

اثرات پودر دانه شنبلیله بر فاکتورهای اکسیدانی و آنتی اکسیدانی در آسیب کبدی ناشی از استامینوفن در موش‌های صحرایی نر

عقیله محمدزاده¹(MSc)، علی گل^{1*}(PhD)، حکیمه علومی²(PhD)

1- گروه آموزشی زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان
2- پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه اکولوژی، کرمان

دریافت: 93/8/20، اصلاح: 93/11/15، پذیرش: 94/2/16

خلاصه

سابقه و هدف: استامینوفن از طریق استرس اکسیداتیو می تواند منجر به آسیب کبدی شود. هدف از این مطالعه بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی پودر دانه شنبلیله بر فاکتورهای اکسیدانی و آنتی اکسیدانی در مسمومیت کبدی ناشی از استامینوفن می باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی 24 سر رت نر نژاد ویستار در محدوده وزنی 250-280 گرم به 4 گروه کنترل، نرمال سالین +پودر دانه شنبلیله، استامینوفن، استامینوفن +پودر دانه شنبلیله تقسیم شدند. بعد از 24 ساعت گرسنگی، گروه های نرمال و نرمال +پودر دانه شنبلیله، نرمال سالین و گروه های استامینوفن و استامینوفن + پودر دانه شنبلیله، استامینوفن با دوز 1000mg/kg به صورت گاوژ دریافت کردند. پس از گذشت 6 ساعت گروه های نرمال و استامینوفن، نرمال سالین و گروه های نرمال +پودر دانه شنبلیله و استامینوفن +پودر دانه شنبلیله، پودر دانه شنبلیله با دوز 1000mg/kg را به صورت گاوژ دریافت کردند. دوازده ساعت پس از گاوژ دوم، رت ها کشته شده و بافت کبدی، منجمد و بررسی گردید.

یافته ها: پودر دانه شنبلیله باعث کاهش میزان مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن نسبت به گروه استامینوفنی شد (به ترتیب $0/2608 \pm 0/0305$ و $1/56 \pm 0/15362$ در مقایسه با گروه استامینوفنی $6/7 \pm 0/34431$ و $2/38 \pm 0/10481$; $p < 0/001$ و $p < 0/05$). همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز نسبت به گروه استامینوفنی افزایش یافت (به ترتیب $19/07 \pm 3/3666$ و $1/174 \pm 0/2424$ در مقایسه با گروه استامینوفنی $8/108 \pm 2/46$ و $0/614 \pm 0/089$).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که پودر دانه شنبلیله می تواند سبب کاهش استرس اکسیداتیو در آسیب کبدی ناشی از استامینوفن شود.

واژه های کلیدی: دانه شنبلیله، استامینوفن، استرس اکسیداتیو، کبد، رت.

مقدمه

آسیب کبدی ناشی از دارو (DILI=Drug-induced liver injury) یکی از شایع ترین دلایل برای قطع مصرف دارو است و غالباً دلیل اصلی رد دارو برای کسب مجوز بازاریابی است. این مسئله یک چالش مهم برای پزشکان، مقامات بهداشت و شرکت های دارویی می باشد (1). در حالیکه بیش از 800 دارو با سمیت کبدی در ارتباط است، تاکنون شایع ترین علت DILI مصرف بیش از حد استامینوفن بوده است (2). استامینوفن (N-acetyl-p-aminophenol یا paracetamol) به عنوان داروی ضد درد و تب استفاده می شود. استامینوفن در سال 1955 به طور گسترده در ایالات متحده در دسترس قرار گرفت. در اواخر دهه 1990، در ایالات متحده استامینوفن به طور گسترده به عنوان یک عامل نارسایی حاد کبدی (ALF=Acute liver failure) به رسمیت شناخته نشده بود و تا آن زمان در پایگاه های اطلاعاتی ظاهر نشده بود. در سال 2005، Larson و همکاران گزارش دادند که استامینوفن 42% از تمام موارد ALF را به خود اختصاص داده است (3). به دنبال مصرف استامینوفن، 90% آن از طریق فاز دو

متابولیسم به متابولیت های غیر سمی تبدیل می شود. درصد کمی از استامینوفن (5-10%) به وسیله ایزومرهای 450CYP متابولیزه می شود که در نتیجه آن متابولیت سمی استامینوفن، N-استیل p-بنزوکوئینون ایمین (NAPQI) تولید می شود. در شرایط نرمال NAPQI به وسیله مزدوج شدن با گلوتاتیون سم زدایی می شود. در مسمومیت با استامینوفن به دنبال حذف گلوتاتیون سلولی، NAPQI به ماکرومولکول های سلولی باند می شود و به دنبال آن آسیب سلول کبدی و مرگ سلولی ایجاد می شود. عقیده بر این است که مسمومیت کبدی استامینوفن زمانی ایجاد می شود که ذخیره گلوتاتیون به کمتر از 30 درصد نرمال برسد. پس از به اتمام رسیدن ذخیره گلوتاتیون سلولی، متابولیت واکنش گر استامینوفن به تعداد قابل توجهی از پروتئین های میتوکندریایی و سیتوزولی متصل می شود. در پی آن، تنفس میتوکندریال مختل شده، سطح آدنوزین تری فسفات (ATP) سلول کبدی کاهش می یابد، و منفذ تراوایی انتقالی غشاء میتوکندری باز می شود و سیتوکروم C از میتوکندری آزاد می شود. چندین 450CYP می توانند استامینوفن را به

این مقاله حاصل پایان نامه عقیله محمدزاده دانشجوی رشته فیزیولوژی دانشگاه شهید باهنر کرمان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر علی گل

آدرس: کرمان، بلوار 22 بهمن دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی. تلفن: 034-33257432

E-mail: agol@mail.uk.ac.ir

گاواژ پودر دانه شنبلیله به آنها خوراندند شد. پس از گذشت 12 ساعت از گاواژ دوم و پس از بیهوش نمودن موش‌ها، سر حیوان توسط گیوتین قطع گردید.

در این مطالعه از دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار (Centrifuge 5804R) شرکت Eppendorf، دستگاه سانتریفوژ (شرکت Bio Chem آمریکا)، ترازوی دیجیتال (AND HR-200) جهت توزین دارو (استامینوفن) و پودر دانه شنبلیله با دقت 0/0001 گرم، ترازوی دیجیتال (AND EK1200) ساخت ژاپن برای توزین موش‌های صحرایی با دقت 0/01 گرم، فریزر -75 درجه سانتیگراد جهت نگهداری بافت‌ها و عصاره‌های بافتی برای سنجش و دستگاه اسپکتروفتومتری مدل Cary 50Varian ساخت کشور استرالیا استفاده شد.

سنجش فاکتورهای آنتی اکسیدانی: برای تهیه عصاره بافتی جهت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و پروتئین از روش Bradford استفاده شد (14). در این روش 0/5 گرم از بافت مورد نظر را برداشته و در 3 ml بافر فسفات mM 50 که حاوی 1 میلی مولار می‌باشد، هموژن می‌شود و سپس عصاره حاصل در دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار در 10000 g به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 (کاهش مقدار H_2O_2) در 240 nm و با روش Dhindsa و Motowe انجام شد (15). مخلوط واکنش شامل بافر فسفات mM 50 با pH=7 و پراکسید هیدروژن mM 15 می‌باشد. با اضافه کردن 100 میکرولیتر از عصاره بافتی به مخلوط ذکر شده، واکنش شروع می‌شود. تغییرات جذب، پس از شروع واکنش محاسبه گردید. میزان پراکسید هیدروژن موجود در مخلوط واکنش با استفاده از ضریب خاموشی $\epsilon=40 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گایاکول و اندازه‌گیری میزان جذب تترا گایاکول تشکیل شده از گایاکول در نتیجه فعالیت پراکسیداز در 470nm انجام گرفت. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات mM 50 با pH=7، پراکسید هیدروژن 0/3% و گایاکول 1% می‌باشد. واکنش با افزودن 20 میکرولیتر از عصاره آنزیمی به 2/5 ml مخلوط واکنش در 25 درجه سلسیوس آغاز گردید. با استفاده از تغییرات جذب و ضریب خاموشی تترا گایاکول $\epsilon=25.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ، مقدار تترا گایاکول تشکیل شده محاسبه شد (16). فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود در حجم مناسبی از عصاره به دست آمده از روش Bradford گزارش شد (14).

سنجش غلظت پروتئین: برای تهیه عصاره بافتی جهت سنجش کاتالاز، پراکسیداز و پروتئین از روش Bradford استفاده شد (14). در این روش 0/5 گرم از بافت مورد نظر را برداشته و در 3 ml بافر فسفات mM 50 هموژن می‌شود و سپس عصاره حاصل در دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار در 10000 g به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ می‌شوند. به منظور سنجش غلظت پروتئین، به لوله آزمایش مقدار 0/1 ml عصاره بافتی حاصل و 5 ml معرف بیوره افزوده و سریعاً ورتکس شد. پس از 25 دقیقه جذب آنها در طول موج 595 nm خوانده شد. به منظور تهیه بیوره، 0/1 گرم کوماسی بریلیانت بلو G250 در 50 ml اتانول 95% به مدت 1 ساعت حل گردید، سپس 100 میلی لیتر اسید فسفریک 85% قطره قطره به آن افزوده شد. در پایان حجم کل محلول به کمک آب مقطر به یک لیتر رسانده شد.

NAPQI تبدیل کنند که در این میان CYP2E1، CYP1A2 و CYP3A4 نقش برجسته‌ای را ایفا می‌کنند (4). از زمان ماقبل تاریخ، بسیاری از گیاهان دارویی در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گرفتند. این گیاهان برای هزاران سال در سراسر جهان به عنوان داروهای طبیعی دارای اثرات درمانی و دیگر اثرات فارماکولوژیک استفاده شده‌اند (5).

گیاهان دارویی حاوی میزان زیادی از آنتی اکسیدان‌ها می‌باشند که می‌توانند اکسیداسیون لیپیدها یا دیگر مواد را مهار یا به تأخیر اندازند (6). ترکیبات آنتی اکسیدانی گیاهان دارویی به آنتی اکسیدان‌های فنولی مانند اسیدهای فنولی، فلاونوئیدها، ترپن‌ها، توکوفرول، ویتامین C و گروهی از کاروتنوئیدها تعلق دارد (7). شنبلیله (Fenugreek) یکی از گیاهان غلافدار یکساله می‌باشد که دانه‌های آن حاوی 6-10% لیپید، 44-59% کربوهیدرات و 20-30% پروتئین می‌باشد (8و9). در مقایسه با دیگر بقولات، دانه‌ها حاوی نسبت‌های بالاتری از مواد معدنی است (Ca, P, Fe, Zn, Mn) (10).

همچنین دانه‌ها حاوی بعضی از اجزاء آروماتیک مانند n- آلکانها، ترپنها، نونالاکتون و سرشار از ساپونین می‌باشند (11). همچنین گزارش شده است که این دانه‌ها سرشار از فلاونوئیدهای پلی فنولیک می‌باشد که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بوده و آنها ساختارهای سولوی را از آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کنند (12و13). مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر محافظتی پودر دانه شنبلیله بر برخی فاکتورهای اکسیدانی و آنتی اکسیدانی در مسمومیت کبدی ناشی از استامینوفن انجام شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از 24 سرموش‌های صحرایی نوزاد و یستار با وزن 250-280 گرم که از خانه حیوانات دانشگاه شهید باهنر تهیه شده و در همان مرکز نیز نگهداری شدند، استفاده شد. موش‌ها در شرایط استاندارد از نظر نور، دما و رطوبت نگهداری شدند و به مدت چند روز قبل از آزمایش، آب و غذای کافی به آنها داده شد. دانه شنبلیله از عطاری تهیه و توسط متخصص گیاه‌شناسی تایید شد. میزان 1000 میلی گرم بر کیلوگرم پودر دانه شنبلیله در نرمال سالیین حل گردید و از طریق گاواژ به موش‌ها خوراندند شد. پودر استامینوفن خالص استفاده شده در این مطالعه از شرکت دارو پخش تهیه شده، سپس در نرمال سالیین حل و از طریق گاواژ خوراندند شد. موش‌ها به طور تصادفی به 4 گروه 6 تایی تقسیم شدند:

گروه کنترل (C): که موش‌ها بعد از 24 ساعت گرسنگی، از طریق گاواژ نرمال سالیین دریافت کردند، سپس 6 ساعت بعد نیز از طریق گاواژ به آنها نرمال سالیین خوراندند شد.

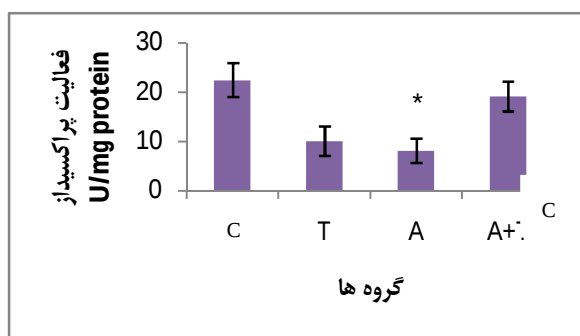
گروه پودر دانه شنبلیله (T): موش‌ها بعد از 24 ساعت گرسنگی، از طریق گاواژ نرمال سالیین دریافت می‌کنند، سپس 6 ساعت بعد مجدداً از طریق گاواژ 1000 mg/kg پودر دانه شنبلیله به آنها خوراندند شد.

گروه استامینوفنی (A): موش‌ها بعد از 24 ساعت گرسنگی، از طریق گاواژ 1000mg/kg استامینوفن دریافت کردند، سپس 6 ساعت بعد مجدداً از طریق گاواژ نرمال سالیین به آنها خوراندند شد.

گروه استامینوفن+پودر دانه شنبلیله (A+T): موش‌ها بعد از 24 ساعت گرسنگی، از طریق گاواژ استامینوفن دریافت کردند، سپس 6 ساعت بعد از طریق

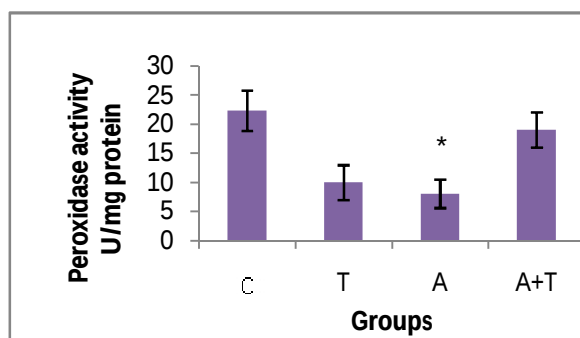
یافته ها

پراکسیداز (POD): فعالیت POD گروه A ($8/1080 \pm 2/4680$)، کاهش معنی دار را نسبت به گروه C ($22/4040 \pm 3/462$) نشان می دهد ($p < 0/05$). همچنین فعالیت POD گروه A+T نسبت به گروه A به طور قابل توجهی افزایش یافته است گرچه این افزایش معنی دار نمی باشد (نمودار 2).
کاتالاز (CAT): گروه A ($0/614 \pm 0/089$) و گروه T ($0/346 \pm 0/0872$) کاهش معنی داری را نسبت به گروه C ($1/71 \pm 0/239$) نشان می دهند (به ترتیب $p < 0/001$ ، $p < 0/01$). همچنین فعالیت CAT گروه A+T نسبت به گروه A به طور قابل توجهی افزایش یافته است گرچه این افزایش معنی دار نمی باشد (نمودار 3).



نمودار 2. بررسی تغییرات فعالیت آنزیم POD در گروه های مورد آزمایش. هر ستون نمایانگر $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ و $N=6$ می باشد. *اختلاف معنی داری نسبت به گروه C ($p < 0/05$).

C=کنترل، T=پودر دانه شنبلیله، A=استامینوفنی، A+T=استامینوفنی + پودر دانه شنبلیله

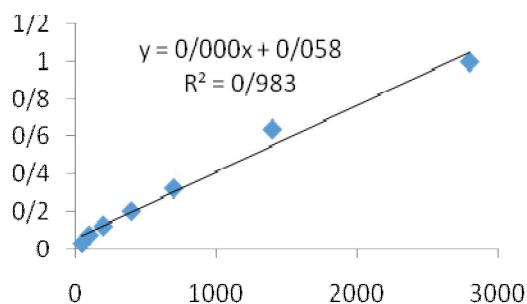


نمودار 3. بررسی تغییرات فعالیت آنزیم CAT در گروه های مورد آزمایش. هر ستون نمایانگر $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ و $N=6$ می باشد. **اختلاف معنی داری $p < 0/001$ نسبت به گروه C می باشد. ***اختلاف معنی داری $p < 0/001$ نسبت به گروه C

C=کنترل، T=پودر دانه شنبلیله، A=استامینوفنی، A+T=استامینوفنی + پودر دانه شنبلیله

پراکسید هیدروژن (H_2O_2): غلظت H_2O_2 گروه T افزایش معنی داری ($p < 0/001$) را نسبت به گروه C، A و A+T نشان داد. علاوه بر این، گروه A+T کاهش ($1/56 \pm 0/15362$) معنی داری ($p < 0/05$) را نسبت به گروه A ($2/38 \pm 0/1048$) نشان داد (نمودار 4).

رسم منحنی استاندارد پروتئین: به منظور رسم منحنی استاندارد پروتئین، مقدار 1/4 g استاندارد آلبومین گاوی در یک لیتر آب مقطر حل شد و از این محلول غلظت های 50، 100، 200، 400، 700، 1400 و 2800 میلی گرم در لیتر ساخته شد. کلیه مراحل کار بر روی آن ها توسط معرف بیوره، همانطور که قبلا در نمونه های مجهول توضیح داده شده بود، تکرار گردید. جذب هر یک در طول موج 595 nm با استفاده از اسپکتوفتومتر خوانده شد. برای تهیه غلظتهای پروتئینهای نمونه های مجهول از منحنی استاندارد حاصل استفاده گردید (نمودار 1).



نمودار 1. منحنی استاندارد پروتئین

سنجش پراکسید هیدروژن (H_2O_2): سنجش پراکسید هیدروژن با استفاده از روش Velikova et al انجام شد (17). 0/1 گرم از بافت مورد نظر در 1 ml تری کلرو استیک اسید 0/1% (TCA) هموزن می شود و عصاره حاصل با استفاده از سانتریفوژ یخچال دار در 10000 g به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ می شوند. سپس 0/5 ml از محلول سانتریفوژ شده به 0/5 ml بافر فسفات پتاسیم 10 ml با pH=7 و 1 ml یدید پتاسیم 1 M، اضافه می گردد و جذب در طول موج 390nm خوانده می شود. مقدار پراکسید هیدروژن در هر نمونه با استفاده از ضریب خاموشی $0/28 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه گردید و بر حسب میکرومول بر گرم وزن بافت گزارش شد.

سنجش مالون دی آلدئید (MDA): اندازه گیری غلظت MDA به واسطه روش Heath and Packer انجام گرفت (18). طبق این روش 0/2 گرم از بافت مورد نظر در 5 ml تری کلرو استیک اسید 0/1% (TCA) هموزن می شود و محلول حاصل با استفاده از سانتریفوژ به مدت 10 دقیقه در 10000 g سانتریفوژ شد. به یک میلی لیتر عصاره بافتی، 4 ml محلول TCA 20% که حاوی 0/5% تیوباربیتوریک (TBA) بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت 30 دقیقه در دمای 95 درجه سانتیگراد حمام آب گرم حرارت داده شد. سپس بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت 10 دقیقه در 10000 g سانتریفوژ گردید. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج 532 nm خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز (MDA-TBA) می باشد، جذب بقیه رنگیزه های غیر اختصاصی در 600 nm تعیین و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $155 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده ها: داده های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) به همراه پس آزمون Tukey آنالیز گردیدند و $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

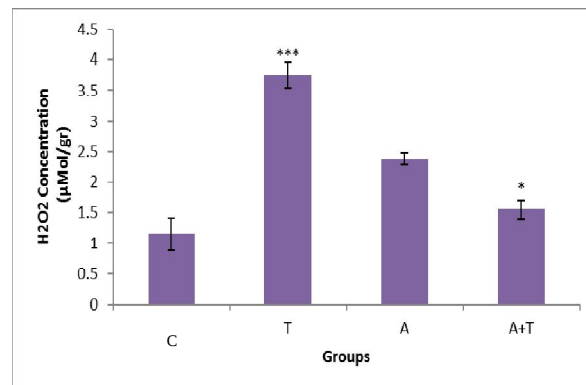
است (21 و 20). ROS به طور چشمگیری غشای سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و پراکسیداسیون لیپیدها را القا می‌کند. پراکسیداسیون لیپید یک علامت از استرس اکسیداتیو می‌باشد که در برهمکنش ROS با اسیدهای چرب غیراشباع مطرح می‌شود و شکل گیری محصولاتی از قبیل MDA و 4- هیدروکسی نون انول را پیش می‌برد که سبب آسیب به ترکیبات غشاء سلول، نکرور سلول و التهاب می‌شود (22).

در این مطالعه افزایش قابل توجهی در لیپید پراکسیداسیون در کبد رت‌های درمان شده با استامینوفن وجود دارد که به واسطه اندازه‌گیری MDA سنجیده شد که با مطالعه Saxena و همکاران در توافق می‌باشد (23). دوز بالای استامینوفن منجر به کاهش چشمگیری در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌شود. کاتالاز و پراکسیداز دو آنزیم بزرگ حذف‌کننده ROS می‌باشند که تبدیل پراکسید هیدروژن به آب را کاتالیز می‌کنند. یک کاهش در فعالیت این آنتی اکسیدان‌ها ممکن است یک افزایش در قابلیت استفاده سوپراکسید و پراکسید هیدروژن را پیش ببرد که در حقیقت رادیکال هیدروکسیل تولید می‌کند (24). در مطالعه حاضر، کاهش در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در کبد رت‌های درمان شده با استامینوفن مشاهده می‌شود. کاهش در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در کبد رت‌های تحت درمان با استامینوفن با مطالعه Gupta و همکارانش مطابقت دارد (25). همچنین گزارش شده است که تجویز استامینوفن با دوزهای 250 و 600 میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در موش، منجر به کاهش سیتوزولی گلوکوتائین پراکسیداز می‌شود (26).

مطالعه ما نشان داد که تیمار رت‌های استامینوفنی با 1000 mg/kg پودر دانه شنبلیله از افزایش در میزان پراکسید هیدروژن، MDA و کاهش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز در کبد این رت‌ها جلوگیری می‌کند. این نتایج با کاهش استرس اکسیداتیو در دیگر مطالعات مطابقت دارد که تیمار رت‌ها با پودر دانه شنبلیله در هپاتوکسیسیتی ناشی از تیواستامید به طور وسیعی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را اصلاح می‌کند و از افزایش در پراکسیداسیون لیپید جلوگیری می‌کند (27). در این مطالعه تیمار موش‌های صحرایی سالم با پودر دانه شنبلیله (N+T) منجر به افزایش پراکسید هیدروژن نسبت به گروه کنترل و کاهش بسیار جزئی MDA و کاهش فعالیت کاتالاز و پراکسیداز شده است. نتایج به دست آمده با مطالعه Sakr و همکاران مطابقت دارد که تیمار موش‌های صحرایی با عصاره پودر دانه شنبلیله، میزان MDA و فعالیت آنزیم کاتالاز را کاهش و فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) را افزایش می‌دهد (28) که افزایش فعالیت این آنزیم منجر به تولید H_2O_2 می‌شود. Mitchell و همکاران نشان دادند که دانه‌های شنبلیله سرشار از فلاونوئیدهای پلی فنولی است که به افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کمک می‌کند (12). پلی فنول‌ها، بویژه فلاونوئیدها از جمله قویترین آنتی اکسیدان‌های گیاهی می‌باشند. پلی فنول‌ها می‌توانند کمپلکس‌هایی با فلزات واکنشی مانند آهن، روی و مس تشکیل و جذب آنها را کاهش دهند (29).

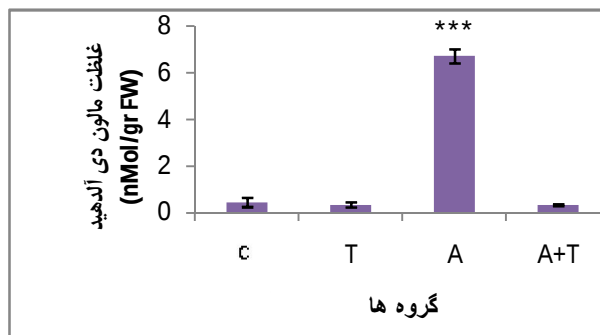
میزان زیاد این عناصر (کاتیونهای فلزی) در بدن می‌تواند رادیکال‌های آزاد را تولید کند و به آسیب اکسیداتیو غشای سلول و DNA سلولی کمک کند (30). علاوه بر این، پلی فنول‌ها به عنوان تمیز کننده (Scavenger) رادیکال آزاد در بدن عمل می‌کنند و قبل از اینکه رادیکال‌های آزاد به سلول آسیب وارد کنند می‌توانند آنها را خنثی کنند (31). گیاهان دیگری نیز وجود دارند که سرشار از

مالون دی آلدئید (MDA): غلظت MDA گروه A ($0/2608 \pm 0/03015$) افزایش معنی‌داری ($p < 0/001$) را نسبت به گروه‌های C ($0/61 \pm 0/2017$)، A+T ($0/2608 \pm 0/0301$) و T ($0/3414 \pm 0/103$) نشان داد (نمودار 5).



نمودار 4. مقایسه تغییرات غلظت H_2O_2 در گروه‌های مورد آزمایش. هر ستون نمایانگر $Mean \pm SEM$ و $N=6$ می‌باشد. *** اختلاف معنی‌داری $p < 0/001$ نسبت به گروه‌های C، A و A+T. * اختلاف معنی‌داری $p < 0/05$ نسبت به گروه A.

C= کنترل، T= پودر دانه شنبلیله، A= استامینوفنی، A+T= استامینوفنی + پودر دانه شنبلیله



نمودار 5. مقایسه تغییرات غلظت MDA در گروه‌های مورد آزمایش. هر ستون نمایانگر $Mean \pm SEM$ و $N=6$ می‌باشد. *** اختلاف معنی‌داری $p < 0/001$ با گروه‌های C، T و A+T.

C= کنترل، T= پودر دانه شنبلیله، A= استامینوفنی، A+T= استامینوفنی + پودر دانه شنبلیله

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه دانه شنبلیله توانسته است از تغییرات برخی فاکتورهای آنتی اکسیدانی (کاتالاز و پراکسیداز) و تغییرات سطوح مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن تا حد زیادی بکاهد. زمانی که استامینوفن در دوزهای بالا استفاده می‌شود، می‌تواند از طریق تشکیل NAPQI بیش از حد باعث نکرورز کبدی شود. NAPQI با پروتئین‌های غشای سلول کبدی به طور کوالانسی ترکیب شده که منجر به تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) از جمله آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل می‌شود (19). در این مطالعه یک افزایش در سطح پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در موش‌های صحرایی استامینوفنی مشاهده شد که با مطالعات Cheng و همکاران و Chen و همکاران در توافق

واکنش دهد تا یک آنیون رادیکال دی سولفید تولید کند که به سرعت مولکول اکسیژن را به رادیکال آنیون سوپر اکسید کاهش دهد. مکانیسم دیگر فعالیت پرواکسیدانی فلاونوئید به تشکیل محصولات اکسیداسیون نوع کوئینون مربوط می‌شود و مخصوصاً زمانی رخ می‌دهد که قسمت 3 و 4 کاتکول در مولکول فلاونوئید موجود است. اکسیداسیون کاتکول به کوئینون‌ها و متیدهای ایزومری کوئینون آنها، الکتروفیل‌های قوی تولید می‌کند که می‌تواند DNA را آلیکله کند (36). نتایج مطالعه نشان داد که پودر دانه شنبلیله می‌تواند سبب کاهش استرس اکسیداتیو در آسیب کبدی ناشی از استامینوفن شود. احتمال می‌رود که نقش دانه شنبلیله در افزایش دفاع آنتی اکسیدانی مربوط به ترکیبات فلاونوئیدی باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از ریاست دانشکده علوم و پرسنل گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان که همکاری صمیمانه‌ای را در اجرای این تحقیق داشتند و تمامی کسانی که ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

فلاونوئید می‌باشند از جمله زردچوبه و زنجبیل (32) و شیر سویا (33). Yakubu و همکاران اثر شیر سویا را بر آسیب کبدی ناشی از استامینوفن بررسی کردند و مشاهده شد که این گیاه از آسیب کبدی ناشی از استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (33). همچنین گزارش شده است که فلاونوئید قادر به اعمال اثر پرو اکسیدانی از جمله تشکیل رادیکال‌های آزاد به جای تمیز کردن (Scavenge) کردن آن‌ها می‌باشد (34). در یک مطالعه فلاونوئیدهایی مانند آپیجنین و نارینجینینا الگوی تعویض نوع فنول در حلقه B، زمانیکه در حضور GSH و آنزیم‌هایی از تیموس و مغز استخوان مانند پراکسیدازها انکوبه شد، منجر به 50-30 بار افزایش در تشکیل گونه‌های اکسیژن واکنشی شد (35). مشاهده شده است که این فلاونوئیدها در غلظت‌هایی که دیگر فلاونوئیدها هنوز به عنوان آنتی اکسیدان فعال هستند و مانع پراکسیداسیون لیپید می‌شوند، به عنوان پرواکسیدان عمل می‌کنند و پراکسیداسیون لیپید ایجاد می‌نمایند. اکسیداسیون شیمیایی و آنزیمی فلاونوئیدها، رادیکال سمی کوئینون فلاونوئید تولید می‌کند که ممکن است توسط GSH تمیز شود، در نتیجه فلاونوئید بازسازی می‌شود و رادیکال Thyil از گلوکاتایون ایجاد می‌شود. رادیکال Thyil ممکن است با GSH

The Effects of Fenugreek Seed Powder on Oxidant and Antioxidant Factors in Male Rats with Acetaminophen-induced Liver Toxicity

A. Mohammadzadeh (MSc)¹, A. Gol (PhD)^{*1}, H. Oloumi (PhD)²

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, I.R. Iran

2. Science and Technology Research and Environmental Sciences, Institute of Environmental Sciences, Department of Ecology, Kerman, I.R. Iran

J Babol Univ Med Sci; 17(9); Sep 2015; PP:44-51

Received: Nov 11th 2014, Revised: Feb 4th 2015, Accepted: May 6th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Acetaminophen can induce liver damage via oxidative stress. This study aimed to evaluate the protective effects of fenugreek seed powder on oxidant and antioxidant factors in acetaminophen-induced liver toxicity.

METHODS: In this experimental study, 24 male Wistar rats, weighing 250-280 g, were divided into four groups: control, normal saline+fenugreek seed powder, acetaminophen and acetaminophen+fenugreek seed powder. After 24 h of fasting, groups Normal and Normal+ Fenugreek received normal saline and groups Acetaminophen and Acetaminophen + Fenugreek received 1000 mg/kg acetaminophen by gavage. After six hours, the normal saline and acetaminophen groups received normal saline, whereas the groups receiving normal saline+fenugreek powder and acetaminophen+fenugreek powder were administered 1000 mg/kg of fenugreek seed powder via gavage. Twelve hours after the second gavage, the rats were sacrificed and liver tissues were frozen and assessed.

FINDINGS: A decline in malondialdehyde and hydrogen peroxide levels was observed in group acetaminophen+fenugreek, compared to the acetaminophen group (0.2608 ± 0.03 and 1.56 ± 0.153 vs. 6.7 ± 0.344 and 2.38 ± 0.104 in acetaminophen groups; $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). Also, the activities of peroxidase and catalase increased in these groups, compared to the acetaminophen groups (19.07 ± 3.366 and 1.174 ± 0.242 vs. 8.108 ± 2.46 and 0.614 ± 0.089 in acetaminophen groups, respectively).

CONCLUSION: The results of this study showed that fenugreek seeds could lead to reduced oxidative stress in acetaminophen-induced liver toxicity.

KEY WORDS: *Acetaminophen, Fenugreek seeds, Liver, Oxidative stress, Rat.*

Please cite this article as follows:

Mohammadzadeh A, Gol A, Oloumi H. The Effects of Fenugreek Seed Powder on Oxidant and Antioxidant Factors in Male Rats with Acetaminophen-induced Liver Toxicity. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(9):44-51.

*Corresponding Author: A. Gol (PhD)

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University, 22 Bahman Bulverde, Iran

Tel: +98 34 33257432

Email: agol@mail.uk.ac.ir

References

1. Fontana RJ, Seeff LB, Andrade RJ, Bjornsson E, Day CP, Serrano J, et al. Standardization of nomenclature and causality assessment in drug-induced liver injury: summary of a clinical research workshop. *Hepatology*. 2010; 52(2):730-42.
2. Holt M, Ju C. Drug-induced liver injury. *Handb Exp Pharmacol* 2010; 196: 3-27.
3. Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, et al. Acetaminophen- induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology*. 2005;42(6):1364-72.
4. Kazemi MT, Pour Nasrollah M, Rezaei MM, Jorsaraei SGA, Maliji Gh, Kazemi S, et al. Effect of piperine pretreatment on biochemical profiles of acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *J Babol Univ Med Sci*. 2012; 14(4):7-14. [In Persian]
5. WHO, IUCN, & WWF. Guidelines on the conservation of medicinal plants. Gland, Switzerland. 1993; p.38.
6. Becker EM, Nissen LR, Skibsted LH. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *Eur Food Res Technol*. 2004;219(6):561-71.
7. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(10):7313-52.
8. Kaviarasan S, Naik GH, Gangabhagirathi R, Anuradha CV, Priyadarsini KI. In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. *Food Chem*. 2007;103(1):31-7.
9. Sauvaire Y, Baccou JC. Nutritional value of the proteins of a leguminous seed: Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Nutr Rep Int*. 1976;14:527-37.
10. Mishkinsky JS, Goldschmied A, Joseph B, Ahronson Z, Sulman FG. Hypoglycaemic effect of *Trigonella foenum graecum* and *Lupinus termis* (leguminosae) seeds and their major alkaloids in alloxan diabetic and normal rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1974; 210(1):27-36.
11. Dawidar AM, Saleh AA, Elmotei SL. Steroid sapogenin constituents of fenugreek seeds. *Planta Med*. 1973;24(4):367-70.
12. Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen- induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*. 1973;187(1):185-94.
13. Sricharoen A, Field CJ, Thompson ABR, Basu TK. The modifying effect of galac-tomannan from Canadian-grown fenugreek (*Trigonella-foenum graecum* L.) on the glycemic and lipidemic status in rats. *J Clin Biochem Nutr*. 2008;43(3):167-74.
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976(1-2);72:248-54.
15. Dhindsa RS, Motowe W. Drought tolerance in two mosses: correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. *J Exp Bot*. 1981;32(1):79-91.
16. Plewa MJ, Smith SR, Wagner ED. Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutat Res*. 1991;247(1):57-64.
17. Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci*. 2000; 151(1):59-66.
18. Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*. 1968;125(1):189-98.
19. Nelson SD. Mechanisms of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury. *Drug Metab Rev*. 1995;27(1-2):147-77.

20. Cheng J, Ma X, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ. Rifampicin pregnane X receptor and CYP3A4 induction enhance acetaminophen-induced toxicity. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(8):1611-21.
21. Chen C, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ. Identification of novel toxicity-associated metabolites by metabolomics and mass isotopomer analysis of acetaminophen metabolism in wild-type and Cyp2e1-null mice. *J Biol Chem.* 2008; 283(8):4543-59.
22. Stark G. Functional consequences of membrane damage. *J Membr Biol.* 2005;205(1):1-16.
23. Saxena M, Shakya A K, Sharma N, Shrivastava S, Shukla S. Therapeutic efficacy of *Rosa damascena* mill. on acetaminophen-induced oxidative stress in albino rats. *Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2012;31(3):193-201.
24. Kinalski M, Sledziewski A, Telejko B, Zarzycki W., Kinalska I. Lipid peroxidation and scavenging enzyme activity in streptozotocin-induced diabetes. *Acta Diabetol.* 2000;37(4):179-83.
25. Gupta G, Krishna G, Chellappan DK, Gubbiyappa KS, Candasamy M, Dua K. Protective effect of pioglitazone, a PPAR γ agonist against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Mol Cell Biochem.* 2014;393(1-2):223-8.
26. Tirmenstein MA, Nelson SD. Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols: Contribution of impaired thiol metabolizing enzymes and the breakdown of adenine nucleotides. *J Biol Chem.* 1990;265(6):3059-65.
27. Zargar S. Protective effect of *Trigonella foenum-graecum* on thioacetamide induced hepatotoxicity in rats. *Saudi J Biol Sci.* 2014;21(2):139-45.
28. Sakr SA, Abo-El-Yazid SM. Effect of fenugreek seed extract on adriamycin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in albino rats. *Toxicol Ind Health.* 2012;28(10):876-85.
29. Nwanna EE, Oboh G. Antioxidant and hepatoprotective properties of polyphenol extracts from *Telfairia occidentalis* (Fluted Pumpkin) leaves on acetaminophen induced liver damage. *Pak J Biol Sci.* 2007;10(16):2682-7.
30. Okafor OY, Erukainure OL, Ajiboye JA, Adejobi RO, Owolabi FO, Kosoko SB. Pineapple peel extract modulates lipid peroxidation, catalase activity and hepatic biomarker levels in blood plasma of alcohol-induced oxidative stressed rats. *Asian Pac J Trop Med.* 2011;1(1):11-4.
31. Ara N, Nur H. In vitro antioxidant methanolic leaves and flowers extracts of *Lippia Alba*. *Res J Med Sci.* 2009;4(1): 107-10.
32. Skrovankova S, Misurkova L, Machu L. Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. *Adv Food Nutr Res.* 2012;67:75-139.
33. Yakubu N, Oboh G, Olalekan AA. Antioxidant and hepatoprotective properties of tofu (Curdle Soymilk) against acetaminophen-induced liver damage in rats. *Biotechnol Res Int.* 2013;2013:230142.
34. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure activity relationships. *Free Radic Biol Med.* 1997;22(5):749-60.
35. Galati G, Moridani MY, Chan TS, O'Brien PJ. Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(4):370-82.
36. Galati G, Chan T, Wu B, O'Brien PJ. Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chem Res Toxicol.* 1999; 12(6):521-5.