sina-pub.ir

ترکیبات زیست فعال، پتانسیل آنتی اکسیدانی و فعالیت حفاظت کبدی خیار دریایی(*Holothuria atra*) در برابر مسمومیت تیواستامید در موش های صحرایی

چکیده :

هدف: هدف این مقاله شناسایی ترکیفات فنولیک فعال در عصاره ترکیبی دیواره بدنی خیار دریایی (*Holothuria atra*) با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و ارزیابی فعالیت حفاظت کبدی آن در برابر فیبروزیس کبدی ناشی از تیواستامید در موش های صحرایی می باشد.

روش ها : موش های ماده از نژاد زال سوییسی به چهار گروه تقسیم شدند: شاهد های نرمال، تجویز خوراکی عصاره ترکیبی خیار دریایی(14.4 میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) در روز های 2، 4 و 6 به طور هفتگی به مدت هشت هفته متوالی، مسمومیت با تیواستامید(200 میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، به صورت داخل صفاقی) در روز های 2 و 6 به طور هفتگی به طور هشت هفته و تجویز خوراکی عصاره خیار دریایی و سپس مسمومیت با تیواستامید 2 ساعت بعد به مدت هشت هفته.

نتایج : تحلیل کروماتوگرافی مایع با کارایی بالای عصاره ترکیبی خیال دریایی، حضور برخی اجزای فنولیک نظیر اسید کلروژنیک، پیروکالول، روتین، کوماریک اسید، کاتچین و اسید اسکوربیک را نشان داد. مطالعات برون تنی نشان داده اند که این عصاره دارای فعالیت تنظیف کنندگی بالایی برای رادیکال اکسید نیتریک، فعالیت کی لیت کنندگی آهن و اثر بازدارندگی ضعیف پروکسیداسیون لیپید می باشد. تجویز خوراکی تحت مزمن عصاره خیار دریایی به موش های صحرایی، اثرات جانبی سمی را نشان نداد بلکه موجب افزایش دیسمیوتاز سوپر اکسید هپاتیک و فعالیت های پروکسیداز گلوتاسیون شد. تجویز هم زمان عصاره خیار دریایی و تیواستامید(شیوه حفاظتی) موجب نرمال سازی بیلی روبین، آلانین و آسپارتات آمینوترانسفرازها، مالون دی آلدئید های کبدی و غلظت هیدروکسی در سطح خون و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان شد. به علاوه، معاینه بافت شناسی بخش های کبد از گروه حفاظتی که با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ امیزی شده بودند، کاهش و تضعیف تغییرات سلولی دژنراتیو و کاهش در نکروزیس و فیبروزیس کبد ناشی از مسمومیت تیو استامید را نشان داد.

sina-pub.ir

نتیجه گیری : عصاره ترکیبی خیار دریایی حاوی ترکیبات فنولیک فعال از نظر فیزیولوژیکی با فعالیت آنتی اکسیدانی بوده که در عین حال یک فعالیت حفاظت کبدی بالقوه را در برابر آسیب کبدی ناشی از تیو استامید در مدل موش صحرایی القا می کند.

کلمات کلیدی: عصاره Holothuria atra، تحلیل کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، مطالعات آنتی اکسیدان برون تنی، تیو استامید، تست های عملکرد کبد، آنزیم های انتی اکسیدانی، مطالعات بافت شناسی، موش های صحرایی

مقدمه

خیار دریایی(Holothuria) یک بی مهره دریایی از شاخه خارپوستان و رده هولوتوریدا می باشد که در بستر دریا های جهان یافت می شود(1). بیش از 1000 گونه خیار دریایی وجود دارد و تقریبا 20 گونه از آن ها خوراکی هستند. خیار دریایی یک غذای لذیذ در چین و کشور های آسیایی می باشد. خیار دریایی، علاوه بر مزه و طعم خوب، عمدتا برای درمان زخم ها، اگزما، ورم مفاصل، فشار خون بالا، و ناتوانی جنسی (2-3) استفاده می شود. خیار دریایی یک غذای سالم است زیرا حاوی مواد فعال فیزیولوژیکی از جمله ویتامین ها (A، C، B1، B2، B3 و)، عناصر کمیاب (کلسیم، آهن، منیزیم و روی)، پلی ساکارید (سولفات کندرویتین) و گلیکوزیدهای ماده موثره ساپونین (4) می باشد. به علاوه برخی ترکیبات فعال زیستی استخراج شده از هولوتریان ها دارای فعالیت های ضد التهابی(5)، ضد تومور(6) و قارچ کش می باشند(7). بیشتر مطالعات بر روی خیار دریایی دریای سرخ (H. atra)، به صورت تاکسونومیکی بوده اند(8-10).

استرس اکسیداتیو نقش مهمی درآسیب کبدی (11) ایفا می کند. توجه اخیر به فنولیک های غذایی به دلیل نقش آن ها به عنوان آنتی اکسیدان ها و تنظیف کننده های گونه های اکسیژن واکنشی و رادیکال های آزاد و نیز نقش آن ها در پیش گیری از بسیاری از بیماری های پاتولوژیک نظیر بیماری های قلبی و کبدی(12) افزایش یافته است. هم چنین، ترکیبات فنولیک موجب افزایش مکانیسم های دفاعی درون زا شده، عناصر پاسخ آنتی اکسیدانی که تنظیم کننده بیان ژن آنزیم های دخیل در متابولیسم مرحله دوم زنوبیوتیک ها و دفاع آنتی اکسیدانی است را تحریک کرده و در عین حال اثرات بازدارندگی بر روی پروکسیداسیون لیپید غشا نشان می دهند(13).

sina-pub.ir

هدف مطالعه حاضر شناسایی ترکیبات فنولیک فعال زیستی در عصاره ترکیبی دیواره بدنی H. atra و ارزیابی پتانسیل حفاظت کبدی آن در برابر فیبروز کبدی ناشی از تیو استامید TAA در موش های صحرایی می باشد. هدف دیگر این مطالعه تعیین اثر بخشی و کارایی انتی اکسیدانی عصاره ها در سیستم های بدون سلول می باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری و تهیه نمونه

خیار دریایی صید شده از دریای سرخ(غردقه: شهری در کرانه مصر) توسط دکتر محمد زکی(آزمایشگاه بیو شیمیی دریایی، موسسه ملی شیلات و اقیانوس شناسی، شعبه خلیج عقبه و سوئز) برای این مطالعه اهدا شد. حیوانات به ازمایشگاه در جعبه های یخ حاوی مکعب یخ با کمی نمک سفره انتقال داده شدند. حیوانات فورا با آب مقطر شسته شده و تشریح شدند و همه اندام های احشایی آن ها خارج شد. کلیه اندام های داخلی یا سیالات بدنی شسته شده و سپس دیواره های بدنی این حیوانات در دمای-20 درجه تا زمان فراوری ذخیره شدند.

تهیه عصاره(آلی/آبی) نرکیبی خیار دریایی

روش استخراج در این مطالعه از مقاله هاک و همکاران(14) با اندکی اصلاحات اقتباس شد. دیواره های بدنی خیار های دریایی به قطعات کوچک بریده شده و در یک مخلوط کن خرد شده و سپس درون پتری دیش ریخته شد. پتری دیش ها به طور دقیق توزین شده و در یک آون در دمای 70 درجه به مدت 18 تا 20 ساعت قرار داده شدند تا زمانی که تغییری در وزن مشاهده نشد. نمونه های خشک شده با هاون تا زمان تولید پودر ریز ترکیب شدند. وزن پودر ریز در 10 حجم از ترکیب است و نیتریل و 0.1 درصد تری فلور استیک اسید در نسبت 60:40 معلق شده و به طور پیوسته به مدت 24 ساعت با استفاده از یک هم زن مغناطیسی هم زده شد. عصاره در 3000 دور بر دقیقه به مدت بیست دقیقه سانتریفیوژ شده و سوپر ناتانت وارد فلاسک خشک شده و در دمای 40 درجه حفظ شد. عصاره گیری دو بار بر روی باقی مانده ها تکرار شده و سوپرناتانت ها ترکیب شدند. عصاره ترکیبی در دمای 4 درجه به مدت 24 ساعت حفظ شد تا زمانی که حلال آلی به طور کامل تبخیر شده و سپس در دمای - 50 درجه به مدت 36 ساعت تحت انجماد خشک قرار گرفت.

مطالعات شیمیایی

تحلیل ترکیبات متابولیک

sina-pub.ir

پروتین محلول کل، کربوهیدرات و مقدار لیپید در عصاره ترکیبی خیار دریایی بر طبق روش های لاوری و همکاران(15) دوبیوس(16) و نایت و همکاران(17) تعیین شدند.

تحلیل کروماتوگرافیک مایع با کارایی بالا

اجزای فنولیک عصاره خیار دریایی با کروماتوکرافی مایع با کارایی بالا با استفاده از دستگاه Agilent 1100 (والدبورن المان) مجهز به ستون 300SB C18 فاز معوس زوباکس (250 در 4.6 میلی متر) با اندازه متوسط 5 میکرومتر(لاورنس KS-USA) و شناساگر فرابنفش(G1314A) تنظیم شده در 280 نانومتر تفکیک شدند. نمونه و استاندارد های واقعی (50 میکرو لیتر؛ اسید کلروژنیک، کوماریک اسید، کاتچین، اسید اسکوربیک، پیروکالول، و روتین) حل شده در دیمتیل سولفوکسید و اسیدی شده با کاهش اسید استیک به ستون تزریق شد. فاز متحرک 0.4 درصد اسید فورمیک و استونیتریل(60:40, v/v) با سرعت جریان ثابت 1 میلی لیتر در دقیقه بود. پیک های ایزوله شده ترکیبات فنولیک در نمونه ها مقایسه زمان های نگهداشت حفظتی با استاندارد ها شناسایی شده و سپس غلظت هر ترکیب به صورت انتگراسیون منطقه پیک محاسبه شد.

مطالعات بیوشیمیایی

حیوانات

موش های صحرایی زال سوییسی ماده و بالغ با وزن 150 تا 200 گرم در این مطالعه استفاده شدند. حیوانات در قفس های توری فولادی(پنج حیوان در هر قفس) نگه داشته شده و دسترسی آزاد به غذای پلت شده تجاری و آب به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش(به عنوان دوره سازگاری) داشتند. همه آزمایشات حیوانی تحت پروتکل مصوب کمیته بین المللی اخلاق حیوانات دانشگاه عین الشمس انجام شدند.

تهیه و تجویز عصاره ترکیبی خیار دریایی

محلول ذخیره عصاره ترکیبی خیار دریایی در پلی پروپیلن گلیکول(بیوشاپ، انتاریو، کانادا) تهیه شده، در دمای 4 درجه ذخیره سازی شده و به طور هفتگی تعویض شدند. موش های صحرایی ناشتا با عصاره خیار دریایی با لوله گذاری معدی در سطوح دوز 14.4 میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن به صورت سه بار در هفته(روز های 2، 4 و 6) به مدت هشت هفته متوالی تجویز شدند. دوز مربوطه بر اساس ارزیابی مقدماتی مسمومیت حاد انتخاب شد. مسمومیت حاد برای دو دوز عصاره(دوز پایین 14.40 میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن، دوز بالای 28.80 میلی

sina-pub.ir

گرم بر کیلوگرم وزن بدن معادل با 1000 و 2000 میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن انسان) در ده موش ماده زال سوییسی انجام شد. حیوانات علایم مرگ و میر و علایم مسمومیت را پس از 24 ساعت تیمار، نشان ندادند.

القای شیمیایی ازمایشی فیبروز کبدی

فیبروز کبدی در حیوانات بر طبق روش تیوما و همکاران(18) با اصلاحات خفیف القا شد. موش های صحرایی تحت تزریق داخل صفاقی TAA تازه در محلول آب نمک استریل(200 میلی گرم بر کیلیو گرم وزن بدن) به صورت دو هفته(روز های 2-6-8) به مدت هشت هفته متوالی تزریق شدند.

طرح مطالعه

شصت و دو موش زال سوییسی بالغ به طور تصادفی در چهار گروه قرار گرفتند: 1- موش های صحرایی که تحت تزریق داخل صفاقی پلی پروپیلن گلیکول قرار گرفته و به عنوان شاهد های نرمال قرار گرفتند(گروه NC، n=10)، موش هایی که تحت تجویز خوراکی عصاره خیار دریایی قرار گرفتند(گروه ex، n=12)، موش هایی که با TAA مسموم شده و به صورت شاهد های منفی در نظر گرفته شدند(گروه TAA، n=20) و موش هایی که از طریق گاواژ، عصاره خیار دریایی را دریافت کرده و سپس تحت تزریق داخل صفاقی با TAA دو ساعت بعد قرار گرفتند(حفاظتی، گروه Ex + TAA، n=20).

جمع آوری و نمونه برداری خون و برخی اندام های بدن

در پایان آزمایش(هشت هفته)، حیوانات توزین شده و نمونه های خون از شبکه وریدی رترو-اوربیتال تحت بیهوشی خفیف اتر پس از 12 ساعت گرسنگی گرفته شد. سپس سروم از نمونه های خون لخته شده با سانتریفیوژ در 5000 دور بر دقیقه به مدت 5 دقیقه جدا شده و نمونه گیری انجام و تجزیه تحلیل صورت گرفت. دیواره قفسه سینه حیوانات برش یافته و سپس کبد، قلب، کلیه ها و طحال تشریح شه، و در محلول آب نمک ایزوتونیک شسته شده، و بر روی یک کاغذ صافی قرار گرفته و توزین شدند. نسبت وزن هر اندام به کل وزن بدن به صورت شاخص مفید مسمومیت محاسبه شد(19). بخش کوچکی از لوب سمت راست کبد بریده شده و به مدت 3 روز در 10 درصد فرمالین بافر فسفات (اسیدیته 7.2) در دمای 4 درجه برای معاینه بافتی تثبیت شدند. بافت کبد

sina-pub.ir

باقی مانده در یک ویال پلاستیک حاوی اب نمک استریل سرد قرار داده شده و سپس تا زمان تحلیل بیو شمیایی در دمای -80 درجه ذخیره گردید.

تهیه هموژنات کبد

محتوی مالون دی الدهید(MDA) و هیدروکسی پرولین در 29 درصد هموژنات کبد تهیه شده در اب نمک بافر فسفات(اسیدیته 7.4) براورد شد. تری اسیل گلیسرول ها، گلوتاسیون کاهش یافته، پروتین کل و غلظت دی ان ای و ار ان ای در 20 درصد هموژنات کل کبد در بافر تریس – ساکاروز یخ(Tris-HCl 50 میلی کول بر لیتر و ساکاروز 0.25 مول بر لیتر، اسیدیته 7.4) براورد ش. نمونه های هموژنات در 15000 دور بر دقیقه به مدت 15 دقیقه در 4 درجه سانتری فیوژ شده و سوپرناتانت ها برای تعیین سوپر اکسید دیسمیوتاز SOD، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، و فعالیت های (CAT) کاتالاز جمع اوری شدند.

تست های بیوشیمیایی

بیلی روبین کانژوگه سروم و پروتین کل به طور کالریمتری به ترتیب با استفاده از کیت تست تجاری((شرکت دیاگنوستیک گرینر، بادن-وورتمبرگ، آلمان) و با روش گارنول و همکاران(20) تعیین شد. سنجش الکتروفورتیک اجزای پروتین خون(پنج نمونه در هر گروه) بر روی نوار های استات سلولز(هلنا بیوساینس یورپ، جنوا، ایتالیا) انجام شده و باند ها بر روی رنگ قرمز S ظاهر شده و اسکن گردیدند(چگالی سنج Cliniscan-3 ، آزمایشگاه هلنا ، بیمونت ، TX، USA) اسکن شده و سپس مقدار مطلق برای هر اند پروتین به طور خودکار محاسبه شد. غلظت تری گلیسرول ها در هموژنات کبد با روش گوتریفید و روزنبرگ (21) براورد شد. پروکسیداز لیپید هپاتیک به صورت مواد واکنشی تیو باربیتوریک(22) با استفاده از MDA به عنوان یک استاندارد با ضریب انهدام $1.53 \times 10^5\ mol/L^{-1}/cm^{-1}$(23) ارزیابی شد. محتوی GSH و هیدروکسی پرولین در هموژنات کبد با روش باتلر و همکاران(24) و نیومن و لوگان(25) براورد شد. غلظت پروتین کل در هموژنات کل بافت و اجزای سیتوسولیک آن ها با روش اتصال رنگی برادفورد براورد گردید(26). DNA و RNA از کل هموژنات بافتی با اسید پرکلوریک 5 درصد بر طبق روش اشنایدر (27) استخراج شده و سپس به صورت کالریمتریک با روش دی فنیل الامین و ارسینول تعیین شد. نسبت های پروتین/ دی ان ای و ار ان ای/ دی ان ای محاسبه شد.

تست های آنزیمی

sina-pub.ir

فعالیت های آلانین سروم و آسپارات آمینو ترانسفراز(به ترتیب ALT و AST) با روش کالریمتریک ریتمن و فرانکل(30) تعیین شدند. فعالیت فسفاتاز آلکالین(قلیایی) با روش کالریمتریک کایند و کینگ(31) تعیین شد. SOD (EC 1.15.1.1)، GPX (EC 1.11.1.9)، و CAT (EC 1.11.1.6) در اجزای سیتوسولیک هموژنات های کبد با استفاده از کیت های تست تجاری ارایه شده توسط سیستم RD و بیوکسی تک (پورتلند امریکا) تعیین شدند. فعالیت های آنزیم آنتی اکسیدانی به صورت واحد به ازای هر میلی گرم پروتین بیان شدند.

مطالعات بافت شناسی

نمونه های تثبیت شده کبد(شش نمونه در هر گروه) برای تشکیل مکعب های پارافرین فراوری شده و سپس مقاطع نازک 5 میکرو متری برش داده شده و در محلول هماتوکسیلین و ائوزین رنگ امیزی گردیده و تحت میکروسکوپ نوری در بزرگ نمایی 125 - 600 × بررسی شدند. هر اسلاید از نظر وجود دژنرسانس بالونی، ارتشاح سلول های التهابی و نکروز سلولهای کبدی بررسی گردید که در یک مقیاس 4 نقطه ای درجه بندی شدند به طوری که درجه 0 (G0) منفی ، درجه 1 (G1) بالاتر از 33٪، درجه 2 (G2) 33 تا 66٪ ، و درجه 3 (G3) بالاتر از 66 درصد می باشد. مرحله فیبروز کبدی در هر اسلاید با مقیاس METAVIR درجه بندی شد که فیبروز را در مقیاس پنج نقطه ای درجه بندی می کند:F0 ، عدم فیبروز؛ F1، فیبروز پورتال بدون سپتوم؛ F2، فیبروز پورتال با چند سپتوم؛ F3، سپتوم متعدد و بدون سیروز؛ و F4، سیروز(32).

مطالعات آنتی اکسیدانی برون تنی

فعالیت های کی لیت کنندگی آهن و آنتی اکسیدانی عصاره ترکیبی خیار دریایی در سیستم های عاری از سلول تعیین شد. سه سطح دوز مضاعف(150 تا 600 میکرو گرم بر میلی لیتر) انتخاب و با استاندارد های مرجع سنتتیک مقایسه شد. کم ترین دوز با غلظت دارویی تقریبی در سروم خون میزبان با دوز 14.40 میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن مشابه بود که در مطالعات بیوشیمیایی نیز استفاده شده بود. اثر عصاره خیار دریایی در تنظیف رادیکال های اکسید نیتریک و 1-1- دیفنیل- 2 – پیکریهیدازیل هیدرات(DPPH) به ترتیب از طریق روش های گارات(33) و لیان- پاتیرانان و شهیدی(34) ارزیابی شد. اسید اسکوربیک(200 میکرو گرم بر میلی لیتر)، ترت- بوتیل- هیدروکوینین و هیدروکسینیزول بوتیلات(600 میکرو گرم بر میلی لیتر) به عنوان استاندارد های مرجع استفاده شدند(35-36). ظرفیت عصاره برای کیلیت کنندگی آهن از طریق روش تانگ و همکاران(37) با استفاده

sina-pub.ir

از ادتیک اسید(100 میکرو گرم بر میلی لیتر) به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. بازدارندگی پروکسیداسیون لیپید بر طبق روش لیو و انچی(38) و با استفاده از 25 درصد هموژنات کبد موش صحرایی به عنوان منبع اسید های چرب اشباع شده تعیین شد. درصد بازدارندگی پروکسیداسیون لیپید از طریق مقایسه جذب عصاره با شاهد ارزیابی شد(ترکیب هموژنات بدون عصاره).

تحلیل آماری

داده ها به صورت میانگین+ انحراف معیار بیان شدند. تعداد بازمانده ها و مرگ و میر در پایان آزمایش از طریق آزمون دقیق فیشر ارزیای شدند. نتایج مطالعات بیو شمیایی به طور آماری با استفاده از تحلیل واریانس یک سوه تحلیل شد. در صورت نسبت معنی دار F، آزمون بنفرونی پست هاک برای مقایسات چندگانه انجام شد. در مطالعات بافت شناسی، آزمون های کروسکال والیس و من ویتنی برای تشخیص معنی داری بین گروه ها انجام شد. همه آزمون ها با SPSS 17 برای ویندوز انجام شدند. تفاوت ها در سطح $P < 0.05$ از نظر آماری به صورت معنی دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

ترکیبات متابولیک و فنولیک در عصاره خیار دریایی

غلظت های پروتین کل، لیپید و کربوهیدرات در عصاره ترکیبی خیار دریایی به ترتیب 290، 27.36 و 18.7 میلی گرم بر گرم عصاره وزن خشک بود که معادل با 2.90، 0.27 و 0.19 میلی گرم بر گرم وزن مرطوب بدن می باشد. آنالیز عصاره با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا حضور 9 ترکیب فنولیک غیر فرار را نشان داد که از این تعداد تنها سه مورد تحت ششرایط مربوطه شناسایی نشدند. اسید کلروژنیک یک ترکیب اصلی (92.86 درصد)، در حالی که اسید اسکوربیک(0.067 درصد) یک ترکیب فرعی بود. سایر اجزا نظیر پیروکالول (2.99٪)، روتین (1.83٪)، کوماریک اسید (1.55٪)، و کاتچین (0.51٪)، نیز شناسایی شدند(جدول 1).

جدول 1: تحلیل عصاره ترکیبی خیار دریایی با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

شماره پیک	Tr(دقیقه)	غلظت بر حسب درصد	ترکیب

sina-pub.ir

1	3.331	92.86	اسید کلروژنیک
2	3.382	2.99	پیروکالول
3	3.713	1.83	روتین
4	3.966	0.067	اسید اسکوربیک
5	4.053	0.097	ناشناس
6	4.581	0.51	ناشناس
7	5.165	0.046	کوماریک اسید
8	5.38	1.55	ناشناس
9	6.477	0.039	

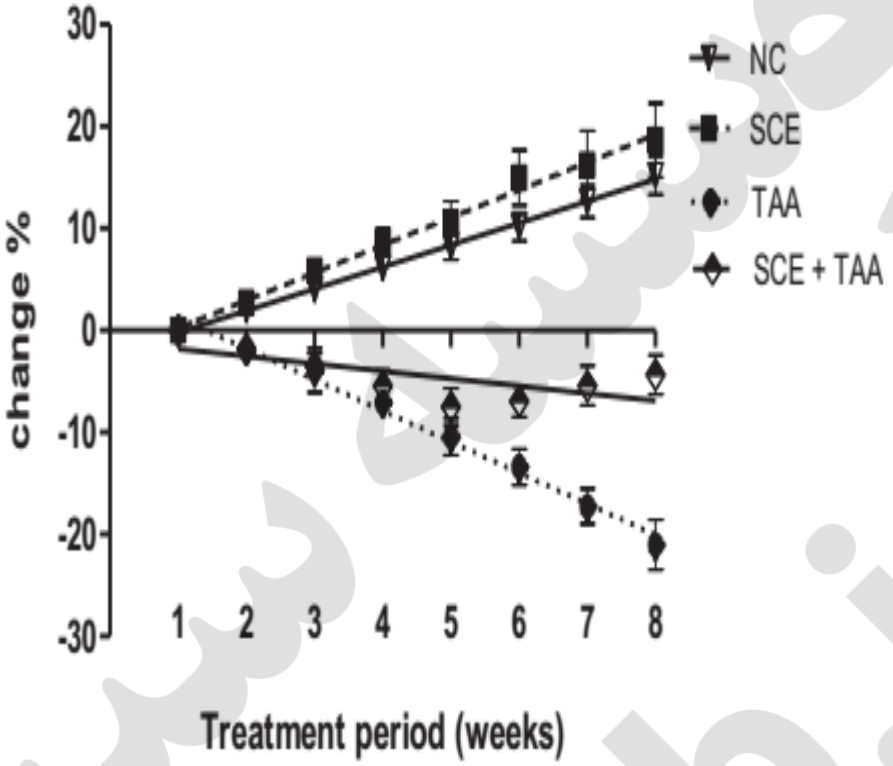
اثرات عصاره های خیار دریایی یا TAA بر روی وزن بدن، اوزان برخی از اندام ها و نرخ بقا

یک افزایش تدریجی در وزن بدن موش صحرایی NC و موش های دریافت کننده عصاره خیار دریایی ثبت شد که به ترتیب در پایان آزمایش در مقایسه با وزن اولیه به ترتیب 15.24 و 18.67 درصد بود. با این حال، یک کاهش ناگهانی در وزن بدن موش های مسموم شده با TAA(21.03 درصد) مشاهده شد که به طور قابل توجهی در گروه حفاظتی(4.34 درصد، شکل 1) اصلاح شد. مسمومیت TAA(گروهTAA) منجر به مرگ دو موش صحرایی در هفته های 1-2-3-5 و یک موش در هفته های 4-6-7 شده و نرخ بقا برابر با 45 درصد(9 موش از 20 موش) در پایان دوره درمان بود($P<0.05$ در مقابل NC، جدول 2). در گروه حفاظتی، دو مرگ و میر در هفته های 2-6-7 و یک مرگ ومیر در هفته سه ثبت شده و یک نرخ بقای 65 درصد(13 از 20 موش) در پایان ازمایش بدست امد($P<0.05$ در مقابل NC، جدول2).

تجویز خوراکی عصاره خیار دریایی به موش های طبیعی منجر به کاهش معنی داری در اوزان مطلق کبد، قلب، کلیه ها و طحال (29.09٪، 23.08٪، 22.56٪، 22.22٪)، شد، در حالی که اوزان نسبی آن ها، به طور غیر معنی داری در مقایسه بانرخ NC تغییر یافت. مسمومیت TAA منجر به افزایش معنی داری در اوزان مطلق و نسبی کبد، کلیه و طحال (به ترتیب 17.39٪ و 69.9٪، 27.82٪ و 87.76٪، 61.62٪ و 129.73 درصد) و در وزن نسبی قلب(40.88 درصد) گردید، در حالی که وزن مطلق آن به طور معنی داری در مقایسه با موش های NC کاهش یافت. تجویز هم زمان عصاره خیار دریایی و سمیت TAA به طور معنی داری موجب کاهش وزن تر کبد(14.54 درصد)، قلب(23.98 درصد) و طحال(27.27 درصد) شد، در حالی که کلیه ها تحت تاثیر قرار

sina-pub.ir

نگرفتند. به علاوه، موجب نرمال شدن اوزان نسبی همه اندام ها به جز کبد شد که به طور معنی داری در مقایسه با موش های NC افزایش یافتند(جدول 3).



درصد تغییرات، دوره درمان(هفته)

شکل 1: تغییرات در افزایش وزن بدن موش های صحرایی (که به صورت درصد بیان می شود) در گروه های تیماری مختلف در سرتاسر دوره آزمایشی هشت هفته ای در مقایسه با وزن اولیه بدن. هر نقطه بیانگر میانگین+ انحراف معیار 9 تا 20 موش صحرایی است. NC: نرمال شاهد، SCE: عصاره خیار دریایی، TAA: تیو استامید

جدول 2: درصد بقای موش های صحرایی در پایان تیمار در گروه های مختلف

Groups	0 wk	8 wk	
		Survivors (%)	Deaths (%)
NC	10	10 (100%)	0.0 (0%)
Ex	12	12 (100%)	0.0 (0%)
TAA	20	9.0 (45%)*	11 (65%)
Ex + TAA	20	13 (65%)	7.0 (35%)
Total	62	44	18

sina-pub.ir

گروه ها، درصد بازمانده ها، درصد مرگ و میر

Ex: عصاره خیار دریایی، nc: شاهد نرمال، TAA: تیو استامید

*معنی دار در سطح $P < 0.05$ در برابر NC

اثرات عصاره خیار دریایی یا تیو استامید بر روی تست های عملکرد کبد

تجویز خوراکی عصاره ترکیبی خیار دریایی به موش های نرمال منجر به تغییرات غیر معنی دار در سطح بیلی روبین کانژوگه خون، فعالیت های ALT-AST-ALP و نسبت AST-ALT در مقایسه با موش های صحرایی NC شد. بر عکس، مسمومیت TAA منجر به افزایش معنی داری در بیلی روبین خون(112.5٪)، و فعالیت های ALT (168.53٪)، AST (493.91٪)، و ALP (272.62٪) و نسبت AST/ALT (140.43 درصد) در مقایسه با موش های صحرایی NC شد. تجویز تحت مزمن عصاره خیار دریایی و مسمومیت TAA، موجب نرکال سازی سطح بیلی روبین خون، نسبت ALT-AST و AST/ALT شد، در حالی که افزایش معنی داری در فعالیت ALP(27.52 درصد) ثبت شد(جدول 4).

اثرات عصاره خیار دریایی یا تیو استامید بر روی پروتین کل خون و اجزای آن

تیمار خوراکی موش های صحرایی نرمال با عصاره ترکیبی خیار دریایی منجر به تغییرات غیر معنی دار در سطح پروتین خون و اجزای آن در مقایسه با شاهد های نرمال شد. بر عکس، مسمومیت تیو استامید منجر به افزایش معنی داری در پروتین کل خون (31.04٪)، آلبومین (27.78٪)، و و الفا 1 (41.67 درصد)، الفا 2(40 درصد)، بتا (30.38٪)، و گاما (33.87٪)، غلظت گلوبولین در مقایسه با موش های شاهد نرمال شد. تجویز هم زمان عصاره خیار دریایی و تیو استامید بر روی موش ها موجب احیای عملکرد پروتین خون تا سطح نرمال شد. نسبت البومین به گلوبولین به طور معنی داری در همه تیمار ها تغییر نداشت(جدول5).

اثرات عصاره خیار دریایی و یا تیو استامید بر روی آنزیم های آنتی اکسیدانی و MDA، GSH هپاتیک

تجویز تحت مزمن عصاره خیار دریایی به موش های صحرایی نرمال موجب تحریک معنی دار فعالیت های SOD و GPx شد، در حالی که غلظت های GSH و MDA و فعالیت CAT به طور معنی داری در مقایسه با موش های نرمال شاهد تغییر نکرد. بر عکس، مسمومیت TAA موجب افزایش معنی دار در MDA هپاتیک(278.61 درصد)

sina-pub.ir

و GSH(263.01 درصد) و کاهش فعالیت های GPX (69.05٪)، و CAT (26.07٪) در مقایسه با موش های شاهد نرمال شد. همه پارامتر های فوق در گروه های حفاظتی، نرمال بودند(جدول 6).

اثرات عصاره خیار دریایی یا تیواستامیک بر روی تری اسیل گلیسرول ها، هیدروکسی پرولین، پروتین کل و غلظت های اسید نوکلییک

تیمار خوراکی موش های صحرایی با عصاره خیار دریایی، منجر به تغییرات معنی داری در تری اسیل گلیسرول های هپاتیگ، پروتین کل هیدرکسی پرولین و پروتین کل، سطوح RNA-DNA و نسبت های پروتین/DNA و RNA/DNA در مقایسه با موش های صحرایی شاهد نرمال نگردید. مسمومیت TAA منجر به افزایش معنی دار در غلظت های تری گلیسرول کبدی (208.76٪) و هیدروکسی پرولین (1890.91٪) و نسبت پروتین/ دی ان ای(31.22 درصد) شد، برعکس، کاهش های معنی دار در پروتین کل، غلظت های RNA و DNA(به ترتیب 40.34، 59 و 54.98 درصد) در مقایسه با موش های صحرایی NC مشاهده گردید. همه پارامتر های فوق در گروه حفاظتی نرمال بودند و تنها افزایش معنی داری در سطوح تری اسیل گلیسرول ها (36.83 درصد) مشاهده شد. نسبت DNA/RNA هپاتیک در هیچ یگ از تیمار ها تغییر نکرد(جدول 7).

بررسی بافتی

معاینه بافتی بخش های کبد از موش های شاهد و تیمار شده با EX با هماتوکسیلین و ائوزین(شکل 2 الف و ب) یک معماری سلولی نرمال را نشان داد. بر عکس، بخش های کبدی موش های مسموم با تیاکسامید تغییرات دژنراتیو حاد را نشان دادند: دژنرسانس بالونی (G3)، نکروز و ارتشاح سلولهای التهابی (G3)، و فیبروز پیشرفته(جداول 8-9، شکل 2 پ-ت). برعکس بخش های گروه حفاظتی، الگوی نرمالی را با افزایش پارانشیم هپاتوسیت نرمال، کاهش توسعه سپتوم فیبروز و نفوذ لنفوسیت (G0-G2)، فیبروز کبد (F0-F2) و بازیابی خوب نکروز(G0، جداول 8-9، شکل g-h) نشان داد.

جدول 3: اثرات عصاره ترکیبی خیار دریایی یا تیو استامید بر روی اوزان تر و نسبی برخی اندام های بدن در موش صحرایی

sina-pub.ir

Groups	Liver		Heart		Kidneys		Spleen	
	g	wt/bw	g	wt/bw	g	wt/bw	g	wt/bw
NC								
Mean ± SD	6.67 ± 0.55[a]	24.65 ± 0.50[a]	0.91 ± 0.03[a]	3.62 ± 2.00[a]	1.33 ± 0.13[a]	4.90 ± 0.69[a]	0.99 ± 0.07[a]	3.70 ± 0.35[a]
Ex								
Mean ± SD	4.73 ± 0.59[b]	25.34 ± 2.26[a]	0.70 ± 0.09[b]	4.30 ± 1.70[a]	1.03 ± 0.13[b]	5.31 ± 0.55[a]	0.77 ± 0.20[bd]	4.10 ± 0.89[a]
Change (%)	−29.09	2.80	−23. 08	18.78	−22.56	8.37	−22.22	10.81
TAA								
Mean ± SD	7.83 ± 0.47[c]	41.88 ± 3.05[b]	0.78 ± 0.04[b]	5.10 ± 1.50[b]	1.70 ± 0.11[c]	9.20 ± 0.97[b]	1.60 ± 0.16[c]	8.50 ± 0.82[b]
Change (%)	17.39	69.90	−14.29	40.88	27.82	87.76	61.62	129.73
Ex + TAA								
Mean ± SD	5.70 ± 0.73[d]	28.51 ± 2.73[c]	0.70 ± 0.10[b]	3.90 ± 1.60[a]	1.20 ± 0.16[a]	5.50 ± 0.53[a]	0.72 ± 0.23[d]	3.60 ± 0.87[a]
Change (%)	−14.54	15.66	−23.08	7.73	−9.77	12.24	−27.27	−2.70
F ratio	49.75	109.70	16.38	50.02	44.72	71.71	43.82	88.29

گروه ها، کبد، قلب، کلیه، طحال،

جدول 4: اثرات عصاره ترکیبی خیار دریایی یا تیو استامید بر روی سطح بیلی روبین مستقیم خون، ALT، AST و ALP و نسبت AST/ALT در موش های صحرایی

Groups	Conjugated bilirubin (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	AST/ALT ratio
NC					
Mean ± SD	0.40 ± 0.06[a]	33.75 ± 7.44[a]	103.13 ± 24.78[a]	56.76 ± 4.90[a]	3.29 ± 0.53[a]
Ex					
Mean ± SD	0.35 ± 0.04[a]	30 ± 8.86[a]	121.88 ± 33.91[a]	52.89 ± 4.75[a]	3.45 ± 0.86[a]
Change (%)	−12.5	−11.11	18.18	−6.82	4.86
TAA					
Mean ± SD	0.85 ± 0.06[b]	90.63 ± 26.52[b]	612.5 ± 88.64[b]	211.50 ± 14.27[b]	7.91 ± 0.74[b]
Change (%)	112.5	168.53	493.91	272.62	140.43
Ex + TAA					
Mean ± SD	0.39 ± 0.06[a]	40.63 ± 6.23[a]	129.64 ± 24.12[a]	72.38 ± 7.17[c]	3.43 ± 0.86[a]
Change (%)	−2.5	20.39	25.71	27.52	4.26
F ratio	192.01	62.70	519.30	658.87	70.66

گروه ها، بیلی روبین(میلی گرم بر دسی لیتر)

ALP، آلکالن فسفاتاز؛ ALT، آلانین آمینوترانسفراز؛ AST، آسپارتات آمینوترانسفراز؛ Ex، عصاره خیار دریایی؛ NC، شاهد نرمال؛ TAA، تیواستامید

داده ها به صورت میانکین+ انحراف معیار(n=9-13 موش در هر گروه) بیان می شوند. مقادیر با علامت مشترک، فاقد تفاوت معنی دار می باشند.

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره خیار دریایی

عصاره خیار دریایی ، فعالیت تنظیف کنندگی بالایی را برای NO (93.42 درصد در 600 میلی گرم بر میلی لیتر) در مقایسه با ویتامین C استاندارد(44.7 درصد در 200 میکرو گرم بر میلی لیتر) و فعالیت تنظیف کنندگی پایین برای DPPH(16.8- 17.01 درصد) در همه غلظت های تست شده با توجه به آنتی اکسیدان های سنتتیک، هیدروکسینوزیل بوتیلات(84.7 درصد در 600 میکرو گرم بر میلی لیتر) و ترت بوتیل هیدروکوینین(85.3 درصد در 600 میکرو گرم بر میلی لیتر) نشان داد. برای فعالیت کی لیت کنندگی آهن، عصاره، پتانسیل متوسط(57

sina-pub.ir

درصد در 600 میکرو گرم بر میلی لیتر) در مقایسه با اسید اتیلن دیامین ترا استیک اسید (100 درصد در 100 میکرو گرم بر میلی لیتر) نشان داد. ترکیب عصاره خیار یک بازدارندگی پروکسیداسیون لیپید وابسته به دوز 28.02٪، 33.76٪، و 36.4٪ در 150، 300، و 600 میکرو گرم / میلی لیتر) را نشان داد(جدول 10).

بحث

در این مطالعه، تحلیل کمی ترکیبات متابولیک در عصاره ترکیبی خیار دریایی ، مقدار پروتین بالاتری را در مقایسه با لیپید و کربوهیدرات نشان داد. تحلیل کروماتوگرافی مایع با کارایی بالای ترکیبات فنولیک در عصاره ترکیبی خیار دریایی، وجود نه ترکیب را نشان داد اسید کلوروژنیک، ترکیب اصلی بود، در حالی که اسید اسکوربیک یک تریکب فرعی بود(جدول 1). منابع اصلی غذا برای خیار های دریایی که شامل مواد غنی از فنولیک نظیر فیتوپلانکتون و ذرات مشتق شده از ماکرو الگ ها(جلبک های دریایی) می باشند، حضور ترکیبات فنولیک فعال را در دیواره بدنی خیار های دریایی توجیه کرد(1). پلی فنول ها، آنتی اکسیدان هایی می باشند که به صورت از بین برنده های رادیکال آزاد می باشند. آن ها با رادیکال های لیپید پر انرژی واکنش داده و آن ها را به محصولات پایدار تر تبدیل می کنند. به علاوه، آن ها دهنده عالی هیدروژن و الکترون می باشند. اسید کلروژنیک یکی از فراوان ترین پلی فنول ها در غذای انسان بوده و موجب کاهش وقوع سرطان های شیمیایی می شوند(40). پیروکالول ، که یک ترکیب کاتچین است که تولید انیون سوپر اکسید می شود، موجب القای اپوپتوزیس(مرگ پیش بینی شده سلول) در سلول های سرطانی انسان می شود(41). روتین، که یک فلاونویید است، مزایای فارماکولوژیک را نشان داده است که در نهایت فعالیت های حفاظت کبدی، تنظیم کننده ایمنی و ضد التهابی و ضد توموری (42) را در پی دارد. اسید پی کوماریک یک اسید فنولیک غذایی می باشد که در گیاهان توزیع شده است. اثر حفاظت کبدی بالقوه آن قبلا در موش های مسموم به تتراکلرید کربن [43]، اتانول [44]، و لیپوپلی ساکارید [45] مشاهده شده است. کاتچین یک ترکیب مشتق شده از پلی فنولیک فلاونویید است که دارای طیف وسیعی از خواص فارماکولوژیک از جمله اثر آنتی اکسیداتیو می باشند(46).

در این مطالعه، اثر حفاظت کبدی عصاره خیار دریایی در برابر مسمومیت کبدی ناشی از TAA در موش های صحرایی بررسی شد. تثبیت گروه شاهد مثبت، متقاعد کننده نبود زیرا منابع و مطالعات شواهد زیادی را در خصوص ترکیبات طبیعی نظیر سیلیمارین را با فعالیت های انتی اکسیدانی و حفاظت کبدی نشان داده اند. TAA یک

sina-pub.ir

هپاتو تکسین می باشد که برای تولید مدل ازمایشی برای مطالعه مکانیسم های دخیل در پیشرفت بیماری هپاتیک و اثر دارو های مختلف بر روی این پیشرفت استفاده شده است. آسیب هپاتیک ناشی از TAA، زخم های مشابه با زخم ها در بیشتر موارد بیماری کبد انسان نشان می دهند.

جدول 5: اثرات عصار خیار دریایی یا تیو استامید بر روی پروتین کل خون و اجزای آن و نسبت البومین/ گلبولین در موش های صحرایی

Groups	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	Globulins (g/dL)				Albumin/globulin ratio
			α_1	α_2	β	γ	
NC							
Mean ± SD	7.86 ± 0.38[a]	3.96 ± 0.68[a]	0.48 ± 0.03[a]	0.60 ± 0.14[a]	1.58 ± 0.16[a]	1.24 ± 0.34[a]	1.03 ± 0.27[a]
Ex							
Mean ± SD	7.95 ± 0.34[a]	4.00 ± 0.33[a]	0.48 ± 0.13[a]	0.54 ± 0.13[a]	1.64 ± 0.21[a]	1.20 ± 0.43[a]	1.05 ± 0.20[a]
Change (%)	1.15	1.01	0	−10.00	3.80	−3.23	1.94
TAA							
Mean ± SD	5.42 ± 0.37[b]	2.86 ± 0.61[b]	0.28 ± 0.04[b]	0.36 ± 0.05[b]	1.10 ± 0.14[b]	0.82 ± 0.13[b]	1.11 ± 0.23[a]
Change (%)	−31.04	−27.78	−41.67	−40.00	−30.38	−33.87	7.77
Ex + TAA							
Mean ± SD	7.10 ± 0.67[a]	3.36 ± 0.41[ab]	0.46 ± 0.11[a]	0.58 ± 0.16[a]	1.50 ± 0.23[a]	1.20 ± 0.19[a]	0.90 ± 0.19[a]
Change (%)	−9.67	−15.15	−4.17	−3.33	−5.06	−3.23	−12.62
F ratio	31.22	5.24	6.51	3.53	8.18	6.30	0.68

گروه ها، پروتین کل، البومین، گلبولین، نسبت البومین/ گلبولین

Ex، عصاره خیار دریایی؛ NC، شاهد نرمال؛ TAA، تیواستامید

داده ها به صورت میانگین+ انحراف معیار(5 موش در هر گروه) یان شده اند. مقادیر دارای علامت مشترک، تفاوت معنی دار ندارند.

جدول 6: اثرات عصاره خیار دریایی و تیو استامید بر روی MDA هپاتیک و غلظت های GSH و فعالیت های انزیمی انتی اکسیدان در موش های صحرایی

Groups	MDA (nmol/g)	GSH (nmol/mg protein)	SOD (U/mg protein)	GPx (mU/mg protein)	CAT (U/mg protein)
NC					
Mean ± SD	31.23 ± 5.20[a]	10.30 ± 1.09[a]	3.76 ± 0.99[a]	432.91 ± 13.17[a]	742.83 ± 88.9[a]
Ex					
Mean ± SD	32.30 ± 2.89[a]	9.99 ± 1.25[a]	6.25 ± 0.42[b]	550.94 ± 53.73[b]	799.91 ± 127.7[a]
Change (%)	3.43	−3.01	66.22	27.26	7.68
TAA					
Mean ± SD	118.24 ± 9.42[b]	37.39 ± 7.39[b]	0.12 ± 0.03[c]	134.0 ± 41.36[c]	549.17 ± 71.70[b]
Change (%)	278.61	263.01	−96.81	−69.05	−26.07
Ex + TAA					
Mean ± SD	36.85 ± 6.40[a]	11.31 ± 1.22[a]	3.72 ± 1.10[a]	389.03 ± 47.54[a]	731.07 ± 135.40[a]
Change (%)	17.99	9.81	−1.06	−10.14	−1.58
F ratio	348.73	98.28	88.72	87.98	7.91

گروه ها، MDA(نانومول بر گرم)، GSH(نانومول بر میلی گرم پروتین)، SOD(U میلی گرم بر پروتین)،

GPx(mu بر میلی گرم بر پروتین)، CAT(U/ میلی گرم بر پروتین)

sina-pub.ir

CAT، کاتالاز؛ سابق، عصاره خیار دریایی؛ GPX، گلوتاتیون پراکسیداز؛ GSH، گلوتاتیون؛ MDA، مالون دی آلدئید؛ NC، شاهد نرمال؛ SOD، دیسموتاز سوپراکسید؛ TAA، تیواستامید

این موجب ایجاد آسیب سیتوتوکسیک از طریق فعال سازی زیستی دو مرحله ای به واسطه ایزوزیم P450 سیتوکروم E1 و سیستم های مونو اکسیژناز حاوی فلاوین به سولفید TAA و به متابولیت واکنشی، TAA-S، S-دی اکسید شده و در نهایت منجر به پروکسیداسیون لیپید در سطح غشای پلاسما می شود(47). کاهش استرس اکسیداتیو به واسطه پروکسیداسیون لیپید می تواند یک راهبرد موثر و بالقوه برای پیش گیری و درمان نارسایی کبدی باشد(48).

تجویز تحت مزمن عصاره خیار دریایی در دوز مربوطه به موش های صحرایی نرمال، هیچ گونه اثرات جانبی سمی را بر روی میزبان نشان نداد و این مسئله با توجه به تغییرات غیر معنی دار در اوزان نسبی اندام های کبد، قلب، کلیه و طحال، رشد مطلوب و نرخ بقای 100 درصد حیوانات مشهود است(جدول 2، 3، شکل 1). بر عکس، مسمومیت TAA یک کاهش معنی دار را در درصد افزایش وزن بدن ، کاهش نرخ بقا(45 درصد) و افزایش معنی دار در اوزان نسبی اندام های بدن نشان داده است. همه این نتایج به طور معنی داری در گروه حفاظتی اصلاح شدند که با کاهش غیر معنی دار در درصد افزایش وزن بدن در مقایسه با وزن اولیه بدن، نرخ بقای بالاتر و نرمال سازی وزن نسبی اندام های بدن به جز کبد همراه بود(جداول 2-3، شکل 1). بدیهی است که اثرات جانبی سمی TAA با ترکیبات فنولیک فعال در عصاره خیار دریایی تعدیل شد. اسید های کوماریک و کلروژنیک موجب سرکوبی و مهار تشکیل رادیکال اکسیژن شده و مانع از تشکیل واسطه های التهابی نظیر پروستوگلاندین ها و لوکاترین ها می شود که دلیلی بر افزایش معنی دار اوزان نسبی اندام های کبد، قلب ، کلیه و طحال است.

شواهد مستقیم مسمومیت کبدی TAA حاکی از افزایش میزان بیلی روبین کانژوگه خون، فعالیت های ALT-AST-ALP، نسبت AST/ALT و غلظت تری اسیل گلیسرول های کبد(جداول 4-7) می باشد. افزایش بنیادین در سطوح سرومی بیلی روبین و فعالیت های ALP-AST، شواهدی را در خصوص انسداد صفراوی داخل کبدی ارایه کرد که با معاینه بافت شناسی بخش های کبد تایید شد که حاکی از حضور نفوذ سلول های التهابی(G3)، دژنرسانس بالونی (G3)، نکروز (G3)، و فیبروز(F3 جداول 8-9) بود. تجویز هم زمان عصاره خیار دریایی و TAA موجب تضعیف اثر مسمومیت کبدی TAA شد که با نرمال سازی فعالیت های ALT-AST و بیلی روبین و نسبت

sina-pub.ir

AST/ALT و کاهش در فعالیت ALP خون و مقدار تری اسیل گلیسرول های هپاتیک همراه بود. به علاوه، معاینه بخش های کبدی رنگ امیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین(شش اسلاید) ، تغییرات خفیفی را در هپاتوسیت ها به خصوص التهاب (G0-G2)، دژنرسانس بالونی (G0-G2)، فیبروز (F0-F2) و بازیابی نکروزیس(G0، جداول 8-9، شکل 2g-H) نشان داد. اثرات تجویز خوراکی و تزریقی اسید کلروژنیک بر روی کاهش تری گلیسرول درپلاسما، عضله های اسکلتی و کبد حیوانات، قبلا گزارش شده است(49-50).

غلظت پروتین های خون را می توان به عنوان شاخص اندازه گیری عملکرد کبد، به خصوص در مقایسه با پروتین هایی که در کبد تولید می شوند نظیر ایمنو گلوبین ها، استفاده کرد. مسمومیت TAA به طور معنی داری موجب کاهش پروتین کل خون، البومین و غلظت های الفا 1، الفا 2 و گاما گلوبین(جدول5) شد. نتایج مشابه نیز گزارش شده است(51-52). یکی از نتایج ارزشمند در این مطالعه، نرمال سازی پروتین کل خون و اجزای آن در موش های صحرایی تیمار شده با عصاره خیار ترکیبی و مسمومیت TAA بود. ما پیشنهاد می کنیم که نرمال سازی گاما گلوبین خون با عصاره خیار دریایی می تواند ناشی از محتوی اسید های کوماریک و کلروژنیک باشد که نیازمند تحقیق بیشتری است. این اسید های فنولیک منجر به القای انزیم های سم زدایی فاز 2 می شود که مانع از تحریک سرکوب ایمنی توسط متابولیت های فعال TAA می شود(40-53).

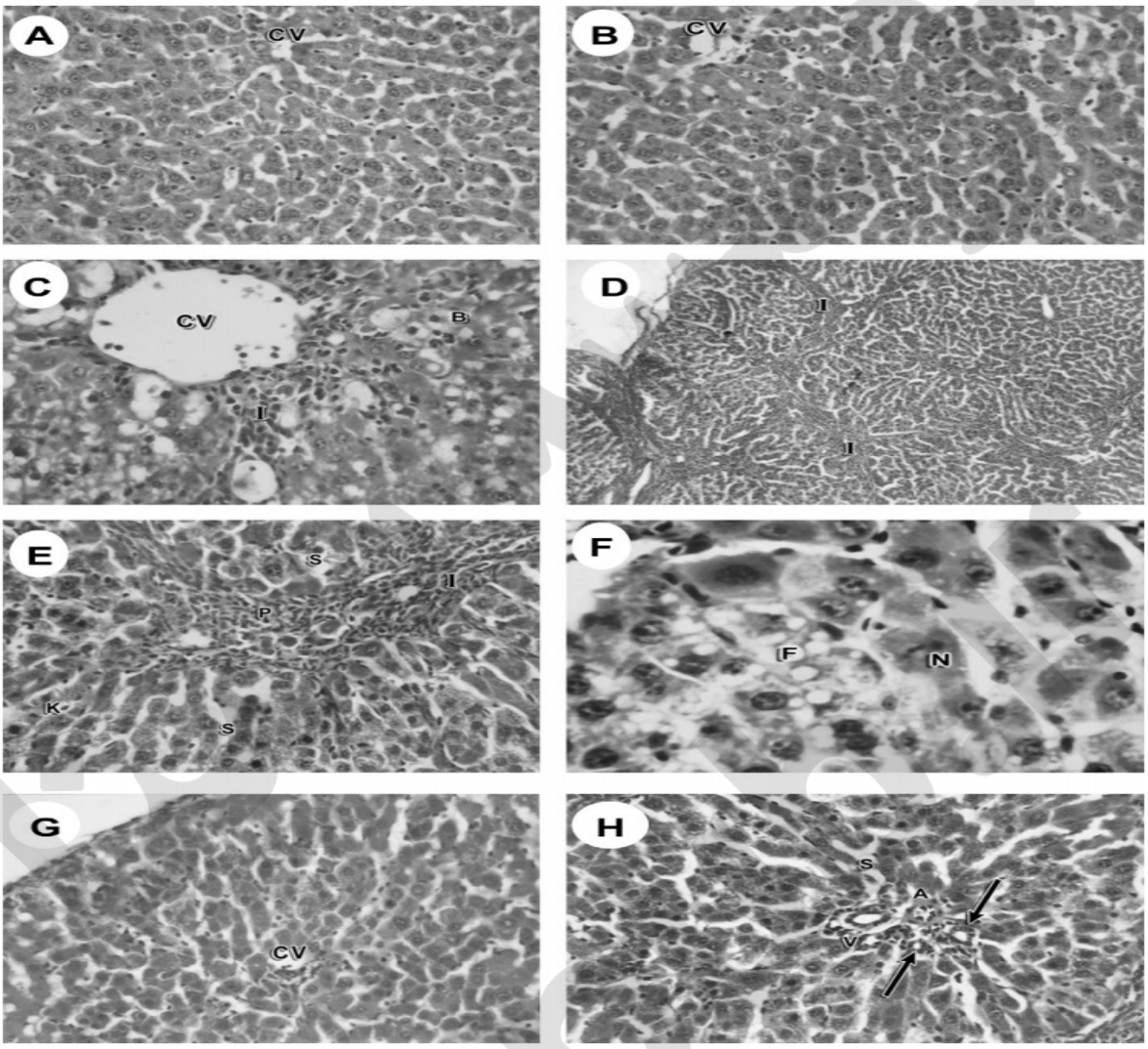
جدول 7: اثرات عصاره خیار دریایی یا تیواستامید بر روی TG پ=هپاتیک، هیدروکسی پرولین، پروتین کل، غلظت RNA و DNA، و نسبت های پروتین/DNA و RNA/DNA در موش ها

Groups	TG (mg/g)	Hydroxyproline (μg/mg protein)	Total protein (mg/g)	RNA (mg/g)	DNA (mg/g)	Protein/DNA	RNA/DNA
NC							
Mean ± SD	31.96 ± 1.51^{a}	0.99 ± 0. 06^{a}	175.14 ± 7.52^{a}	6.22 ± 0.74^{a}	2.51 ± 0.25^{a}	71.74 ± 9.52^{a}	2.48 ± 0.12^{a}
Ex							
Mean ± SD	32.22 ± 3.10^{a}	1.00 ± 0.11^{a}	170.27 ± 12.20^{a}	6.00 ± 0.30^{a}	2.38 ± 0.28^{a}	72.5 ± 11.21^{a}	2.55 ± 0.32^{a}
Change (%)	0.81	1.01	−2.78	−3.54	−5.18	1.06	2.82
TAA							
Mean ± SD	98.68 ± 5.90^{b}	19.71 ± 3.52^{b}	104.48 ± 12.42^{b}	2.55 ± 0.5^{b}	1.13 ± 0.13^{b}	94.14 ± 18.17^{b}	2.29 ± 0.53^{a}
Change (%)	208.76	1890.91	−40.34	−59.00	−54.98	31.22	−7.66
Ex + TAA							
Mean ± SD	43.73 ± 6.53^{c}	1.19 ± 0.07^{a}	166.54 ± 10.25^{a}	5.57 ± 0.82^{a}	2.11 ± 0.40^{a}	81.26 ± 15.73^{ab}	2.66 ± 0.39^{a}
Change (%)	36.83	20.20	−4.91	−10.45	−15.94	13.27	7.26
F ratio	364.48	224.73	76.20	59.95	40.06	4.38	1.39

sina-pub.ir

گروه ها، هیدروکسی پرولین، پروتین کل، ار ان ای، دی ان ای، پروتین

EX، عصاره خیار دریایی؛ NC، شاهد نرمال؛ TAA، تیواستامید؛ TG، تری گلیسرول



شکل 2: تصاویر میکروگراف بخش های کبدی رنگ امیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین از A: موش های نرمال ذ: موش های تیمار شده به عصاره خیار دریایی، رشته های هپاتوسیت ها را نشان می دهد که از رگ مرکزی منشعب شده و با سینوزید های خونی از هم جدا می شوند(بزرگ نمایی ضربدر 400). بخش های کبدی موش های صحرایی مسموم شده با تیواستامید (C) یک رگ مرکزی گشاد ، بالونینگ هپاتوسیت ها، نفوذ سلول های التهابی نشان می دهد. D: رشته های بافتی اتصال دهنده تحت تهاجم سلول های التهابی (با بزرگ نمایی 125) ، E: سینوزید های خون گشاد، سطح گوارشی، سلول های کاپفر، رشته های بافتی متصل کننده تحت سلول های التهابی، f: تغییر چربی و سلول های نکروتیک. بخش های کبدی گروه حفاظتی G رشته های نرمال هپاتوسیک

sina-pub.ir

را نشان می دهد که از رگ مرکزی منشعب شده است و H: رگ پرتال، سرخرگ پرتال، انشعاباتی از مجاری پرتال کم و بیش مشابه با شاهد نرمال و سینوزید های خونی گشاد را نشان می دهد.A ، عروق پورتال؛ B، بالونینگ سلولهای کبدی؛ CV، ورید مرکزی؛ F، تغییر چربی I، سلول های التهابی. K سلول های ، کوپفر؛ N، سلول های مرده؛ P، منطقه دستگاه پورتال؛ S، سینوسها ؛V ، وریدپرتال.

اندازه گیری فعالیت آنزیم های انتی اکسیدان، یک شیوه غیر مستقیم نامناسب رای ارزیابی وضعیت دفاع انتی اکسیدانی می باشد و علاوه بر براورد MDA، محصول فرعی پروکسیداسیون اسید های چرب اشباع بیولوژیک به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو استفاده می شود(54). تجویز تحت مزمن عصاره خیار دریایی به موش ها موجب افزایش فعالیت های هپاتیک SOD و GPx شد. بر طبق یافته ها، پینگ زانگ و همکاران(55) اثبات کردند که درمان موش با کاتچین موجب افزایش فعالیت SOD در روده بزرگ می شود.. یه و ین(53) گزارش کرده اند که تجویز اسید کوماریک به موش های نر نژاد اسپراگ داولی منجر به افزایش معنی دار در فعالیت های هپاتیک SOD، GPx و CAT در مقایسه با شاهد نرمال می شوند. در تایید یافته های بیو شیمیایی، مطالعات انتی اکسیدانی برون تنی بر روی عصاره ترکیبی خیار دریایی بر طبق مطالعات قبلی طراحی شد(34-36، 38-56) و یک پتانسیل تنظیف کنندگی را برای NO و پتانسیل تنظیف کنندگی برای DPPH در مقایسه با استاندارد های مرجع نشان داد(جدول 10). پتانسیل بازدارندگی ضعیف برای تنظیف DPPH را می توان به مقدار پیروگالول آن نسبت داد که به عنوان یک تولید کننده آنیون سوپر اکسید عمل می کند. به علاوهف یک پتانسیل کی لیت کنندگی آهن و بازدارندگی وابسته به دوز پروکسیداسیون لیپید عصاره خیار دریایی ثبت شده است. آهن نیز به دلیل واکنش پذیری بالا در میان فلزات واسطه، به عنوان یک عامل اکسیدان شناخته شده است.کی لیت کننده های موثر آهن یک عامل حفاظتی در برابر آسیب اکسیداتیو به دلیل حذف آهن می باشند که در غیر این صورت در تولید OH و پروکسیداسیون لیپید شرکت می کنند(57).

جدول 8: درجات نفوذ سلول های التهابی، بالونینگ هپاتوسیت ها و نکروزیس کبد در گروه های مختلف مطالعه شده

sina-pub.ir

Groups	Inflammatory cells infiltration				Ballooning degeneration				Necrosis			
	G0	G1	G2	G3	G0	G1	G2	G3	G0	G1	G2	G3
NC	6/6[a]	0/6	0/6	0/6	6/6[a]	0/6	0/6	0/6	6/6[a]	0/6	0/6	0/6
Ex	6/6[a]	0/6	0/6	0/6	6/6[a]	0/6	0/6	0/6	6/6[a]	0/6	0/6	0/6
TAA	0/6[b]	0/6	0/6	6/6	0/6[b]	0/6	0/6	6/6	0/6[b]	0/6	0/6	6/6
Ex + TAA	2/6[c]	2/6	2/6	0/6	2/6[c]	2/6	2/6	0/6	6/6[a]	0/6	0/6	0/6

گروه ها، نفوذ سلول های التهابی، دژنرنسانس بالونی، نکروزیس

EX، عصاره خیار دریایی؛ G0، منفی؛ G1، 33٪؟ G2، 33٪ به 66٪؛ G3، 66 <٪، NC، شاهد نرمال؛ TAA، تیواستامید

*تفوذ لنفوسیت، دژنرنسانس بالونی و نکروزیس هپاتوسیت ها در شش اسلاید در هر گروه بررسی شده و با مقیاس 4 نقطه ای درجه بندی شد. مقادیر با حروف مشترک تفاوت معنی دار ندارند.

مسمومیت TAA موجب تحریک استرس اکسیداتیو شدید شد که با افزایش سطحGSH و MDA هپاتیک و کاهش فعالیت های انزیمی انتی اکسیدانی کبد در مقایسه با شاهد های نرمال همراه بود(جدول 6). یافته های مشاهده در مطالعات قبلی گزارش شده بود(58-59). با این حال، منابع در بر گیرنده نتایج بحث انگیزی در خصوص اثر مسمومیت TAA بر روی سطح GSH است. لو و همکاران(60) گزارش کرده اند که تزریق TAA به موش ها(50 میلی گرم بر کیلوگرم در روز به صورت درون صفاقی به مدت سه هفته)، موجب افزایش بیان زیر واحد سینتاز گاما- گلوتامیل سیستئین و فعالیت GCS می شود، در حالی که سطح GSH علی رغم استرس اکسیداتیو معنی دار ثابت باقی می ماند که افزایش سطح MDA گواه بر این موضوع است. محققان، القای فعالیت GCS را به حفاظت از کاهش سطح GSH با مسمومیت TAA نسبت داده اند. هم چنین الیور و همکاران (61) تایید کرده اند موش هایی که یک بار تزریق TAA را دریافت کردند(125 میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، یک کاهش معنی دار را در سطح GSH کبد پس از 12 ساعت نشان دادند که به سطح شاهد در 24 ساعت رسید. محققان، نرمال سازی را به افزایش بیان و فعالیت GCS و GSH نسبت دادند که دو انزیم کلیدی در سنتز GSH می باشند. اثر استرس اکسیداتیو ناشی از TAA در گروه حفاظتی خنثی شد که شاهد آن، نرمال سازی سطح GSH کبدی و فعالیت آنزیم انتی اکسیدانی می باشد.

sina-pub.ir

فیبروز کبد شامل سنتز غیر طبیعی و انباشت پروتین های ماتریس برون سلولی به خصوص کلاژن در پارانشیم کبد با سلول های کبدی فعال(62) است. هیدروکسی پرولین، یک امینو اسید منحصر به فرد برای همه کلاژن ها بوده و سطح آن منعکس کننده مقدار کلاژن بوده و از این روی برای تعیین مقدار فیبروز استفاده می شود(63). مسمومیت TAA منجر به افزایش معنی داری در مقدار هیدروکسی پرولین کبدی در مقایسه با شاهد نرمال شد که حضور فیبروز و رشته های بافتی مختلف مورد تهاجم سلول های التهابی از نشانه های بارز آن می باشد(64-65). تجویز هم زمان عصاره خیار دریایی و مسمومیت TAA موجب نرمال سازی محتوی هیدروکسی پرولین کبدی و کاهش الگوی فیبروز کبدی شد(F0-F2، جداول 7-9، شکل 2G-H). فعالیت حفاظت کبدی عصاره خیار دریایی ناشی از محتوی پیروگالول است که منجر به تحریک سیستم دفاعی انتی اکسیدانی درون زای بدن(SOD و GPx) و سایر ترکیبات پلی فنول می شود که دارای فعالیت تنظیف کنندگی بالا برای رادیکال های آزاد و گونه های اکسیژنی فعال تولید شده با مسمومیت TAA بوده و مانع از فعال سازی سلول های کبدی از یک سو شده و در عین حال مانع از پروکسیداسیون لیپید می شود که در غیر این صورت سلول های کبدی را فعال سازی می کند. هم چنین، اثر پلی فنول ها بر روی مهار سیستم های تولید رادیکال ازاد(احیای فسفات دی نوکلوتید ادنین و سیتوکروم P450) در پروکسیداسیون لیپید به صورت برون تنی موجب کاهش غلظت MDA می شود. به علاوه، ما این موضوع را تایید نمی کنیم که نتایج بدست آمده ناشی از تضعیف اثر هپاتو توکسیسک TAA ناشی از واکنش مستقیم آن با ترکیبات فنولیک عصاره است زیرا هر یک به موش ها از طریق روش های مختلف و در زمان ها و فراوانی های مختلف داده شدند. با این حال، این فرض مستلزم تحقیق بیشتر است.

جدول 9: مرحله فیبروز در گروه های مختلف مطالعه شده

Groups	F0	F1	F2	F3	F4
NC	$6/6^a$	0/6	0/6	0/6	0/6
Ex	$6/6^a$	0/6	0/6	0/6	0/6
TAA	$0/6^b$	0/6	0/6	6/6	0/6
Ex + TAA	$2/6^c$	2/6	2/6	0/6	0/6

جدول 10: اثر عصاره ترکیبی خیار دریایی بر روی تنظیف NO و DPPH، کی لیت آهن و مهار پروکسیداسیون لیپید

sina-pub.ir

Dose	$NO^{\cdot}$ scavenging activity (%)	$DPPH^{\cdot}$ radical scavenging activity (%)	Fe^{2+} chelating activity (%)	Inhibition of lipid peroxidation (%)
Sea cucumber				
150 µg/mL	85.5	16.8	42.7	28.02
300 µg/mL	86.8	16.8	48.8	33.76
600 µg/mL	93.42	17.01	57	36.4
Standards				
Vitamin C (200 µg/mL)	44.7	—	—	—
EDTA (100 µg/mL)	—	—	100	—
BHA (600 µg/mL)	—	84.7	—	—
TBHQ (600 µg/mL)	—	85.3	—	—

دوز، فعالیت تنظیف کنندگی NO فعالیت تنظیف رادیکال DPPH، فعالیت کی لیت کننده آهن، مهار پروکسیداسیون لیپید، خیار دریایی، ویتامین های استاندارد،

بدن انسان دارای مولکول های بسیار(لیپید ها، DNA، پروتین، ویتامین و کربوهیدرات ها) می باشد که به حملات گونه های اکسیژنی واکنشی حساس بوده و موجب بروز بسیاری از بیماری ها می شود. آنتی اکسیدان ها مانع از پروکسیداسیون لیپید می شوند ولی ممکن است از سایر مولکول ها نظیر DNA و پروتین در برابر آسیب اکسیداتیو حفاظت نکند. در این مطالعه، استرس اکسیداتیو ناشی از TAA منجر به کاهش معنی داری در DNA، RNA کبد و غلظت های پروتین کل می شود بدون این که تغییرات معنی داری در نسبت RNA-DNA وجود داشته باشد و این نشان می دهد که سنتز RNA در هر سلول تحت تاثیر قرار نگرفت. افزایش نسبت پروتین-DNA نشان می دهد که گونه های اکسیژن واکنشی تولید شده با مسمومیت TAA منجر به آسیب اکسیداتیو دی ان ای بافت گردید که در نهایت تحریک هپاتوسیت ها را برای افزایش سنتز پروتین به دنبال داشت(جدول 7). با این حال، کاهش معنی دار در غلظت پروتین کل کبدی ناشی از هیپرتروفی کبد می باشد و تعداد کمی از هپاتوسیت ها به دلیل فیبروز و کبد چرب عمل می کنند. گزارش شده است که افزایش نفوذ پذیری ناشی از پروکسیداسیون لیپید غشای رتیکولوم اندوپلاسمی منجر به افزایش در مقدار آب کبد و تشکیل واسطه های التهابی نظیر پروستوگلاندین

sina-pub.ir

و لوکاترین(66-67) می شود. در گروه حفاظتی، پروتین کل هپاتیک، مقدار دی ان ای و ار ان ای و نسبت پروتین/RNA نرمال شد. این حفاظت ناشی از ترکیبات فنولیک فعال در عصاره خیار دریایی می باشد که از اسید های نوکلیک از آسیب حفاظت کرده و موجب بهبود مکانیسم ترمیم می شود. هوانگ و همکاران گزارش کرده اند که درمان سلول های میکروگلیای موش با کاتچین 0.5 میلی مول بر لیتر پس از 1 ساعت مواجهه با ترت بوتیل هیدروکسی پروکسید 0.3 میلی مول بر لیتر موجب افزایش معنی دار در بیان پلیمراز ریبوز ADP برای حفاظت از سلول های میکروگلیا از آسیب دی ان ای شد. هم چنین، گاگلیمی و همکاران(69) بیان کرده است که اسید کوماریک به طور موثر منجر به کاهش آسیب اکسیداتیو دی ان ای در مخاط کولون موش صحرایی شد.

نتیجه گیری

عصاره ترکیبی خیار دریایی، فعالیت حفاظت کبدی معنی داری را در برابر فیبروز کبدی ناشی از TAA در موش های صحرایی بر اساس تست های عملکرد کبدی و بهبود معنی دار در ساختار هپاتوسلولی نشان داد. حفاظت کبدی عمدتا ناشی از محتوی آن ، یعنی ترکیبات فعال فنولیک با فعالیت های آنتی اکسیدانی و کی لیت کنندگی که موجب افزایش و بهبود سیستم دفاعی آنتی اکسیدان درونزا می گردد.