

ارزیابی کارایی ویتامین C در برابر آسیب های اکسیداتیو و آپوپتوز هیپاتوسیت های موش های تحت درمان با فنیل هیدرازین

حجت عنبر، رسول شهروز، علی شالیزار جلالی*، مزدک رازی

گروه علوم پایه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۱۲

چکیده:

زمینه و هدف: فنیل هیدرازین به عنوان یک ترکیب همولیتیک شناخته شده می تواند عوارض جانبی متعددی نظیر سمیت کبدی را سبب شود. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی کارایی احتمالی ویتامین C در برابر آسیب های اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از فنیل هیدرازین در کبد موش انجام پذیرفت.

روش بررسی: به منظور انجام این مطالعه تجربی تصادفی شده شاهد دار، تعداد ۳۲ موش نر بالغ به ۴ گروه هر کدام شامل ۸ موش تقسیم شدند. دو گروه از موش ها فنیل هیدرازین را به میزان ۶۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی هر ۴۸ ساعت به مدت ۳۵ روز دریافت نمودند. ویتامین C به میزان ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی به یک گروه از گروه های فوق ۴ ساعت قبل از تزریق فنیل هیدرازین تجویز گردید. گروه شاهد و گروهی که تنها ویتامین C را دریافت می نمود، نیز در نظر گرفته شد. ۲۴ ساعت پس از آخرین تیمار، نمونه های سرم و کبد جمع آوری شدند و به ترتیب جهت ارزیابی های بیوشیمیایی و هیستومورفومتریک و هیستوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند. داده های این مطالعه با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته ها: فنیل هیدرازین به شکل معنی داری ($P < 0/05$) موجب افزایش مقادیر سرمی آسپارات ترنس آمیناز، آلانین ترنس آمیناز، آلکالین فسفاتاز، لاکتات دهیدروژناز و مالون دی آلدئید و نیز کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانت تام، سوپر اکسید دیسموتاز و آلبومین سرم گردید. به علاوه، فنیل هیدرازین افزایش معنی داری ($P < 0/05$) را در آپوپتوز، قطر و قطر هسته هیپاتوسیت ها و تعداد سلول های کوپفر ایجاد کرد.

نتیجه گیری: به نظر می رسد ویتامین C به سبب دارا بودن فعالیت های آنتی اکسیدانت قادر به کاهش آسیب های اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از فنیل هیدرازین در کبد موش می باشد.

واژه های کلیدی: فنیل هیدرازین، ویتامین C، آپوپتوز، کبد، موش.

مقدمه:

گرفته می شد که عوارض جانبی متعددی همچون کم خونی همولیتیک، اختلالات عروقی، کبدی، کلیوی، تنفسی، دستگاه عصبی مرکزی و خود ایمن و بروز بدخیمی ها و ناهنجاری های ژنتیکی، کارایی درمانی این ماده را به شدت کاهش داده است (۱-۴). فنیل هیدرازین به واسطه افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن و پی ریزی تنش اکسیداتیو و پراکسیداسیون چربی ها،

فنیل هیدرازین یک ترکیب شیمیایی اکسیدانت واجد خواص همولیتیک می باشد که عمدتاً به عنوان واسطه شیمیایی در صنایع دارویی، کشاورزی، شیمیایی و آزمایشگاهی به شکل گسترده ای مورد استفاده قرار می گیرد (۱). این ترکیب که گزارشاتی مبنی بر وجود آن در برخی گیاهان خوراکی نیز به چشم می خورد، پیش تر جهت درمان تب و اختلالات خونی به کار

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی تصادفی شده شاهد دار، تعداد ۳۲ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر بالغ با وزن ۲۵-۲۰ گرم از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. حیوانات پیش از آغاز مطالعه به مدت دو هفته به شرایط محیطی عادت داده شدند و متعاقباً در قفس هایی از جنس پلی کربنات در دمای 25 ± 2 درجه سانتی گراد و تحت چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آزاد به آب و غذای فشرده مخصوص حیوانات آزمایشگاهی در طول مطالعه نگهداری شدند. تمامی موارد اخلاقی مربوط به کار با حیوانات آزمایشگاهی در جریان انجام این مطالعه بر اساس دستورالعمل های مصوب کمیته اخلاق دانشکده صورت پذیرفت و حیوانات به صورت تصادفی به ۴ گروه ۸ سری به شرح زیر تقسیم شدند:

حیوانات گروه شاهد روزانه ۰/۱ میلی لیتر به صورت داخل صفاقی سرم فیزیولوژی دریافت نمودند. در گروه فنیل هیدرازین، حیوانات فنیل هیدرازین (Sigma-Aldrich, USA) را به میزان ۶۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی هر ۴۸ ساعت که قادر به القاء کم خونی همولیتیک می باشد، دریافت کردند (۲۳). در گروه فنیل هیدرازین + ویتامین C، حیوانات علاوه بر فنیل هیدرازین، ویتامین C (داروپخش، ایران) را نیز به میزان ۲۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی ۴ ساعت قبل از تجویز فنیل هیدرازین دریافت نمودند (۲۴). در گروه ویتامین C، حیوانات ویتامین C را به میزان ۲۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. این مطالعه ۳۵ روز به طول انجامید.

تمامی حیوانات موجود در ۴ گروه ذکر شده ۲۴ ساعت پس از آخرین تیمار، آسان کشی شدند و نمونه های خون توسط سرنگ های استریل به صورت

زمینه آسیب سلولی و افزایش میزان آپوپتوز را فراهم می آورد (۶،۵). مطالعات پیشین همچنین نشان داده ند که فنیل هیدرازین از طریق اختلال در عملکرد سیتوکروم P-450 میکروزومی کبد و نیز تغییرات ژنتیکی ناشی از کم خونی همولیتیک موجب آسیب های کبدی می گردد (۸،۷). از سوی دیگر، کم خونی همولیتیک ناشی از فنیل هیدرازین سبب افزایش فعالیت خون سازی و ذخیره آهن در بافت ها می گردد که مقادیر بالای آهن بافتی، تشدید تولید گونه های فعال اکسیژن را در پی خواهد داشت (۹،۱۰). در همین راستا، مطالعات متعددی نیز بر نقش اختلالات خون رسانی کبد در بروز آسیب در سایر اندام ها نظیر کلیه، ریه و قلب و افزایش میزان مرگ در بیماران صحه می گذارند (۱۱،۱۲).

تا به امروز بررسی های متعددی کارایی ترکیبات واجد ویژگی های آنتی اکسیدانت را در برابر آسیب های کبدی در حیوانات آزمایشگاهی و انسان به تأیید رسانده است (۱۳). ویتامین C یا اسید آسکوربیک به عنوان یکی از مهم ترین ترکیبات آنتی اکسیدانت محلول در آب در بدن انسان و حیوانات و نیز فراوان ترین آنتی اکسیدانت موجود در گیاهان، نقشی بارز در کاهش تنش های اکسیداتیو و حفاظت از ساختارهای سلولی در برابر آسیب های پراکسیداتیو ایفاء می کند (۱۶-۱۴). اثرات حفاظتی این ماده واجد اثرات کاهندگی که کوفاکتوری ضروری جهت بسیاری از فرآیندهای بیوشیمیایی محسوب می گردد، بر روی دستگاه های تولید مثلی، عصبی، ایمنی، ادراری و قلبی- عروقی مورد تأیید قرار گرفته است (۱۹-۱۶). علاوه بر این، مطالعات اخیر نیز از نقش ویتامین C در کاهش اختلالات کبدی و مهار روند آپوپتوز حکایت دارند (۲۲-۲۰).

بر این اساس، هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات محافظتی احتمالی ویتامین C در برابر آسیب های اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از فنیل هیدرازین در کبد موش می باشد.

هپاتوسیت ها و نیز تعداد سلول های کوپفر در واحد سطح کبد، میکروسکوپ دیجیتالی Dino-Lite (Dino-Lite Digital Microscope, AnMo Electronics Corporation, Taiwan) مورد استفاده قرار گرفت. به منظور ارزیابی میزان آپوپتوز در هپاتوسیت ها نیز روش رنگ آمیزی تشخیصی تانل بر اساس دستورالعمل سازنده کیت (In situ Direct DNA Fragmentation (TUNEL) (Assay Kit, Abcam, Germany) صورت پذیرفت. در این روش، هسته سلول های آپوپتوتیک با رنگ قهوه ای تیره مشخص می شوند و ضریب آپوپتوزی به صورت تعداد هپاتوسیت های تانل مثبت به ازای هر ۱۰۰ سلول تعریف گردید.

داده های این مطالعه با استفاده از بسته نرم افزاری SPSS مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند. جهت مقایسه بین گروه ها آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن تست تعقیبی دانکن مورد استفاده قرار گرفت و مقدار $P < 0/05$ برای تعیین سطح معنی داری بین گروه ها در نظر گرفته شد.

یافته ها:

مطالعه نتایج ارزیابی های هیستومورفومتریک بافت کبد آشکار ساخت که تجویز فنیل هیدرازین سبب افزایش معنی داری در قطر هپاتوسیت ها، قطر هسته هپاتوسیت ها و تعداد سلول های کوپفر در یک میلی متر مربع بافت کبد نسبت به گروه شاهد گردید ($P < 0/05$). قطر هسته هپاتوسیت ها و تعداد سلول های کوپفر در گروه دریافت کننده فنیل هیدرازین به همراه ویتامین C کاهش معنی داری را در مقایسه با گروه فنیل هیدرازین نشان می داد ($P < 0/05$)؛ ولی کاهش قطر هپاتوسیت ها در این گروه در مقایسه با گروه دریافت کننده فنیل هیدرازین معنی دار نبود (جدول شماره ۱).

مستقیم از قلب جمع آوری گردیدند. جهت استحصال سرم، نمونه ها در ۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از کالبدگشایی، نمونه های بافتی کبد با رعایت اصول استریل برداشت و جهت ثبوت به محلول ثبوتی فرمالین ۱۰٪ منتقل شدند.

فعالیت های سرمی آسپاراتات ترنس آمیناز (AST)، آلانین ترنس آمیناز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و آلومین با استفاده از کیت های بیوشیمیایی مورد سنجش قرار گرفت.

به منظور ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانت تام سرم، روش FRAP مورد استفاده قرار گرفت. در این روش در pH اسیدی ایجاد شده توسط بافر استات، رنگ آبی تولید شده به واسطه احیای یون های فریک (Fe^{+3}) کمپلکس Fe^{+3} -TPTZ و تبدیل آن ها به یون های فرو (Fe^{+2})، در طول موج ۵۹۳ نانومتر و به صورت اسپکتروفتومتریک مورد اندازه گیری قرار می گیرد (۲۵).

جهت تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدی، مقادیر تولید مالون دی آلدئید (MDA) در نمونه های سرمی بر اساس واکنش با اسید تیوباریتوریک و تولید محصولی رنگی با حداکثر جذب نوری در ۵۳۲ نانومتر مورد اندازه گیری قرار گرفت و بر اساس منحنی کالیبراسیون استاندارد MDA محاسبه گردید (۲۶).

نمونه های بافتی کبد پس از ثبوت، به همراه مشخصات درون ظروف مخصوص قرار گرفته و متعاقب طی مراحل پاساژ بافتی، با استفاده از پارافین مذاب قالب گیری شدند؛ سپس، با استفاده از دستگاه میکروتوم برش هایی به ضخامت ۷ میکرومتر از قالب های پارافینی تهیه گردید و در نهایت رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین جهت رنگ آمیزی نمونه ها مورد استفاده قرار گرفت. جهت مطالعه قطر هپاتوسیت ها، قطر هسته

جدول شماره ۱: مقایسه فراسنجه های هیستومورفومتریک بافت کبد در گروه های مختلف آزمایشی

گروه ها	قطر هپاتوسیت ها (میکرومتر)	قطر هسته هپاتوسیت ها (میکرومتر)	تعداد سلول های کوپفر (یک میلی متر مربع)
شاهد	۱۲/۹۴±۱/۰۱	۵/۱۲±۰/۴۲	۶/۱۳±۱/۵۴
فنیل هیدرازین	۱۶/۸۶±۱/۳۷a	۸/۱۸±۰/۶۶a	۱۴/۶۹±۳/۱۱a
	P=۰/۰۱۷	P=۰/۰۰۱	P=۰/۰۰۳
فنیل هیدرازین + ویتامین C	۱۴/۷۱±۱/۲۲	۶/۵۳±۰/۳۹ab	۸/۹۲±۱/۴۰b
		aP=۰/۰۳۳	P=۰/۰۲۹
		bP=۰/۰۱۵	
ویتامین C	۱۳/۱۲±۱/۱۷b	۵/۳۳±۰/۴۶b	۶/۵۵±۱/۲۴b
	P=۰/۰۲۱	P=۰/۰۰۱	P=۰/۰۰۴

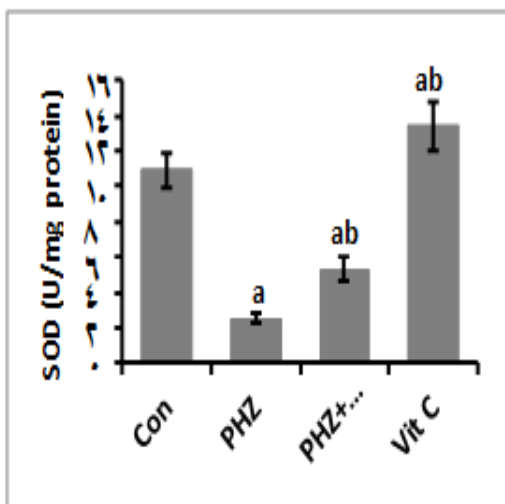
داده ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده اند؛ *a* وجود اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شاهد ($P < 0/05$)؛
b وجود اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه فنیل هیدرازین ($P < 0/05$).

در مقایسه با گروه شاهد، تجویز فنیل هیدرازین در مقایسه با ویتامین C همراه با فنیل هیدرازین سطوح شاخص های به شکل معنی داری موجب افزایش سطوح سرمی سرمی به استثنای آلومین را به صورت معنی داری AST، ALT، ALP و LDH و کاهش مقادیر سرمی آلومین در موش ها گردید ($P < 0/05$). تجویز

جدول شماره ۲: مقایسه فراسنجه های سرمی در گروه های مختلف آزمایشی

گروه ها	AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (U/l)	LDH (U/l)	آلبومین (g/dl)
شاهد	۵۹/۵۲±۶/۶۸	۳۳/۴۰±۴/۰۹	۹۶/۲۷±۱۲/۳۰	۴۳۹/۰۱±۶۱/۲	۲/۲۵±۰/۳۱
فنیل هیدرازین	۱۳۱/۲۳±۸/۲۳a	۸۲/۸۱±۶/۸۹a	۱۱۶/۳۹±۱۷/۱۴a	۸۹۱/۸۲±۷۳/۱۷a	۱/۴۱±۰/۲۱a
	P=۰/۰۰۱	P=۰/۰۰۱	P=۰/۰۲۸	P=۰/۰۰۱	P=۰/۰۴۳
فنیل هیدرازین + ویتامین C	۱۰۳/۷۲±۱۳/۰۲ab	۶۴/۱۷±۶/۱۶ab	۱۳۰/۸۱±۱۲/۵۴ab	۶۴۳/۲۷±۵۹/۳۲ab	۱/۷۷±۰/۶۳
	aP=۰/۰۰۱	aP=۰/۰۰۲	aP=۰/۰۱۹	aP=۰/۰۲۸	
	bP=۰/۰۲۱	bP=۰/۰۲۹	bP=۰/۰۳۱	bP=۰/۰۱۰	
ویتامین C	۶۲/۶۷±۵/۰۴b	۳۵/۶۳±۷/۶۷b	۹۱/۲۷±۱۷/۹۳b	۴۵۱/۵۴±۸۱/۰۹b	۲/۴۸±۰/۴۳b
	P=۰/۰۰۱	P=۰/۰۰۱	P=۰/۰۲۲	P=۰/۰۰۱	P=۰/۰۳۹

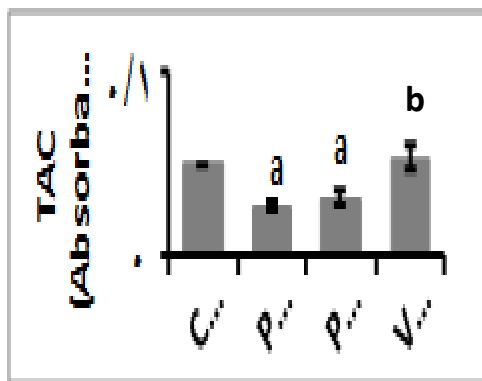
U/l: واحد بین المللی بر لیتر، g/dl: گرم بر دسی لیتر؛ داده ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده اند؛ *a* وجود اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شاهد ($P < 0/05$)؛ *b* وجود اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه فنیل هیدرازین ($P < 0/05$).



نمودار شماره ۲: مقایسه میانگین میزان سوپر اکسید

دیسموتاز در سرم گروه های مختلف آزمایشی

PHZ فنیل هیدرازین، ویتامین C، Con. شاهد؛ SOD سوپر اکسید دیسموتاز، U/mg protein واحد بین المللی بر میلی گرم پروتئین؛ داده ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده اند؛ a وجود اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شاهد ($P < 0.001$)؛ b وجود اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه فنیل هیدرازین ($P < 0.001$).



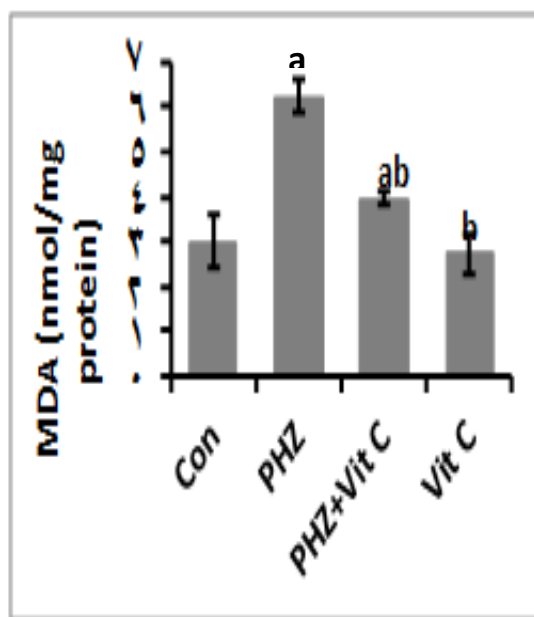
نمودار شماره ۳: مقایسه میانگین میزان ظرفیت آنتی

اکسیدانت تام سرم در گروه های مختلف آزمایشی

PHZ فنیل هیدرازین، ویتامین C، Con. شاهد؛ TAC: ظرفیت آنتی اکسیدانت، Absorbance 593 nm طول موج جذبی ۵۹۳ نانومتر؛ داده ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده اند؛ a وجود اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شاهد ($P < 0.001$)؛ b وجود اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه فنیل هیدرازین ($P < 0.001$).

بررسی های بیوشیمیایی سرمی صورت گرفته

در گروه های مختلف آزمایشی همچنین مشخص نمود که متعاقب تجویز فنیل هیدرازین، میزان MDA (نمودار شماره ۱) افزایش و میزان SOD (نمودار شماره ۲) و ظرفیت آنتی اکسیدانت تام (نمودار شماره ۳) کاهش معنی داری ($P < 0.05$) را در مقایسه با گروه شاهد نشان می دهند.



نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین میزان مالون دی

آلدئید در سرم گروه های مختلف آزمایشی

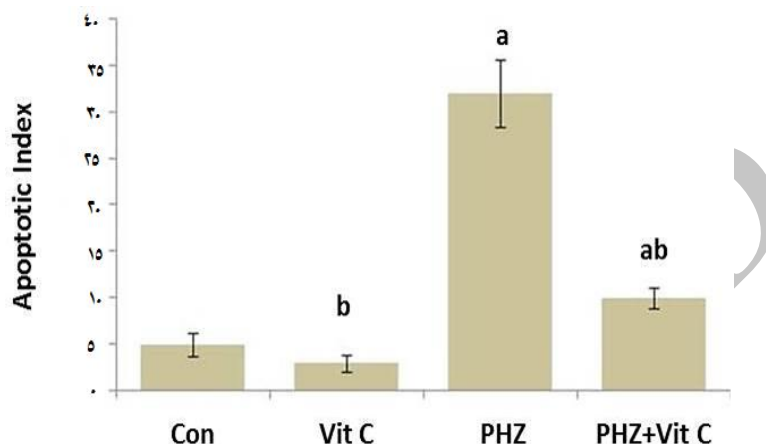
PHZ فنیل هیدرازین، ویتامین C، Con. شاهد؛ MDA مالون دی آلدئید، nmol/mg protein نانو مول بر میلی گرم پروتئین؛ داده ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده اند؛ a وجود اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شاهد ($P < 0.001$)؛ b وجود اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه فنیل هیدرازین ($P < 0.001$).

تجویز ویتامین C همراه با فنیل هیدرازین کاهش

معنی داری ($P < 0.05$) در میزان MDA (نمودار شماره ۱) و در عین حال افزایش معنی داری ($P < 0.05$) در میزان SOD (نمودار شماره ۲) را در مقایسه با گروهی که تنها فنیل هیدرازین را دریافت کرده بودند، موجب گردید.

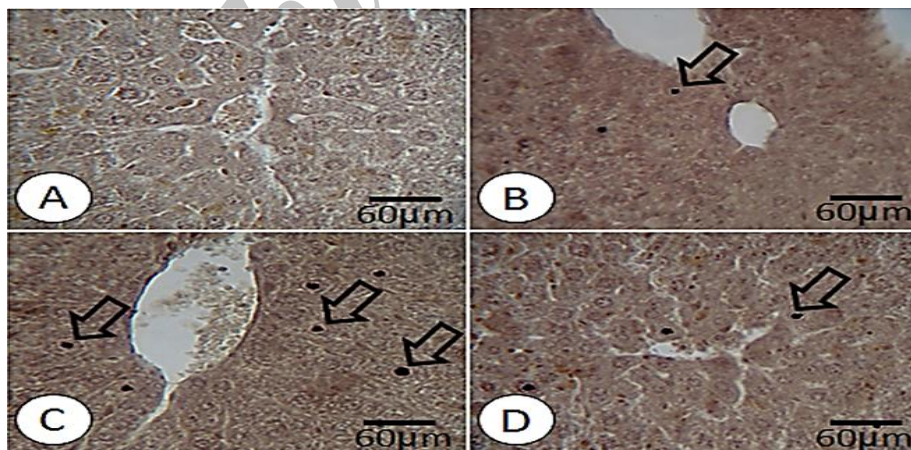
مطالعه هیستوشیمیایی به روش تانل در راستای ارزیابی میزان سلول های کبدی آپوپتوتیک مشخص ساخت که تجویز فنیل هیدرازین افزایش معنی داری ($P < 0/05$) را در میانگین تعداد هپاتوسیت های آپوپتوتیک بافت کبد موش ها در مقایسه با گروه شاهد موجب

می گردد (نمودار شماره ۴ و تصویر شماره ۱C). تجویز ویتامین C همراه با فنیل هیدرازین کاهش معنی داری ($P < 0/05$) را در میزان سلول های کبدی آپوپتوتیک در مقایسه با گروهی که تنها فنیل هیدرازین را دریافت کرده بودند، سبب گردید (نمودار شماره ۴ و تصویر شماره ۱D).



نمودار شماره ۴: مقایسه میانگین ضریب آپوتوزی در گروه های مختلف آزمایشی

PHZ: فنیل هیدرازین، Vit C: ویتامین C، Con: شاهد، Apoptotic Index ضریب آپوتوزی؛ داده ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده اند؛ a وجود اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شاهد ($P < 0/001$)؛ b وجود اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه فنیل هیدرازین ($P < 0/001$).



تصویر شماره ۱: برش عرضی از بافت کبد

در گروهی که تنها فنیل هیدرازین دریافت کرده بودند (C) افزایش محسوسی در تعداد هپاتوسیت های آپوپتوتیک (پیکان ها) در مقایسه با گروه شاهد (A) و گروهی که تنها ویتامین C دریافت نمودند (B)، مشهود می باشد. تجویز ویتامین C همراه با فنیل هیدرازین (D) کاهش قابل توجهی را در میزان سلول های کبدی آپوپتوتیک در مقایسه با گروهی که تنها فنیل هیدرازین دریافت کرده بودند، موجب شد. رنگ آمیزی تانل.

بحث:

جایگاه ویژه کبد به عنوان یک اندام کلیدی که علاوه بر ذخیره سازی و تولید مواد مغذی، در سم زدایی و متابولیسم ترکیبات سمی نیز نقش مهمی ایفاء می کند، ارزیابی شاخص های عملکردی و ساختارهای سلولی این اندام را به ویژه در مدل های حیوانی بسیار مورد توجه قرار داده است (۲۷). مطالعات پیشین نشان داده است که فنیل هیدرازین به عنوان یک ترکیب اکسیدانت همولیتیک به واسطه افزایش تولید رادیکال های آزاد در جریان اکسیداسیون میکروزمی و نیز افزایش رسوب آهن ناشی از کم خونی همولیتیک در بافت کبد می تواند موجب آسیب های اکسیداتیو در هپاتوسیت ها گردد (۲۸،۷). بر این اساس، همانگونه که در مطالعه حاضر نیز مشاهده گردید، چنین به نظر می رسد که شکل گیری تش اکسیداتیو و نیز اختلال در متابولیسم آهن متعاقب تجویز فنیل هیدرازین موجبات آسیب سلولی و بروز تغییرات ساختاری در هپاتوسیت های موش را فراهم می آورد.

به خوبی مشخص شده است که سنجش فعالیت سرمی آنزیم های کبدی شاخص مناسبی جهت ارزیابی میزان آسیب های وارد شده به کبد می باشد، چرا که آسیب هپاتوسیت ها، نشأت این آنزیم ها به جریان خون و افزایش مقادیر سرمی آن ها را در پی خواهد داشت (۲۹). به نظر می رسد که اختلالات ساختاری و عملکردی غشاء هپاتوسیت ها در نتیجه هجوم گونه های فعال اکسیژن که به موجب تداخل ترکیبات حاصل از متابولیسم فنیل هیدرازین با دستگاه دفاع آنتی اکسیدانت بدن تولید می گردند، نشأت آنزیم های کبدی به جریان خون موش های تحت درمان با این ترکیب را در مطالعه حاضر سبب شده باشد. همچنان که مطالعات صورت پذیرفته در این راستا نیز بر نقش آسیب های سلولی ناشی از ترکیبات شیمیایی در بروز اختلالات عملکردی کبد، افزایش مقادیر سرمی آنزیم های کبدی و نیز تضعیف دستگاه دفاع آنتی اکسیدانت این اندام صحه می گذارند (۳۰-۳۲).

از سوی دیگر، مطالعات متعددی بر نقش آسیب های کبدی در بروز تغییرات مورفولوژیک و مورفومتریک در هپاتوسیت ها نظیر هایپرتروفی و افزایش قطر هسته صحنه می گذارند که این امر با یافته های حاصل از ارزیابی های بافت شناسی مطالعه حاضر نیز هم خوانی دارد و می تواند بازتابی از افزایش فعالیت هپاتوسیت ها در پاسخ به جراحات دژنراتیو باشد (۳۳-۳۵).

علاوه بر این، سلول های کوپفر به عنوان فراوان ترین سلول های ایمنی ذاتی در بافت کبد، در پاتوژنز بسیاری از نارسایی ها و اختلالات کبدی نقش بارزی ایفاء می کنند (۳۶). فعال شدن این سلول ها متعاقب آسیب های کبدی منجر به آزاد سازی واسطه های آماسی و نیز گونه های فعال اکسیژن می گردد که این امر موجب تشدید جراحات کبدی می شود (۳۷). از این روی، بر اساس نتایج بافت شناسی مطالعه حاضر، به نظر می رسد که افزایش تزايد و فعال شدن سلول های کوپفر نیز می تواند در آسیب های کبدی ناشی از فنیل هیدرازین نقشی قابل ملاحظه داشته باشد.

همچنین، کم خونی همولیتیک ناشی از فنیل هیدرازین با افزایش میزان هم داخل عروقی همراه است که این تجمع غیر طبیعی هم آزاد در داخل عروق خونی، زمینه ساز آسیب های سلولی و افزایش میزان آپوپتوز در سلول ها می گردد که این امر می تواند افزایش میزان آپوپتوز در هپاتوسیت های موش های دریافت کننده فنیل هیدرازین در مطالعه حاضر را توجیه نماید (۳۸،۳۹).

مطالعه حاضر نشان داد که ویتامین C سمیت کبدی ناشی از فنیل هیدرازین را به شکل قابل توجه ای بهبود می بخشد. نتایج به دست آمده از مطالعات پیشین در این زمینه نیز کارایی ترکیبات واجد خواص آنتی اکسیدانت و ضد آماسی را در کاهش سمیت ناشی از فنیل هیدرازین در بافت های مختلف از جمله کبد مورد

نتیجه گیری:

با جمع بندی یافته های مطالعه حاضر چنین بر می آید که فنیل هیدرازین به واسطه افزایش تولید رادیکال های آزاد، پی ریزی تنش های اکسیداتیو و نیز تضعیف دستگاه دفاع آنتی اکسیدانت بدن، موجب آسیب های سلولی و اختلالات عملکردی کبد می گردد. حال آن که ویتامین C به جهت دارا بودن فعالیت های آنتی اکسیدانت، ضد آماسی و ضد آپوپتوزی، قادر به بهبود عوارض سوء فنیل هیدرازین در کبد موش می باشد. با این وجود، تأیید کارایی درمانی ویتامین C در موارد بالینی کم خونی و مسمومیت های ناشی از فنیل هیدرازین مستلزم مطالعات گسترده تری است.

تشکر و قدردانی:

نگارندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه ارومیه به سبب حمایت های مالی از طرحی که این مطالعه در راستای آن انجام پذیرفت (پایان نامه کارشناسی ارشد، شماره ۱۱۷-۱۲)، اعلام می دارند.

تأیید قرار داده است (۴۰،۶،۵،۳). به نظر می رسد ویتامین C نیز به جهت دارا بودن فعالیت های آنتی اکسیدانت و ضد آپوپتوزی، به واسطه تقویت فعالیت دستگاه دفاع آنتی اکسیدانت بدن و کاهش پراکسیداسیون چربی ها، سرکوب واکنش های آماسی و نیز مهار آپوپتوز می تواند در بهبود نسبی آسیب های اکسیداتیو ناشی از فنیل هیدرازین در کبد موش واجد کارایی باشد (۴۱-۱۵،۲۲،۴۳). همچنان که مطالعات صورت گرفته اخیر نیز نشان می دهند که ویتامین C قادر به کاهش آسیب های سلولی در جراحات کبدی ایمونولوژیک موش می باشد (۲۰) و می تواند موجب بهبود جراحات کبدی ناشی از تترا کلرید کربن و واکنش های آماسی در موش و نیز منوسدیم گلوتامات در موش صحرائی گردد (۴۶-۴۴). در همین راستا، گزارش های دیگری نیز بر نقش ویتامین C در کاهش ضایعات هیستوپاتولوژیک ناشی از سرب در بافت کبد و نیز سمیت سلولی ناشی از سایپرترین در هیپاتوسیت های موش صحرائی صحه می گذارند (۴۷،۳۲).

منابع:

- Berger J. Phenylhydrazine haematotoxicity. *J Appl Biomed*. 2007; 5: 125-30.
- Pesquero J, Alfaro V, Palacios L. Acid-base analysis during experimental anemia in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2000; 78(10): 774-80.
- Luangaram S, Kukongviriyapan U, Pakdeechote P, Kukongviriyapan V, Pannangpetch P. Protective effects of quercetin against phenylhydrazine-induced vascular dysfunction and oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45(3): 448-55.
- Shukla P, Yadav NK, Singh P, Bansode FW, Singh RK. Phenylhydrazine induced toxicity: A review on its haematotoxicity. *Int J Basic Appl Med Sci*. 2012; 2(2): 86-91.
- Claro LM, Leonart MS, Comar SR, do Nascimento AJ. Effect of vitamins C and E on oxidative processes in human erythrocytes. *Cell Biochem Funct*. 2006; 24(6): 531-5.
- Sharma S, Haldar C. Comparative effect of melatonin and vitamin E on phenylhydrazine-induced toxicity in the spleen of *Funambulus pennanti*. *Environ Toxicol*. 2009; 24(1): 1-9.
- Jonen HG, Werringloer J, Prough RA, Estabrook RW. The reaction of phenylhydrazine with microsomal cytochrome P-450. Catalysis of heme modification. *J Biol Chem*. 1982; 257(8): 4404-11.
- Rokushima M, Omi K, Araki A, Kyokawa Y, Furukawa N, Itoh F, et al. A toxicogenomic approach revealed hepatic gene expression changes mechanistically linked to drug-induced hemolytic anemia. *Toxicol Sci*. 2007; 95(2): 474-84.

9. Latunde-Dada GO, Vulpe CD, Anderson GJ, Simpson RJ, McKie AT. Tissue-specific changes in iron metabolism genes in mice following phenylhydrazine-induced haemolysis. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1690(2): 169-76.
10. Poggiali E, Cassinerio E, Zanaboni L, Cappellini MD. An update on iron chelation therapy. *Blood Transfus*. 2012; 10(4): 411-22.
11. Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. *Liver Transpl*. 2005; 11(9): 1031-47.
12. Seifi B, Kadhodaee M, Delavari F, Mikaeili S, Shams S, Ostad SN. Pretreatment with pentoxifylline and N-acetylcysteine in liver ischemia reperfusion-induced renal injury. *Ren Fail*. 2012; 34(5): 610-5.
13. Duenschede F, Erbes K, Kircher A, Westermann S, Schad A, Riegler N, et al. Protection from hepatic ischemia/reperfusion injury and improvement of liver regeneration by alpha-lipoic acid. *Shock*. 2007; 27(6): 644-51.
14. Mandl J, Szarka A, Banhegyi G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol*. 2009; 157(7): 1097-110.
15. Boyacioglu M, Sekkin S, Kum C, Korkmaz D, Kiral F, Yalinkilinc HS, et al. The protective effects of vitamin C on the DNA damage, antioxidant defenses and aorta histopathology in chronic hyperhomocysteinemia induced rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2014; 66(9-10): 407-13.
16. Takhshid MA, Tavasuli AR, Heidary Y, Keshavarz M, Kargar H. Protective effect of vitamins e and C on endosulfan-induced reproductive toxicity in male rats. *Iran J Med Sci*. 2012; 37(3): 173-80.
17. May JM. Vitamin C transport and its role in the central nervous system. *Subcell Biochem*. 2012; 56: 85-103.
18. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(9): 685-98.
19. Tarladacalisir YT, Kanter M, Uygun M. Protective effects of vitamin C on cisplatin-induced renal damage: a light and electron microscopic study. *Ren Fail*. 2008; 30(1): 1-8.
20. Liang T, Chen X, Su M, Chen H, Lu G, Liang K. Vitamin C exerts beneficial hepatoprotection against Concanavalin A-induced immunological hepatic injury in mice through inhibition of NF-kappaB signal pathway. *Food Funct*. 2014; 5(9): 2175-82.
21. Allagui MS, Feriani A, Bouoni Z, Alimi H, Murat JC, El Feki A. Protective effects of vitamins (C and E) and melatonin co-administration on hematological and hepatic functions and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J Physiol Biochem*. 2014; 70(3): 713-23.
22. Lin JR, Qin HH, Wu WY, He SJ, Xu JH. Vitamin C protects against UV irradiation-induced apoptosis through reactivating silenced tumor suppressor genes p21 and p16 in a Tet-dependent DNA demethylation manner in human skin cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm*. 2014; 29(6): 257-64.
23. Gorustovich AA, Steimetz T, Giglio MJ, Guglielmotti MB. A histomorphometric study of alveolar bone modeling and remodeling under experimental anaemia and polycythaemia in rats. *Arch Oral Biol*. 2006; 51(3): 246-51.
24. Yu F, Wang Z, Ju B, Wang Y, Wang J, Bai D. Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Exp Toxicol Pathol*. 2008; 59(6): 415-23.
25. Jalali AS, Hasanzadeh S, Malekinejad H. Crataegus monogyna aqueous extract ameliorates cyclophosphamide-induced toxicity in rat testis: stereological evidences. *Acta Med Iran*. 2012; 50(1): 1-8.
26. Najafi G, Nejati V, Jalali AS, Zahmatkesh E. Protective role of royal jelly in oxymetholone-induced oxidative injury in mouse testis. *Iran J Toxicol*. 2014; 8(25): 1073-80.
27. Baratta JL, Ngo A, Lopez B, Kasabwalla N, Longmuir KJ, Robertson RT. Cellular organization of normal mouse liver: a histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochem Cell Biol*. 2009; 131(6): 713-26.

28. Ferrali M, Signorini C, Sugherini L, Pompella A, Lodovici M, Caciotti B, et al. Release of free, redox-active iron in the liver and DNA oxidative damage following phenylhydrazine intoxication. *Biochem Pharmacol.* 1997; 53(11): 1743-51.
29. Oboh G. Hepatoprotective property of ethanolic and aqueous extracts of fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*) leaves against garlic-induced oxidative stress. *J Med Food.* 2005; 8(4): 560-3.
30. Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med.* 2006; 354(7): 731-9.
31. Russmann S, Kullak-Ublick GA, Grattagliano I. Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. *Curr Med Chem.* 2009; 16(23): 3041-53.
32. Adikwu E, Deo O. Hepatoprotective effect of vitamin C (ascorbic acid). *Pharmacol Pharm.* 2013; 4: 84-92.
33. Kostka G, Palut D, Kopec-Szlezak J, Ludwicki JK. Early hepatic changes in rats induced by permethrin in comparison with DDT. *Toxicology.* 2000; 142(2): 135-43.
34. Vento S, Cainelli F. Does hepatitis C virus cause severe liver disease only in people who drink alcohol? *Lancet Infect Dis.* 2002; 2(5): 303-9.
35. Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr Biol.* 2012; 22(13): 1166-75.
36. Boltjes A, Movita D, Boonstra A, Woltman AM. The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *J Hepatol.* 2014; 61(3): 660-71.
37. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 2006; 26(10): 1175-86.
38. Moreau R, Tshikudi Malu D, Dumais M, Dalko E, Gaudreault V, Romero H, et al. Alterations in bone and erythropoiesis in hemolytic anemia: comparative study in bled, phenylhydrazine-treated and Plasmodium-infected mice. *PLoS One.* 2012; 7(9): e46101.
39. Khan AA, Quigley JG. Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1813(5): 668-82.
40. Valenzuela A, Guerra R. Protective effect of the flavonoid silybin dihemisuccinate on the toxicity of phenylhydrazine on rat liver. *FEBS Lett.* 1985; 181(2): 291-4.
41. Akbari A, Jelodar G, Nazifi S. Vitamin C protects rat cerebellum and encephalon from oxidative stress following exposure to radiofrequency wave generated by a BTS antenna model. *Toxicol Mech Methods.* 2014; 24(5): 347-52.
42. Rizzo MR, Abbatecola AM, Barbieri M, Vietri MT, Cioffi M, Grella R, et al. Evidence for anti-inflammatory effects of combined administration of vitamin E and C in older persons with impaired fasting glucose: impact on insulin action. *J Am Coll Nutr.* 2008; 27(4): 505-11.
43. García A, Morales P, Arranz N, Delgado ME, Rafter J, Haza AI. Antiapoptotic effects of dietary antioxidants towards N-nitrosopiperidine and N-nitrosodibutylamine-induced apoptosis in HL-60 and HepG2 cells. *J Appl Toxicol.* 2009; 29(5): 403-13.
44. Su M, Chen H, Wei C, Chen N, Wu W. Potential protection of vitamin C against liver-lesioned mice. *Int Immunopharmacol.* 2014; 22(2): 492-7.
45. Bae S, Cho CH, Kim H, Kim Y, Kim HR, Hwang YI, et al. In vivo consequence of vitamin C insufficiency in liver injury: vitamin C ameliorates T-cell-mediated acute liver injury in gulo(-/-) mice. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 19(17): 2040-53.
46. El-Meghawry El-Kenawy A, Osman HE, Daghestani MH. The effect of vitamin C administration on monosodium glutamate induced liver injury. An experimental study. *Exp Toxicol Pathol.* 2013; 65(5): 513-21.
47. Beheshti N, Ganji F, Sepeshri H. Effect of vitamin C and quercetin treatment on the liver histopathologic profile in congenital lead exposed male rat pups. *Physiol Pharmacol.* 2015; 19(1): 46-52.

Efficacy of vitamin C against oxidative damages and apoptosis in hepatocytes of mice treated with phenylhydrazine

Anbara H, Shahrooz R, Shalizar Jalali A*, Razi M
Basic Sciences Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran.
Received: 7/Mar/2015 Accepted: 3/Aug/2015

Background and aims: Phenylhydrazine (PHZ) as a well-known hemolytic agent can induce a variety of adverse effects including hepatotoxicity. The main aim of the present study was to examine the possible efficacy of vitamin C against PHZ-induced oxidative damages and apoptosis in mouse liver.

Methods: In this randomized controlled experimental study, 32 adult male mice were assigned to four groups of eight mice each. Two groups of mice received PHZ at a dose of 60 mg/kg per 48 hours intraperitoneally for 35 days. Vitamin C was administered to one of these groups at a dose of 250 mg/kg per day intraperitoneally four hours before PHZ injection. A vehicle-treated control group and a vitamin C-only treated group were also included. Serum and hepatic samples were collected 24 hours after the last treatment and subjected to biochemical and histomorphometric and histochemical examinations, respectively. The data were analyzed by one-way analysis of variance followed by Duncan test for post hoc comparisons.

Results: PHZ treatment caused a significant elevation ($P < 0.05$) in serum concentrations of aspartate transaminase, alanine transaminase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase and malonaldehyde and decreased serum level of total antioxidant capacity, superoxide dismutase and albumin. Moreover, PHZ significantly increased apoptosis and diameters of hepatocytes and their nuclei as well as number of Kupffer cells.

Conclusion: Vitamin C can modulate PHZ-induced oxidative injuries and apoptosis in mouse liver due to its antioxidant activities.

Keywords: Phenylhydrazine, Vitamin C, Apoptosis, Liver, Mouse.

Cite this article as: Anbara H, Shahrooz R, Shalizar Jalali A, Razi M. Efficacy of vitamin C against oxidative damages and apoptosis in hepatocytes of mice treated with phenylhydrazine. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 17(6): 62-72.

***Corresponding author:**

Basic Sciences Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran; Tel: 00989111166004,
E-mail: ali_shalizar@yahoo.com