Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

Pretreatment Effect of D-Limonene on Oxidative Stress Induced by Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

F. Hadipour Moradi (MSc)[1,2], H. Nazem (PhD)[3], E. Babaeenezhad (MSc)[4], A. Cheraghi Venool (MSc)[2], L. Jafaripour (MSc)[5], H. Ahmadvand (PhD)[*6]

1.Department of Biochemistry, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University, Isfahan, I.R.Iran.
2.Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, I.R.Iran.
3.Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R.Iran.
4.Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.
5.Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Dezful University of Medical Sciences, Dezful, I.R.Iran.
6.Medicinal Plants and Natural Products Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran.

Article Type
Research Paper

Received:
May 25th 2021
Revised:
Oct 7th 2021
Accepted:
Nov 10th 2021

ABSTRACT

Background and Objective: Reactive oxygen species are the main factors involved in kidney damage during renal ischemia-reperfusion (RIR). Since D-limonene has antioxidant, anti-diabetic, anti-apoptotic, and lipid peroxidation effects, it prevents mitochondrial dysfunction and inhibits ROS, this study was conducted to evaluate the effects of pretreatment with D-limonene on oxidative stress and antioxidant activity in RIR injury.

Methods: In this experimental study, 24 male Wistar rats were randomly divided into 3 groups: control, RIR (ischemia was induced by clamping of renal pedicles for 45 minutes and reperfusion was considered 24 hours after ischemia), and RIR+D-limonene (100 mg/kg by oral gavage for 12 days). Serum and kidney were used to evaluate malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), paraoxonase1 (PON1), glutathione (GSH), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), and nitric oxide (NO).

Findings: Serum and renal levels of MDA ([18.2±98.77 vs. 9.21±1.77] and [19.85±3.39 vs. 9.84±1.65]) and MPO ([67.25±32.67 vs. 40.21±6.1] and [18.44±2.86 vs. 10.42±1.68]) and serum level of NO (31.3±36.1 vs. 27.88±2.6) significantly increased in the RIR group compared with the control group ($p<0.05$). Serum and kidney levels of GSH, activities of CAT and GPX in serum and kidney, and serum activity of PON1 significantly decreased in the RIR group compared with the control group ($p<0.05$). Pretreatment with D-limonene could significantly ameliorate serum and renal levels of MDA, serum levels of GSH and NO, and serum activity of CAT in rats pretreated with D-limonene in comparison with RIR rats ($p<0.05$).

Conclusion: This study indicated that pretreatment with D-limonene could ameliorate RIR injuries in rats through its antioxidant activities.

Keywords: *D-Limonene, Renal Ischemia-Reperfusion, Oxidative Stress, Rats.*

Cite this article: Hadipour Moradi F, Nazem H, Babaeenezhad E, Cheraghi Venool A, Jafaripour L, Ahmadvand H. Pretreatment Effect of D-Limonene on Oxidative Stress Induced by Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2022; 24(1): 159-68.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

[*]Corresponding Author: H. Ahmadvand (PhD)
Address: Medicinal Plants and Natural Products Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran.
Tel: +98 (81) 38381590. **E-mail:** hassan_a46@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.21.7]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.159]

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

اثر پیش درمانی دی لیمونین بر استرس اکسیداتیو ناشی از آسیب ایسکمی ــ باز خون رسانی کلیوی در موش صحرایی

فروزان هادی پور مرادی (MSc)[۱،۲]، حبیب اله ناظم (PhD)[۳]، اسماعیل بابائی نژاد (MSc)[۴]، احمد چراغی ونول (MSc)[۲]، لیلا جعفری پور (MSc)[۵]، حسن احمدوند (PhD)[۶*]

۱. گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، اصفهان، ایران
۲. مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
۳. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۵. گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دزفول، ایران
۶. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و فرآورده های طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

نوع مقاله
مقاله پژوهشی

دریافت:
۱۴۰۰/۳/۴
اصلاح:
۱۴۰۰/۷/۱۵
پذیرش:
۱۴۰۰/۸/۱۹

چکیده

سابقه و هدف: گونه های فعال اکسیژن از عوامل اصلی آسیب کلیه در طی ایسکمی- ریپرفیوژن کلیوی (RIR) هستند. از آنجائیکه D-لیمونن دارای اثرات آنتی اکسیدانی، ضد دیابت، ضد آپوپتوز و مهار پراکسیداسیون لیپید، جلوگیری از اختلال در عملکرد میتوکندری و مهار ROS است لذا این مطالعه به منظور بررسی تأثیر پیش درمانی با D-لیمونن بر استرس اکسیداتیو و فعالیت آنتی اکسیدانی در آسیب RIR انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به صورت تصادفی به ۳ گروه تقسیم شدند: شاهد، RIR (بستن پدیکل های کلیه به مدت ۴۵ دقیقه و خونرسانی مجدد به مدت ۲۴ ساعت) و RIR + D-لیمونن (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی به مدت ۱۲ روز). از سرم و کلیه برای ارزیابی مالون دی آلدئید (MDA)، میلوپراکسیداز (MPO)، پاراکسوناز ۱ (PON1)، گلوتاتیون (GSH)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و نیتریک اکسید (NO) استفاده شد.

یافته‌ها: سطح سرمی و کلیوی MDA ((۲/۷۷±۱۸/۹۸ در مقابل ۱/۷۷±۹/۲۱) و (۳/۳۹±۱۹/۸۵ در مقابل ۱/۶۵±۹/۸۴)) و MPO ((۲۵/۶۷±۶۷/۳۲ در مقابل ۶/۱±۴۰/۲۱) و (۲/۸۶±۱۸/۴۴ در مقابل ۱/۶۸±۱۰/۴۲)) و سطح سرمی NO (۳/۱±۳۱/۳۶ در مقابل ۲/۶±۲۷/۸۸) در گروه RIR به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته بود. سطح GSH و فعالیت های CAT و GPX در سرم و کلیه و فعالیت PON1 سرم در گروه RIR در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجهی کاهش یافت ($p<0/05$). پیش درمانی با D-لیمونن توانست به طور قابل توجهی سطح سرمی و کلیوی MDA، سطح سرمی GSH و NO و فعالیت CAT سرم را در موش های تحت پیش درمانی با D-لیمونن در مقایسه با موش RIR بهبود بخشد ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که پیش درمانی با D-لیمونن می تواند از طریق فعالیت های آنتی اکسیدانی صدمات RIR را در موش ها بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی: D-لیمونن، ایسکمی- برقراری مجدد جریان خون کلیوی، استرس اکسیداتیو، موش صحرایی.

استناد: فروزان هادی پور مرادی، حبیب اله ناظم، اسماعیل بابائی نژاد، احمد چراغی ونول، لیلا جعفری پور، حسن احمدوند. اثر پیش درمانی دی لیمونین بر استرس اکسیداتیو ناشی از آسیب ایسکمی- باز خون رسانی کلیوی در موش صحرایی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل، ۱۴۰۱؛ ۲۴(۱): ۶۸-۱۵۹.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

▣ این مقاله مستخرج از پایان نامه فروزان هادی پور دانشجوی رشته بیوشیمی دانشگاه پیام نور اصفهان و طرح تحقیقاتی به شماره ۱۹۲۷-۹۹-۱-۱۳۹۷ دانشگاه علوم پزشکی لرستان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر حسن احمدوند
آدرس: همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و فرآورده های طبیعی. تلفن: ۰۸۱-۳۸۳۸۱۵۹۰ رایانامه: hassan_a46@yahoo.com

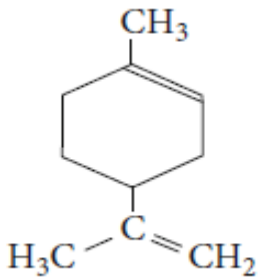
[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.21.7]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.159]

مقدمه

ایسکمی یکی از شایع ترین آسیب ها است که با کاهش جریان خون ایجاد می شود. به دنبال ایسکمی، کاهش اکسیژن، کاهش تغذیه و توقف تولید انرژی در بستر عروقی بافت ها اتفاق می افتد (۱). ایسکمی کلیه معمولاً به دنبال پیوند کلیه، نفرکتومی یک طرفه، اصلاح آنوریسم فوق کلیوی و شوک خونریزی دهنده رخ می دهد. برگشت مجدد جریان خون برای بقای بافت ها ضروری است اما خود سبب آسیب های بیشتری می شود که به عنوان آسیب ایسکمی- ریپرفیوژن (Ischemia-Reperfusion Injuries= IRI) شناخته می شود (۲). در طول ایسکمی، اندوتلیوم عروقی باعث تولید گونه های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species= ROS) و عوامل کموتاکسی می شود (۳). نوتروفیل ها به ناحیه ایسکمیک مهاجرت و ROS، سیتوکین‌ها، میلوپراکسیداز (Myeloperoxidase= MPO) و سایر عوامل واسطه منجر به آسیب بافتی می شوند (۴). بر اساس مطالعات قبلی، ROS در آسیب های ناشی از IRI سبب ایجاد اثرات سمی مانند اکسیداسیون پروتئین ها، آسیب DNA، پراکسیداسیون لیپیدها و آپوپتوز می شود (۵و۶).

آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیر آنزیمی سیستم های اصلی دفاعی در برابر آسیب ناشی از رادیکال های آزاد هستند (۷و۸). علاوه بر این، ثابت شده است فاز ری پرفیوژن، آنزیم های آنتی اکسیدان درون زا را سرکوب و نیتریک اکساید سنتتاز قابل القا (Inducible nitric oxide synthetase= iNOS) را فعال می کند (۹). بسیاری از آنتی اکسیدان های طبیعی مانند سلنیوم، روتین (۱۰و۵)، نوبیلتین و گلوتاتیون آسیب های کلیوی ایجاد شده توسط IRI را بهبود داده اند (۱۲و۱۱). آنتی اکسیدان های طبیعی توانستند استرس اکسیداتیو را کاهش و عملکرد کلیه را متعاقب ایسکمی- ریپرفیوژن کلیوی (Renal = RIR ischemia-reperfusion) بهبود ببخشند. داروهای شیمیایی نسبت به آنتی اکسیدان های طبیعی عوارض زیادی ایجاد می کنند (۱۳). بنابراین، پیدا کردن آنتی اکسیدان طبیعی جدید با اثرات مفید بر RIR هنوز مهم است، زیرا آنتی اکسیدان های طبیعی هیچ عارضه جانبی ندارند و به عنوان یک درمان جایگزین خوب برای بیماری های مرتبط با استرس اکسیداتیو معرفی می شوند (۱۵و۱۴).

D-لیمونن به عنوان ۱- متیل- ۴-(۱-متیل اتنیل) سیکلوهگزن شناخته می شود (شکل ۱)، یک مونوترپن حلقوی طبیعی با بوی لیمو که به عنوان ترکیب اصلی در اسانس پرتقال و گریپ فروت، گیلاس و نعناع در نظر گرفته می شود (۱۶). D-لیمونن تأثیر اثبات شده ای بر بسیاری از سرطان ها دارد (۱۷). همچنین دارای اثرات آنتی اکسیدانی، ضد دیابت، ضد آپوپتوز و مهار پراکسیداسیون لیپید، جلوگیری از اختلال در عملکرد میتوکندری، مهار ROS است (۱۹و۱۸). کاهش چربی خون، تعدیل سیستم ایمنی، محافظت از کبد و پوست نیز از فعالیت‌های های بیولوژیکی D-لیمونن است که طی مطالعاتی منتشر شده اند (۲۲-۲۰). ما در مطالعات اخیر نشان داده شد که D-لیمونن باعث حفاظت بخشی در برابر آسیب حاد کلیوی متعاقب تزریق جنتامایسین می شود (۲۲). علاوه بر این، مشخص شده است که D-لیمونن منجر به کاهش آسیب های کلیوی ناشی از سنگ کلیه و دوکسوروبیسین می شود (۲۳). بر اساس دانش ما، از آنجائیکه تاکنون اثرات پیش درمانی D-لیمونن روی RIR در موش صحرائی نر مورد بررسی قرار نگرفته است، لذا این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات حفاظت بخشی احتمالی پیش درمانی با D-لیمونن روی RIR در موش صحرائی نر طراحی شد.



شکل ۱. ساختمان شیمیایی D-لیمونن (۲٤)

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی لرستان با کد IR.LUMS.REC.1400.033، ۲۴ موش صحرایی نر از نژاد ویستار (۲۰۰-۱۸۰ گرم) از مرکز تحقیقات دارویی گیاهی رازی، لرستان ایران گرفته شد. این حیوانات در اتاقی با دمای ۱±۲۴ درجه سانتی گراد و چرخه

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.21.7]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.159]

روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعته در آزمایشگاه حیوانات مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی نگهداری شدند. در طول مطالعه آب و غذا کافی در دسترس حیوانات وجود داشت.

طراحی آزمایش: موش ها به طور تصادفی به ۳ گروه مساوی (۸ سر) تقسیم شدند: گروه ۱ (شاهد)، گروه ۲ (RIR)، این حیوانات تحت جراحی RIR قرار گرفتند و روزانه نرمال سالین (۱ میلی لیتر بر کیلوگرم) به صورت گاواژ دریافت کردند. گروه ۳ تحت RIR قرار گرفتند و روزانه D–لیمونن (۱۰۰ mg/kg) از طریق گاواژ دریافت کردند (۲۳). پیش درمانی به صورت روزانه به مدت ۱۲ روز قبل از القای RIR انجام شد. القای ایسکمی تحت بیهوشی ۵۰ mg/kg کتامین و ۵ mg/kg زایلازین به صورت تزریق داخل صفاقی انجام شد (۵). سطح شکم شیو و اسکراب شد. سپس، حفره شکم موش توسط یک برش در خط میانی باز، پس از آن پدیکل های راست و چپ توسط گیره های مناسب به مدت ۴۵ دقیقه مسدود شدند. پس از ۴۵ دقیقه ایسکمی، گیره ها برای القا ری پرفیوژن خارج شدند. مدت ری پرفیوژن در آزمایش ما ۲۴ ساعت بود. در گروه کنترل حفره شکم باز شد اما RIR القا نشد. D–لیمونن (≥۹۵٪) به صورت تجاری از شرکت سیگما خریداری شد.

آنالیز بیوشیمیایی: پس از پرفیوژن مجدد، تحت بیهوشی با ۵۰ mg/kg کتامین و ۵ mg/kg زایلازین، نمونه خون از بطن چپ موش ها گرفته شد در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه لخته شدند. نمونه ها ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرم نمونه ها جدا شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد برای ارزیابی های بیوشیمیایی سرم نگهداری شدند. کلیه ها خارج و برای سنجش پارامترهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. کلیه ها با سالین بافر فسفات (PBS) همگن شدند. سپس با ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی آن برای سنجش شاخص های بیوشیمیایی کلیه مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه گیری تست های استرس اکسیداتیو: سطح مالون دی آلدهید (MDA) سرم و کلیه، به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید، با روش تیوباربیتوریک اسید (TBA) ارزیابی شد (۲۴). جذب به صورت اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه گیری شد و محتوای MDA به صورت nM MDA/mg-pr گزارش شد.

سنجش گلوتاتیون (GSH) در سرم و کلیه با روش اسپکتروفتومتری Shimadzu (توکیو، ژاپن)، براساس روش المن با طول موج ۴۱۲ نانومتر انجام شد (۲۵). روش Sinha برای اندازه گیری فعالیت Catalase (CAT) سرمی و کلیوی مورد استفاده قرار گرفت (۵). واکنش بعد از اضافه کردن ۲۰ میکرو لیتر نمونه به هیدروژن پراکسید (۲ میلی لیتر، ۳۰ میلی مولار) و پتاسیم فسفات بافر (۷ pH، ۵۰ میلی مولار) آغاز شد. فعالیت کاتالاز به صورت مقدار هیدروژن پراکسید مصرف شده در واحد زمان (دقیقه) در میلی لیتر سرم یا گرم بافت گزارش شد.

فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) سرمی و کلیوی بر اساس Flohé و همکاران اندازه گیری شد (۲۶). یک مخلوط شامل نمونه، هیدروژن پراکسید و tert-butyle hydroperoxide آماده شد. با استفاده از دستگاه الایزا ریدر نمونه ها در ۴۲۰ نانومتر خوانده شدند.

فعالیت پاراکسوناز ۱ (PON1) سرم با استفاده از پاراکسون به عنوان سوبسترا مورد سنجش قرار گرفت و با افزایش جذب در ۴۱۲ نانومتر به دلیل تولید ۴–نیتروفنول، از طریق اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. برای اندازه گیری فعالیت آنزیمی در ۲۵ درجه سانتیگراد، افزودن ۵۰ میلی لیتر سرم به ۱ میلی لیتر بافر tris-HCl (کلسیم کلرید ۲ میلی مولار و پاراکسون ۵ میلی مولار، ۸ pH) انجام شد. میزان تولید ۴–نیتروفنول در ۴۱۲ نانومتر ارزیابی شد. برای محاسبه فعالیت آنزیمی، ضریب انهدام مولی ۱۷۱۰۰ Mcm در نظر گرفته شد (۲۷).

فعالیت میلوپروکسیداز MPO سرم و کلیه بر اساس پراکسید هیدروژن باعث اکسیداسیون دی هیدروکلرید O-dianisidine در ۴۵۰ نانومتر شد (۲۸). به طور خلاصه یک مخلوط با حجم نهایی ۳ میلی لیتر شامل نمونه (۱۰ میکرولیتر)، ۰/۳ میلی لیتر فسفات بافر (۰/۰۱ مولار با ۶ pH)، ۰/۳ میلی لیتر هیدروژن پراکسید (۰/۰۱ مولار و ۰/۵ میلی لیتر) O-dianisidine (۰/۰۲ مولار) به یک کووت با طول ۱ سانتی متر منتقل شد. نمونه در مرحله آخر تهیه مخلوط اضافه شد و تغییرات جذب مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در طول موج ۴۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. واحد فعالیت MPO به صورتunit/mg protein گزارش شد.

نیتریت محصول نهایی نیتریک اکسید (NO) است که برای اندازه گیری NO سرم ارزیابی می شود. در مطالعه ما برای سنجش نیتریت از روش Cheraghi و همکاران استفاده شد (۲۹).

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد و از آزمون های LSD برای مقایسه بین گروه های مختلف و One way ANOVA استفاده گردید و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.21.7]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.159]

یافته ها

تأثیر D-لیمونن بر میزان پارامترهای بیوشیمیایی در مدل RIR:

MDA سرم در گروه RIR به طرز معنی داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت (۲/۷۷±۱۸/۹۸ در مقابل ۱/۷۷±۹/۲۱). D-لیمونن توانسته بود میزان MDA سرم را در گروه دریافت کننده در مقایسه با گروه RIR به طور معنی داری کاهش دهد (جدول ۱). سطح MDA کلیه در موش های صحرایی RIR در مقایسه با موش های شاهد (۳/۳۹±۱۹/۸۵ در مقابل ۱/۶۵±۹/۸۴) افزایش یافته بود. سطح MDA کلیه در گروه پیش درمانی شده با D-لیمونن در مقایسه با گروه RIR به طرز معنی داری کاهش یافته بود (جدول ۲).

جدول ۱. اثرات D-لیمونن بر سطح سرمی MDA (µmol/mg protein)، GSH سرم (µmol/mg protein) و NO سرم (nmol/dL) و فعالیت CAT سرم (U/mg protein)، GPX (U/mg protein)، PON1 (U/min) در گروه های تحت مطالعه

گروه ها پارامتر	کنترل Mean±SD	ایسکمی-ریپرفیوژن کلیوی Mean±SD	ایسکمی-ریپرفیوژن کلیوی+D-لیمونن Mean±SD	p-value
کاتالاز	۱۵۷/۸۳±۳۸/۵۳^{a}	۸۴/۷۰±۱۳/۵۹^{b}	۱۲۶/۲۱±۲۹/۴۲^{c}	<۰/۰۰۱
گلوتاتیون پراکسیداز	۵۴/۴۰±۶/۷۶^{a}	۳۴/۵۲±۶/۲۷^{b}	۳۹/۸۶±۲/۲۷^{b}	۰/۰۰۶
گلوتاتیون	۲۵/۸۶±۵/۷^{a}	۱۰/۲۴±۲/۰۴^{b}	۱۴/۵۹±۱/۲۶^{c}	<۰/۰۰۱
مالون دی آلدهید	۹/۲۱±۱/۷۷^{a}	۱۸/۹۸±۲/۷۷^{b}	۱۰/۱۶±۲/۴۲^{c}	<۰/۰۰۱
پاراکسوناز ۱	۷۸/۹۵±۸/۷۴^{a}	۳۸/۹۰±۲۰/۴۰^{b}	۵۰/۴۶±۲۳/۸۶^{b}	<۰/۰۰۱
میلوپروکسیداز	۴۰/۲۱±۶/۱^{a}	۶۷/۳۲±۲۵/۶۷^{b}	۵۸/۹۹±۲۶/۴۱^{b}	<۰/۰۰۱
نیتریک اکساید	۲۷/۸۸±۲/۶^{a}	۳۱/۳۶±۳/۱^{b}	۱۷/۲۳±۲/۷۳^{c}	<۰/۰۰۱

حروف مختلف در هر سطر (a، b وc) معنی داری با گروه هایی با حرف متفاوت را نشان می دهند (p<۰/۰۵).

جدول ۲. اثرات D-لیمونن بر میزان MDA کلیه (µmol/mg protein) و GSH (µmol/mg protein)، فعالیت CAT کلیوی (U/mg protein)، GPX کلیوی (U/mg protein) و MPO کلیوی (U/mg protein) در گروه های تحت مطالعه.

گروه ها پارامتر	کنترل Mean±SD	ایسکمی-ریپرفیوژن کلیوی Mean±SD	ایسکمی-ریپرفیوژن کلیوی+D-لیمونن Mean±SD	p-value
کاتالاز	۹۷/۴۶±۲۳/۲۹^{a}	۳۹/۷۱±۱۳/۶۷^{b}	۵۴/۲۷±۱۱/۴۴^{b}	<۰/۰۰۱
گلوتاتیون پراکسیداز	۲۰۷/۰۳±۳۲/۱۲^{a}	۱۳۶/۵۰±۱۸/۵۸^{b}	۱۴۶/۵۷±۱۹/۶۸^{b}	<۰/۰۰۱
گلوتاتیون	۲۷/۳۴±۴/۹۳^{a}	۱۳/۷۵±۳/۴۹^{b}	۱۴/۶۷±۱/۷۷^{b}	<۰/۰۰۱
مالون دی آلدهید	۹/۸۴±۱/۶۵^{a}	۱۹/۸۵±۳/۳۹^{b}	۱۱/۱۱±۱/۷۵^{c}	<۰/۰۰۱
میلوپروکسیداز	۱۰/۴۲±۱/۶۸^{a}	۱۸/۴۴±۲/۸۶^{b}	۱۵/۶۵±۰/۷۵^{b}	<۰/۰۰۱

حروف مختلف در هر سطر (a، b وc) معنی داری با گروه هایی با حرف متفاوت را نشان می دهند (p<۰/۰۵).

GSH سرمی در گروه RIR در مقایسه با گروه کنترل (۲/۰۴±۱۰/۲۴ در مقابل ۵/۷±۲۵/۸۶) به طور معنی داری کاهش یافته بود. در گروه پیش درمانی شده با D-لیمونن سطح GSH سرم در مقایسه با گروه RIR به طرز معنی داری افزایش یافته بود (جدول ۱). سطح GSH کلیه در موش های صحرایی RIR در مقایسه با موش های کنترل (۳/۴۹±۱۳/۷۵ در مقابل ۴/۹۳±۲۷/۳۴) به صورت معنی داری کاهش یافته بود. D-لیمونن توانسته بود سطح کلیوی GSH را در مقایسه با گروه RIR افزایش دهد ولی از لحاظ آماری معنی دار نبود (جدول ۲).

CAT سرم در گروه RIR نسبت به گروه کنترل (۱۳/۵۹±۸۴/۷۰ در مقابل ۳۸/۵۳±۱۵۷/۸۳) به طور معنی داری کاهش یافته بود. فعالیتCAT سرم در گروه تحت پیش درمانی در مقایسه با گروه RIR به طور معنی داری افزایش یافته بود (جدول ۱). فعالیت CAT کلیه در گروه RIR به طور قابل توجهی

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.21.7]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.159]

در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود (۱۳/۶۷±۳۹/۷۱ در مقابل ۲۳/۲۹±۹۷/۴۶). در گروه تحت پیش درمانی با D-لیمونن افزایش فعالیت CAT کلیه در مقایسه با گروه RIR مشاهده شد، اما از نظر آماری معنی دار نبود (جدول ۲).

فعالیت GPX سرم در گروه RIR در مقایسه با گروه شاهد (۶/۲۷±۳۴/۵۲ در مقابل ۶/۷۶±۵۴/۴۰) به طور معنی داری کاهش یافته بود. D-لیمونن توانسته بود فعالیت GPX سرم را در گروه تحت پیش درمانی در مقایسه با گروه RIR افزایش دهد، اما از نظر آماری معنی دار نبود (جدول ۱). فعالیت GPX کلیه در گروه RIR در مقایسه با گروه کنترل (۱۸/۵۸±۱۳۶/۵۰ در مقابل ۳۲/۱۲±۲۰۷/۰۳) به طرز معنی داری کاهش یافته بود. فعالیت GPX کلیه در گروه تحت پیش درمانی با D-لیمونن در مقایسه با گروه RIR افزایش پیدا کرد ولی از لحاظ آماری معنی دار نبود (جدول ۲).

فعالیت PON1 سرمی گروه RIR در مقایسه با گروه شاهد (۲۰/۴۰±۳۸/۹۰ در مقابل ۸/۷۴±۷۸/۹۵) به طور معنی داری کاهش یافته بود. پیش درمانی با D-لیمونن فعالیت PON1 سرمی را در مقایسه با موش های RIR افزایش داده بود، اما از نظر آماری معنی دار نبود (جدول ۱).

سطح NO سرم در گروه RIR در مقایسه با گروه کنترل به طرز معنی داری بالاتر مشاهده شد (۳/۱±۳۱/۳۶ در مقابل ۲/۶±۲۷/۸۸). پیش درمانی با D-لیمونن توانسته بود به طرز معنی داری سطح NO را در گروه تحت پیش درمانی در مقایسه با گروه RIR کاهش دهد (جدول ۱).

MPO سرم در گروه RIR در مقایسه با گروه کنترل (۲۵/۶۷±۶۷/۳۲ در مقابل ۶/۱±۴۰/۲۱) به طرز معنی داری افزایش یافته بود. فعالیت MPO سرم در گروه تحت پیش درمانی با D-لیمونن در مقایسه با گروه RIR کاهش یافته بود ولی از نظر آماری معنی دار نبود (جدول ۱). MPO کلیه در گروه RIR در مقایسه با گروه کنترل به طرز معنی داری افزایش یافته بود (۲/۸۶±۱۸/۴۴ در مقابل ۱/۶۸±۱۰/۴۲). D-لیمونن فعالیت MPO کلیه را در مقایسه با گروه RIR کاهش داده بود اما از لحاظ آماری معنی دار نبود (جدول ۲).

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد پیش درمانی با D-لیمونن می تواند از طریق فعالیت های آنتی اکسیدانی و ضد التهابی باعث کاهش آسیب RIR در موش های صحرایی شود. سطح MDA سرم و کلیه در گروه RIR در مقایسه با گروه کنترل به طرز معنی داری افزایش یافته بود و سطح GSH، CAT، GPX، PON1 در گروه RIR در مقایسه با گروه کنترل به طرز معنی داری کاهش یافته بود. پیش درمانی با D-لیمونن توانسته بود به طرز معنی داری سطح سرمی و کلیوی MDA را کاهش دهد و سطح سرمی GSH و فعالیت CAT سرم را در مقایسه با موش های RIR بهبود بخشد. MDA و آنتی اکسیدان مانند GPX و CAT به عنوان نشانگرهایی برای تعیین وضعیت استرس اکسیداتیو در نظر گرفته می شوند. مطابق با مطالعه حاضر، بسیاری از تحقیقات نشان داد RIR باعث پراکسیداسیون لیپید و کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان می شود (۱۰). مطالعات قبلی نشان داد آنتی اکسیدان‌های طبیعی مانند سلنیوم (۸)، الئوروپین (۳۰)، ویتامین E (۳۱)، پیکنوژنول (۳۲) و ملاتونین (۳۳) می توانند سبب بهبود وضعیت آنتی اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی شودند. طی پژوهشی، Murali و همکاران نشان دادند که D-لیمونن می تواند سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش فعالیت CAT در موش های دیابتی القا شده با استرپتوزوسین شود (۳۴). در مطالعه دیگر، Santiago و همکارانش نشان دادند D-لیمونن می تواند فشار خون ناشی از استرس اکسیداتیو را در رژیم های غذایی پرچرب و Nω-Nitro ال-آرژنین متیل استر کاهش دهد. آنها نشان دادند D-لیمونن به طور قابل توجهی سطح GSH و فعالیت GPX را در گروه تحت درمان افزایش می دهد (۳۵). استفاده ازD-لیمونن به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی می تواند اثرات مفیدی بر آسیب RIR داشته باشد.

MPO آنزیمی است که طی استرس اکسیداتیو و التهاب توسط نوتروفیل ها آزاد می شود. MPO تولید HOCl را به عنوان یک عامل سیتوتوکسیک کاتالیز می کند (۳۶). در این مطالعه، RIR به طرز معنی داری فعالیت های MPO کلیه و سرم را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد. خاصیت ضدالتهابی D-لیمونن در مطالعات قبلی گزارش شده است (۳۷). بسیاری از مطالعات نشان دادند که آنتی اکسیدان های طبیعی مانند ویتامین E (۳۸)، روغن سیر (۳۹) و آپوسینین (۴۰) می توانند به طرز معنی داری فعالیت MPO و التهاب را کاهش دهند. در مطالعه ما D-لیمونن فعالیت MPO را کاهش داد اما قابل توجه نبود. تفاوت بین مطالعه ما و سایر مطالعات ممکن است در دوز درمان شده و نحوه و یا دوره تجویز آنتی اکسیدان باشد. مطالعه ما همچنین نشان داد که سطح No به طرز معنی داری در گروه RIR در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است. D-لیمونن توانسته بود به طرز معنی داری سطح NO را در مقایسه با گروه RIR کاهش دهد. فعالیت NO به عنوان یک آنتی اکسیدان و پروکسیدان به اثبات رسیده است و برای تعیین وضعیت استرس اکسیداتیو استفاده می شود (۴۱). NO در شرایط فیزیولوژیکی برای عملکرد عروق ضروری است. با این حال NO در موارد غیر طبیعی با ROS واکنش نشان می دهد و منجر به تشکیل پروکسی نیتریت به عنوان یک عامل سمی در سلول می شود (۴۲). برخی از محققان نشان دادند آنتی اکسیدان های طبیعی مانند سلنیوم، ویتامین E (۴۳) و روغن سیر (۳۹) می توانند سطح NO را در شرایط پاتولوژیک کاهش دهند. Sarika و همکاران نشان داند D-لیمونن در کاهش سطح NO در

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.21.7]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.159]

موش های دریافت کننده کلرید آلومینیوم که سبب از دست دادن حافظه آن ها شده بود، نقش دارد (۴۴). نتایج ما و سایر تحقیقات نشان داد آنتی اکسیدان های طبیعی می توانند سطح NO را کاهش دهند. بنابراین استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی مانند D–لیمونن با اثرات مفید بر سطح NO می تواند عوارض RIR مرتبط با استرس اکسیداتیو و التهاب را کاهش دهد.

این مطالعه نشان داد که پیش درمانی با D–لیمونن دارای اثرات مفید بر استرس اکسیداتیو از جمله MDA، GSH و NO و فعالیت CAT بود. این اثرات می تواند به خواص ضد التهابی و آنتی اکسیدانی D–لیمونن همانطور که قبلاً گزارش شده است مربوط شود (۳۳). در مطالعه ما، مکانیسم های دقیق عملکرد آنتی اکسیدانی D–لیمونن به طور کامل نشان داده نشد. پیشنهاد می شود تحقیقات سلولی و مولکولی بیشتری در مورد اثر پیش درمانی با D–لیمونن بر صدمات ناشی از RIR انجام شود.

تضاد منافع نویسندگان: نویسندگان هیچ گونه تضاد منافعی ندارند.

ملاحظات اخلاقی: موارد اخلاقی (از جمله سرقت ادبی، ساخت داده، انتشار مضاعف) توسط نویسندگان کاملاً رعایت شده است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از دانشگاه علوم پزشکی لرستان به جهت حمایت مالی از تحقیق، همچنین از کارکنان مرکز تحقیقات گیاهی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.21.7]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.159]

References

1.Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. J Am Soc Nephrol. 2006;17(6):1503-20.

2.Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. J Renal Inj Prev. 2015;4(2):20-7.

3.Salehipour M, Monabbati A, Salahi H, Nikeghbalian S, Bahador A, Marvasti VE, et al. Protective effect of parenteral vitamin E on ischemia-reperfusion injury of rabbit kidney. Urology. 2010;75(4):858-61.

4.Matthijsen RA, Huugen D, Hoebers NT, de Vries B, Peutz-Kootstra CJ, Aratani Y, et al. Myeloperoxidase is critically involved in the induction of organ damage after renal ischemia reperfusion. Am J Pathol. 2007;171(6):1743-52.

5.Ahmadvand H, Babaeenezhad E, Nayeri H, Nezhad ZZ. Selenium effects on antioxidant and inflammatory indices in renal ischemia-reperfusion injury in rats. J Renal Inj Prev. 2019;8(2):71-7.

6.Vajdovich P. Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-reperfusion injury. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2008;38(1):31-123.

7.Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev. 2010;4(8):118-26.

8.Ghani E, Mohammadi M, Jafari M, Khoshbaten A, Asgari AR. Effect of paraoxon on the oxidative stress indices and lactate dehydrogenase activity in rat liver. J Babol Univ Med Sci. 2012;14(1):45-52. [In Persian]

9.Ishikawa F, Miyazaki S. New biodefense strategies by neutrophils. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2005;53(3):226-33.

10.Korkmaz A, Kolankaya D. Protective effect of rutin on the ischemia/reperfusion induced damage in rat kidney. J Surg Res. 2010;164(2):309-15.

11.Güvenç M, Cellat M, Uyar A, Özkan H, Gokcek İ, İsler CT, et al. Nobiletin Protects from Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats by Suppressing Inflammatory Cytokines and Regulating iNOS-eNOS Expressions. Inflammation. 2020;43(1):336-46.

12.Ahmadvand H, Babaeenezhad E, Nasri M, Jafaripour L, Mohammadrezaei Khorramabadi R. Glutathione ameliorates liver markers, oxidative stress and inflammatory indices in rats with renal ischemia reperfusion injury. J Renal Inj Prev. 2019;8(2):91-7.

13.Ahmadvand H, Tavafi M, Khosrowbeygi A. Amelioration of altered antioxidant enzymes activity and glomerulosclerosis by coenzyme Q10 in alloxan-induced diabetic rats. J Diabetes Complications. 2012;26(6):476-82.

14.Mohebbati R, Kamkar-Del Y, Hamounpeyma I, Alikhani V, Darroudi H, Shafei MN. Comparison of Cardiovascular Effects of Ribes Khorassanicum Fractions with Its Total Extract in Normotensive Rats. J Babol Univ Med Sci. 2021;23(1):9-15. [In Persian]

15.Yang W, Chen X, Li Y, Guo S, Wang Z, Yu X. Advances in Pharmacological Activities of Terpenoids. Nat Prod Commun. 2020;15(3):1-13.

16.Sun J. D-Limonene: safety and clinical applications. Altern Med Rev. 2007;12(3):259-64.

17.Crowell PL. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. J Nutr. 1999;129(3):775S-8S.

18.Bai J, Zheng Y, Wang G, Liu P. Protective effect of D-limonene against oxidative stress-induced cell damage in human lens epithelial cells via the p38 pathway. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:5962832.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.21.7]

[DOI: 10.22088/jbums.24.1.159]

19.Roberto D, Micucci P, Sebastian T, Graciela F, Anesini C. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H2O2 modulation and cell proliferation. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2010;106(1):38-44.
20.Santiago JV, Jayachitra J, Shenbagam M, Nalini N. Dietary d-limonene alleviates insulin resistance and oxidative stress-induced liver injury in high-fat diet and L-NAME-treated rats. Eur J Nutr. 2012;51(1):57-68.
21.Del Toro-Arreola S, Flores-Torales E, Torres-Lozano C, Del Toro-Arreola A, Tostado-Pelayo K, Ramirez-Dueñas MG, et al. Effect of D-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. Int Immunopharmacol. 2005;5(5):829-38.
22.d'Alessio PA, Mirshahi M, Bisson J-F, Bene MC. Skin repair properties of d-Limonene and perillyl alcohol in murine models. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem. 2014;13(1):29-35.
23.Murali R, Saravanan R. Antidiabetic effect of D-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. Biomed Prevent Nutr. 2012;2(4):269-75.
24.Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1979;95(2):351-8.
25.Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys. 1959;82(1):70-7.
26.Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 1984;105:114-21.
27.Cheraghi M, Shahsavari G, Maleki A, Ahmadvand H. Paraoxonase 1 Activity, Lipid Profile, and Atherogenic Indexes Status in Coronary Heart Disease. Rep Biochem Mol Biol. 2017;6(1):1-7.
28.Khalatbary AR, Ahmadvand H. Effect of oleuropein on tissue myeloperoxidase activity in experimental spinal cord trauma. Iran Biomed J. 2011;15(4):164-7.
29.Cheraghi M, Ahmadvand H, Maleki A, Babaeenezhad E, Shakiba S, Hassanzadeh F. Oxidative Stress Status and Liver Markers in Coronary Heart Disease. Rep Biochem Mol Biol. 2019;8(1):49-55.
30.khalatbary AR, Ahmadvand H, Nasiry Zarrin Ghabaee D, Karimpour Malekshah A, Navazesh A. Virgin olive oil ameliorates deltamethrin-induced nephrotoxicity in mice: A biochemical and immunohistochemical assessment. Toxicol Rep. 2016;3:584-90.
31.Khastar H. Protective effects of vitamin E against liver damage caused by renal ischemia reperfusion. Ren Fail. 2015;37(3):494-6.
32.Ozer Şehirli A, Şener G, Ercan F. Protective effects of pycnogenol against ischemia reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. Ren Fail. 2009;31(8):690-7.
33.Fadillioglu E, Kurcer Z, Parlakpinar H, Iraz M, Gursul C. Melatonin treatment against remote organ injury induced by renal ischemia reperfusion injury in diabetes mellitus. Arch Pharm Res. 2008;31(6):705-12.
34.Murali R, Karthikeyan A, Saravanan R. Protective Effects of d-Limonene on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2013;112(3):175-81.
35.Santiago JVA, Jayachitra J, Shenbagam M, Nalini N. D-limonene attenuates blood pressure and improves the lipid and antioxidant status in high fat diet and L-Name treated rats. J Pharm Sci Res. 2010;2(11):752-8.
36.Altunoluk B, Soylemez H, Oguz F, Turkmen E, Fadillioglu E. An Angiotensin-converting enzyme inhibitor, zofenopril, prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats. Ann Clin Lab Sci. 2006;36(3):326-32.
37.Babaeenezhad E, Hadipour Moradi F, Rahimi Monfared S, Fattahi MD, Nasri M, Amini A, et al. D-Limonene Alleviates Acute Kidney Injury Following Gentamicin Administration in Rats: Role of NF- κ B Pathway, Mitochondrial Apoptosis, Oxidative Stress, and PCNA. Oxid Med Cell Longev. 2021;2021:6670007.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.21.7]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.159]

38.Tahan G, Aytac E, Aytekin H, Gunduz F, Dogusoy G, Aydin S, et al. Vitamin E has a dual effect of anti-inflammatory and antioxidant activities in acetic acid–induced ulcerative colitis in rats. Can J Surg. 2011;54(5):333-8.
39.Savas M, Yeni E, Ciftci H, Yildiz F, Gulum M, Keser BS, et al. The antioxidant role of oral administration of garlic oil on renal ischemia–reperfusion injury. Ren Fail. 2010;32(3):362-7.
40.Altintas R, Polat A, Vardi N, Oguz F, Beytur A, Sagir M, et al. The protective effects of apocynin on kidney damage caused by renal ischemia/reperfusion. J Endourol. 2013;27(5):617-24.
41.Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling (Nobel lecture). Angew Chem Int Ed Engl. 1999;38(13-14):1856-68.
42.Lubos E, Handy DE, Loscalzo J. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. Front Biosci. 2008;13:5323-44.
43.Aly HF, Mantawy MM. Comparative effects of zinc, selenium and vitamin E or their combination on carbohydrate metabolizing enzymes and oxidative stress in streptozotocine-induced diabetic rats. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2012;16(1):66-78.
44.Sarika M, Devi AL, Begum R, Begum A. Protective effect of d-limonene on aluminium chloride induced memory loss and learning deficit in mice. World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. 2017;6(4):2103-19.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1401.24.1.21.7]
[DOI: 10.22088/jbums.24.1.159]