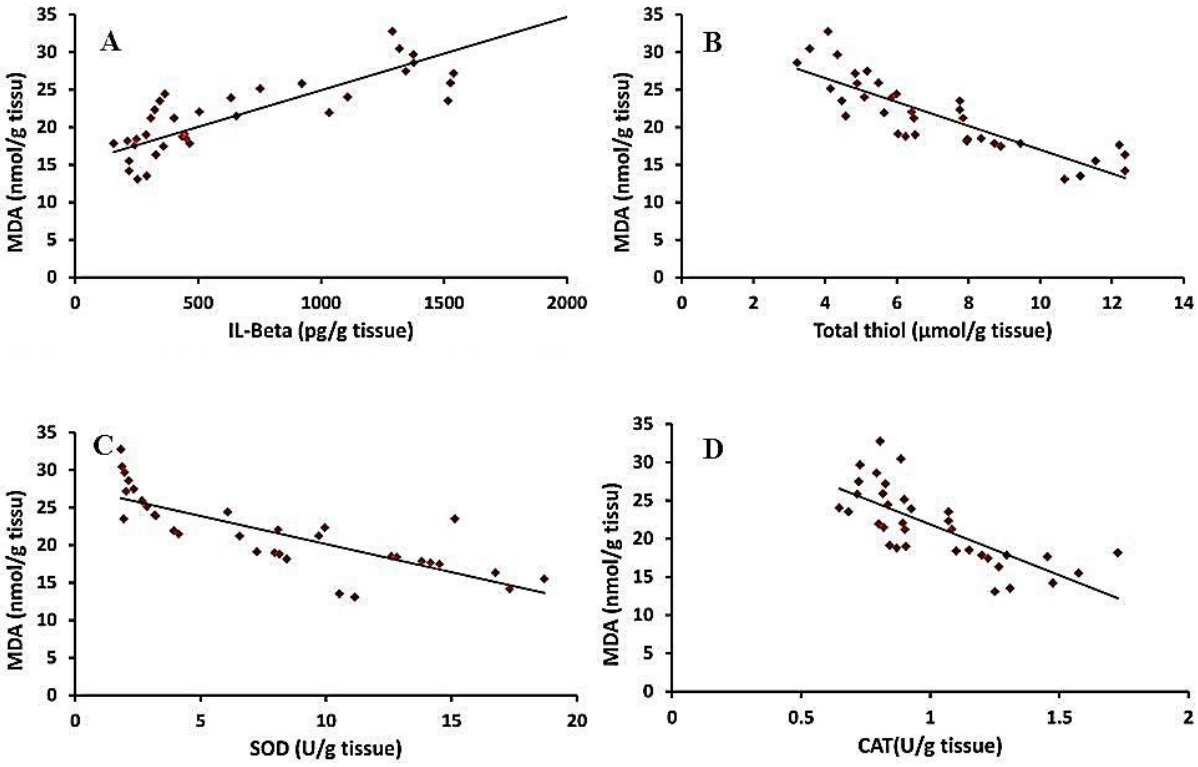

شکل ٤- بررسی ثر کارواکرول بر فعالیت CAT (Catalase) در آسیب حاد کلیه ناشی از LPS. تزریق LPS فعالیت کاتالاز را کاهش داد در حالی که پیش تیمار با کارواکرول فعالیت کاتالاز را در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش داد. داده‌های فوق در شکل به صورت SEM ± میانگین نشان داده شده‌اند (n= ۷، ### $p$ <۰/۰۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل، * $p$ <۰/۰۵ و *** $p$ <۰/۰۰۰۱ در مقایسه با گروه LPS)



Archive of SID.ir

Archive of SID.ir






**شکل ۵**- رابطه بین MDA (Malondialdehyde)، تیول تام و فعالیت های آنزیم‌های SOD (Superoxide dismutase) و CAT (Catalase). تجزیه و تحلیل رگرسیون پیرسون نشان داد که MDA با سطح IL-1β همبستگی مثبت دارد (A). با این حال، بین سطح MDA و تیول تام (B) و همچنین فعالیت‌های آنزیم‌های SOD (C) و کاتالاز (D) همبستگی منفی معنی‌داری وجود دارد.

## بحث

این اولین مطالعه‌ای است که استرس اکسیداتیو و وضعیت التهاب را در موش‌های تحت درمان با LPS بررسی نموده و این پارامترها را با شاخص‌های بیوشیمیایی مرتبط می‌کند. مطالعه ما نشان داد که نشانگرهای استرس اکسیداتیو و التهابی از جمله سطوح MDA و IL-1β در موش‌های تحت درمان با صفاقی LPS بعنوان مدلی برای القای سپسیس در حیوانات استفاده می‌گردد. ترکیب LPS یک آگونیست کلاسیک TLR4 می‌باشد که سیستم ایمنی ذاتی را فعال نموده و یک پاسخ التهابی قوی را ایجاد و گسترش می‌دهد (۱۴). سلول‌های ایمنی با فعال کردن TLR4، سیتوکین‌های التهابی مختلفی مانند IL-1، TNF-α و IL-1β تولید می‌کنند که در نهایت منجر LPSافزایش می‌یابد. این نتایج با گزارش‌های قبلی در مطالعات انسانی و حیوانی مطابقت دارد (۲۷، ۱۷). آسیب حاد کلیوی یکی از شدیدترین عوارض سپسیس بوده و طی سپسیس، کلیه‌ها به دلیل التهاب و استرس اکسیداتیو متعاقب آن، سریعا دچار اختلال در عملکرد طبیعی می‌شوند. تزریق داخل به استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۳). همچنین سیتوکین-های پیش التهابی عملکرد سلول‌های نفرون‌ها را مهار می‌کنند (۳۳). نشان داده شده است که سلول‌های پروگزیمال توبولی نسبت به سایر بخش های نفرون نسبت به LPS حساس‌تر هستند (۵). ناحیه پروگزیمال نقش مهمی در جذب و ترشح کلیوی دارد (۲۱).



Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



علاوه بر این، سپسیس باعث افزایش انقباض عروق در کلیه‌ها و تشدید آسیب حاد کلیوی می‌شود (۱۰).

نتایج ما نشان داد که تزریق LPS مقادیر MDA را در بافت کلیه افزایش می‌دهد. این داده‌ها، همراستا با گزارش‌های دیگری است که نشان می‌دهند که مقادیر MDA در موش‌های تحت درمان با LPS افزایش می‌یابد. افزایش MDA ممکن است با افزایش انقباض عروق، التهاب یا استرس اکسیداتیو مرتبط باشد. نشان داده شده است که فعالیت منقبض کننده LPS در عروق باعث کاهش جریان خون کلیوی و ایجاد شرایط ایسکمیک می‌شود (۳۳). در چنین شرایطی رادیکال‌های آزاد تولید شده و باعث پراکسیداسیون لیپیدی و تشکیل MDA می‌شوند (۱۶). از سوی دیگر، سیتوکین‌های پیش التهابی مختلف به طور قابل توجهی در آسیب حاد کلیوی افزایش می‌یابند که نقش آنها را در افزایش شرایط التهابی نشان می‌دهد. مشخص شده است که TNF-α و IL-1β با آسیب گسترده لوله کلیوی مرتبط هستند و نقش مهمی در پاتوژنز التهاب کلیه دارند (۲۳). همچنین نشان داده شده است که LPS با افزایش IL-1β، استرس اکسیداتیو را در بافت‌های التهابی تقویت می‌کند (۲۳). بنابراین، اثر LPS بر مقادیر IL-1β در مطالعه ما مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطح IL-1β در موش‌های تحت درمان با LPS افزایش یافته و همچنین ارتباط مثبتی بین IL-1β و MDA نیز وجود دارد. ثابت شده است که LPS به TLR4 متصل شده و سیتوکین‌های پیش التهابی، به ویژه IL-1β را افزایش می‌دهد که نقش کلیدی در آسیب حاد کلیوی ایفا می‌کند (۶).

فعال شدن TLR4 در شروع و انتشار التهاب و آسیب اندام مهم است. بنابراین، مسدود ساختن TLR4 با کاهش سیتوکین‌های پیش التهابی، آسیب کلیه ناشی از LPS را کاهش می دهد (۹). فعال‌کردن TLR4 باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که با اختلال در غشای سلولی، شکستن رشته‌های DNA یا غیرفعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز و SOD، باعث آسیب بافتی می‌شود (۱۱). لذا مهار سیتوکین‌های التهابی ممکن است از کلیه در برابر آسیب حاد کلیوی ناشی از LPS محافظت کند (۲۴). بنابراین داروهای ضد التهابی جدید در هنگام سپسیس مفید خواهند بود. نتایج ما نشان داد که کارواکرول باعث کاهش قابل توجهی در سطوح IL-1β در مقایسه با گروه تحت درمان با LPS می‌گردد. این یافته با تحقیقات دیگری مطابقت دارد که نشان داده‌اند کارواکرول نه تنها بیان ژن TLR4 را کاهش می‌دهد (۲۰)، بلکه باعث کاهش ترشح مقادیر سیتوکین‌های التهابی مانند TNF-α و IL-1β می‌شود (۲۲). علاوه بر این، کارواکرول آگونیست گیرنده‌های TRPA1 است که در کلیه بیان می‌شود (۳۹). همچنین Zhu و همکاران نشان داده‌اند که فعال‌سازی TRPA1 از آسیب حاد کلیوی ناشی از LPS جلوگیری و بقا را در موش افزایش می‌دهد (۸، ۴۲).

برای تعیین نقش محافظتی کارواکرول در برابر استرس اکسیداتیو ناشی ازLPS، مقادیر MDA، SOD، کاتالاز و تیول تام را در بافت کلیه اندازه‌گیری شد. مشاهده شد که کارواکرول تشکیل MDA را کاهش داده و فعالیت آنزیم‌های SOD، کاتالاز و مقادیر گروه‌های تیول تام را در کلیه موش‌های تحت درمان با LPS افزایش می‌دهد. چندین مطالعه نتایج ما را تایید می‌کنند (۲۶). کارواکرول باعث کاهش مقادیر MDA در مغز موش‌های تحت درمان با LPS می‌شود و فعالیت آنزیم‌های SOD و کاتالاز را بهبود می‌بخشد (۳۲). کاهش MDA تا حدی به اثر گشادکنندگی عروقی کارواکرول نیز مربوط می‌شود. به نظر می‌رسد که اثر گشادکنندگی عروقی کارواکرول باعث کاهش انقباض عروق ناشی از LPS و جلوگیری از شرایط ایسکمیک



Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



می‌شود (۲). همچنین اثر محافظت کننده‌ی کارواکرول ممکن است با فعال شدن مسیر آنتی اکسیدانی نیز مرتبط باشد (۱۹).

برای نشان دادن اثر کارواکرول بر دفاع آنتی اکسیدانی، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی، فعالیت‌های SOD و کاتالاز و سطح آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی، گروه-های تیول تام را اندازه‌گیری شد. عدم تعادل بین سد دفاع آنتی‌اکسیدانی درون‌زا و استرس اکسیداتیو اغلب با کاهش همزمان مقدار گروه‌های تیول کل مرتبط بوده و نیز با کاهش همزمان فعالیت SOD و کاتالاز همراه است. نتایج داد که بین سطح MDA با IL-1β و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به ترتیب، همبستگی مثبت و منفی وجود دارد. تجویز LPS باعث کاهش قابل توجهی از گروه‌های تیول تام و کاهش فعالیت SODو کاتالاز گردید، در حالی که تیمار با کارواکرول به طور قابل توجهی فعالیت آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشید و از کاهش گروه‌های تیول جلوگیری کرد. به نظر می‌رسد که کارواکرول استرس اکسیداتیو ناشی از LPS را در بافت کلیه کاهش می‌دهد که به خواص آنتی‌اکسیدانی قوی و مهار رادیکال‌های آزاد این ترکیب نسبت داده می‌شود. دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی قوی کارواکرول به وجود یک گروه فنلی در ساختار شیمیایی آن مربوط است که مسئول خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و تقویت آنتی‌اکسیدان‌های درون زا در برابر اثرات مضر رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۳۶). همچنین اثرات محافظت کننده کارواکرول به مهار آنزیم‌های کاسپاز ۳ و نیتریک اکسید سنتاز و همچنین کمک به تنظیم بهتر کلسیم در سلول‌ها نسبت داده شده است (۳۶). بنابراین، هر یک از این مکانیسم‌ها ممکن است در نتایج بدست آمده دخیل باشد و نیاز به بررسی بیشتر در آینده دارد.

## نتیجه‌گیری

داده‌های ارائه شده نشان می‌دهند که کارواکرول از آسیب حاد کلیوی ناشی از LPS را از طریق کاهش سیتوکین IL-1β پیش التهابی و استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کند. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که کارواکرول ممکن است برای درمان سپسیس بکار رفته و در کاهش اثرات ناشی از آن در آسیب حاد کلیوی مفید باشد.

## منابع


1. Aragno M., Cutrin J.C., Mastrocola R., Perrelli M-G, Restivo F, Poli G, et al. 2003. Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: attenuation by dehydroepiandrosterone. *Kidney International*, 64(3):836-843.

2. Aydin Y, Kutlay Ö, Ari S, Duman S, Uzuner K, Aydin S. 2007. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta medica*, 73(13):1365-1371.

3. Baylis C, Mitruka B, Deng A. 1992. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *The Journal of clinical investigation*, 90(1):278-81.

4. Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, 2(10):907-916.

5. Bussolati B, David S, Cambi V, Tobias PS, Camussi G. 2002. Urinary soluble CD14 mediates human proximal tubular epithelial cell injury induced by LPS. *International Journal of Molecular Medicine*, 10(4):441-449.

6. Chen Y, Jin S, Teng X, Hu Z, Zhang Z, Qiu X, et al. 2018. Hydrogen sulfide attenuates LPS-induced acute kidney injury by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018: 6717212.

7. Faas M, Schuiling G, Valkhof N, Baller J, Bakker W. 1998. Superoxide–Mediated




Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



16.Hsu SP, Chen CC, Chien CT. 2016. Pretreatment of Sialic Acid Efficiently Prevents Lipopolysaccharide-Induced Acute Renal Failure and Suppresses TLR4/gp91-Mediated Apoptotic Signaling. *Kidney and Blood Pressure Research*, 41(3):267-277.

17.Ilçe F, Gök G, Pandir D. 2019. Acute effects of lipopolysaccharide (LPS) in kidney of rats and preventive role of vitamin E and sodium selenite. *Hum Exp Toxicol*, 38(5):547-560.

18.Jansen A, Cook T, Taylor GM, Largen P, Riveros-Moreno V, Moncada S, et al. 1994. Induction of nitric oxide synthase in rat immune complex glomerulonephritis. *Kidney International*, 45(4):1215-9.

19.Khalil A, Kovac S, Morris G, Walker MC. 2017. Carvacrol after status epilepticus (SE) prevents recurrent SE, early seizures, cell death, and cognitive decline. *Epilepsia*, 58(2):263-73.

20.Lee B, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH. 2020. Inhibitory effect of carvacrol on lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats. *The Korean journal of physiology and Pharmacology*, 24(1):27-37.

21.Liu M, Bing G. 2011. Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease. *Parkinson's Disease*, 11:327089.

22.Liu S, Song M, Yun W, Lee J, Kim H, Cho J. 2019. Effect of carvacrol essential oils on immune response and inflammation-related genes expression in broilers challenged by lipopolysaccharide. *Poultry science*, 98(5):2026-33.

23.Malis C, Bonventre J. 1986. Mechanism of calcium potentiation of oxygen free radical injury to renal mitochondria. A model for post-ischemic and toxic mitochondrial damage. *Journal of Biological Chemistry*, 261(30):14201-8.

24.Martínez M, Hernández AI, Martínez N. 2000. N-Acetylcysteine delays age-Glomerulopathy in the Endotoxin–Treated Pregnant Rat. *Kidney and Blood Pressure Research*, 21(6):432-437.

8. Fl Lin J, Lee T-S, Kou YR, Tarng D-C. 2021. Role of TRPA1 in Tissue Damage and Kidney Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7):3415.

9. Fu H, Hu Z, Di X, Zhang Q, Zhou R, Du H. 2016. Tenuigenin exhibits protective effects against LPS-induced acute kidney injury via inhibiting TLR4/NF-κB signaling pathway. *European Journal of Pharmacology*, 791:229-234.

10.Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. 1999. Influence of FR 167653, an inhibitor of TNF-alpha and IL-1, on the cardiovascular responses to chronic infusion of lipopolysaccharide in conscious rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 34(1):64-69.

11.Gill R, Tsung A, Billiar T. 2010. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(9):1121-32.

12.Goodman CW, Brett AS. 2017. Gabapentin and pregabalin for pain—is increased prescribing a cause for concern? *New England Journal of Medicine*, 377(5):411-4.

13.Hakimi Z, Salmani H, Marefati N, Arab Z, Gholamnezhad Z, Beheshti F, et al. 2020. Protective Effects of Carvacrol on Brain Tissue Inflammation and Oxidative Stress as well as Learning and Memory in Lipopolysaccharide-Challenged Rats. *Neurotox Research*, 37(4):965-976.

14.Hewett JA, Roth RA. 1993. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharides. *Pharmacological Reviews*, 45(4):381-411.

15.Hosseini M, Beheshti F, Anaeigoudari A. 2020, Improving Effect of Aminoguanidine on Lipopolysaccharide-Caused Kidney Dysfunction in Rats. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 31(5):1025-1033.



Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



32.Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F, Borji A. 2016. Protective Effects of Carvacrol against Oxidative Stress Induced by Chronic Stress in Rat's Brain, Liver, and Kidney. *Biochemistry Research International*, 2016:2645237.

33.Schor N. Acute renal failure and the sepsis syndrome. 2002. *Kidney International*, 61(2):764-76.

34.Shum H-P, Yan W-W, Chan TM. 2016. Recent knowledge on the pathophysiology of septic acute kidney injury: a narrative review. *Journal of Critical Care*, 31(1):82-9.

35.Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. 2015. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3):304-18.

36.Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A. 2005. Antioxidative activity of the essential oils of Thymus sipyleus subsp. sipyleus var. sipyleus and Thymus sipyleus subsp. sipyleus var. rosulans. *Journal of Food Engineering*, 66(4):447-54.

37.Uyanoglu M, Canbek M, Ceyhan E, Senturk H, Bayramoglu G, Gunduz O, et al. 2011. Preventing organ injury with carvacrol after renal ischemia/reperfusion. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(1):72-80.

38.White SB. 2011. Antibacterial efficacy of phosvitin, carvacrol, or nisin alone or combined against foodborne human enteric pathogens. *Chapter 1*:72-80.

39.Wu C-K, Lin J-F, Lee T-S, Kou YR, Tarng D-C. 2021. Role of TRPA1 in Tissue Damage and Kidney Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7):3415.

40.Yuan H, Perry CN, Huang C, Iwai-Kanai E, Carreira RS, Glembotski CC, et al. 2009. LPS-induced autophagy is mediated by oxidative signaling in cardiomyocytes and is associated with cytoprotection. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 296(2):470-479.

associated memory impairment in mice: role in synaptic mitochondria. *Brain Research*, 855(1):100-106.

25.Mir SM, Ravuri HG, Pradhan RK, Narra S, Kumar JM, Kuncha M, et al. 2018. Ferulic acid protects lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by suppressing inflammatory events and upregulating antioxidant defenses in Balb/c mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 100:304-315.

26.Mortazavi A, Mohammad Pour Kargar H, Beheshti F, Anaeigoudari A, Vaezi G, Hosseini M. 2021. The effects of carvacrol on oxidative stress, inflammation, and liver function indicators in a systemic inflammation model induced by lipopolysaccharide in rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 1-11.

27.Ngkelo A, Meja K, Yeadon M, Adcock I, Kirkham PA. 2012. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and Giα dependent PI-3kinase signalling. *Journal of Inflammation (London, England)*, 9(1):1.

28.Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1978. Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *Journal of Lipid Research*, 19(8):1053-7.

*29.*Yi Li and Schell h. 2007. Rapid kinetic microassay for catalase activity. *Journal of biomolecular techniques*, 19(8):185-7.

30.Ozer EK, Goktas MT, Toker A, Bariskaner H, Ugurluoglu C, Iskit AB. 2017. Effects of carvacrol on survival, mesenteric blood flow, aortic function and multiple organ injury in a murine model of polymicrobial sepsis. *Inflammation*, 40(5):1654-63.

31.Salmaninejad A, Kangari P, Shakoori A. 2017. Oxidative stress: development and progression of breast cancer. *Tehran University Medical Journal TUMS Publications*, 75(1):1-9.



Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



protects against sepsis-induced kidney injury by modulating mitochondrial biogenesis and mitophagy. *American Journal of Translational Researc*h, 10(12):4163.

41.Zhang C, Walker LM, Mayeux PR. 2000. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced oxidant stress in the rat kidney. *Biochemical Pharmacology*, 59(2):203):203-209.

42.Zhu J, Zhang S, Geng Y, Song Y. 2018. Transient receptor potential ankyrin 1



Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



# The Effect of Intraperitoneal Injection of Carvacrol Administration on Lipopolysaccharides-Induced Renal Oxidative Stress in Male Rats

**Alireza Mortazavi[1], Hossein Mohammadpour Kargar[1*], Farimah Beheshti[2,3], Gholamhasan Vaezi[1], Mahmoud Hosseini[4]**

1-Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
2-Neuroscience Research Center, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran
3-Department of Physiology, School of Paramedical Sciences, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran
4-Applied Biomedical Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

**Abstract**

Carvacrol is a natural monoterpene phenol which retains significant antibacterial, antifungal, anti-cancer and anti-inflammatory activity. However, the effect of carvacrol on oxidative stress in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury has not yet been reported. The present study aimed to investigate the protective effects of carvacrol on lipopolysaccharides-induced renal oxidative stress and inflammatory responses in male rats. Male Wistar rats (weighing 200 to 250 g, n=7 each group) were divided into the following groups: 1) control, 2) LPS, 3) LPS+carvacrol 25 mg/kg, 4) LPS+carvacrol 50 mg/kg and 5) LPS+carvacrol 100 mg/kg. For inducing acute kidney injury, 1 mg/kg LPS was injected intraperitoneally for 2 weeks. Carvacrol was administered intraperitoneally 30 minutes prior LPS injection. After preparation of renal homogenates, levels of inflammatory cytokines IL-1β and oxidative stress indexes (malondialdehyde, total thiol, catalase and Superoxide dismutase activity) were detected by ELISA and spectrophotometric methods, respectively. Our results showed that LPS injection increased malondialdehyde and IL-1β while, it reduced total thiol, catalase and SOD activity in the renal tissue. But, pretreatment with carvacrol not only decreased malondialdehyde and IL-1β levels but also increased total thiol, catalase and SOD activity. Simple regression analysis revealed that MDA was positively correlated with IL-1β level). However, there was a significant negative correlation between MDA level and total thiol, SOD and CAT activities. Our results showed that carvacrol protects the kidney by reducing IL-1β and preventing oxidative stress in the renal tissue.

**Keywords:** Carvacrol, IL-1β, Oxidative Stress, Lipopolysaccharide, Acute Kidney Injury.



Archive of SID.ir