

اثر حفاظتی عصاره هیدروالکلی به دست آمده از زیره سیاه در آسیب بافت قلب و کلیه در مدل التهابی CLP

ابوالفضل دادخواه^۱، فائزه فاطمی^۲، ناهید داوودیان^۳

^۱استادیار بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.

^۲استادیار بیوشیمی، پژوهشکده علوم هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران.

^۳کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سپسیس نوعی پاسخ سیستمیک بدن به عفونت است که در نهایت منجر به از کار افتادن و مرگ اندام‌ها می‌شود. با توجه به عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای سنتتیک، امروزه استفاده از گیاهان دارویی در درمان سپسیس مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه با هدف تعیین اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی زیره سیاه بر روی آسیب بافت قلب و کلیه در مدل تجربی التهابی (CLP (Cecal Ligation and Puncture در رت صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه، رت‌ها به ۵ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (SOP)، گروه CLP، گروه‌های تیمار CLP+ عصاره هیدروالکلی زیره سیاه (۵۰ mg/kg b.w) و گروه CLP+ ایندومتاسین (کنترل مثبت).

ابتدا ایندومتاسین و عصاره به صورت داخل صفاقی (i.p) بلافاصله پس از القای سپسیس به حیوانات تزریق شد و ۲۴ ساعت پس از القای سپسیس، بافت قلب، کلیه و پلاسما آنها جدا و آنالیز گردید. تفاوت‌های بین نتایج با استفاده از آزمون واریانس و تعقیبی توکی تعیین شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، سطح پراکسیداسیون لیپیدها در بافت کلیه و نسبت اوره به کراتینین پلاسما در گروه CLP، به طور معنی‌داری افزایش نشان داد. در صورتی که سطح گلوکوتایون در این بافت تغییری نیافت که این امر نشان‌دهنده آسیب نسبی بافت کلیه در رت‌های سپتیکی است. برخلاف ایندومتاسین، تیمار رت‌ها با هر دو دوز عصاره هیدروالکلی زیره سیاه، هیچ گونه تغییری در بهبود پارامترهای فوق ایجاد نکرد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد تیمار رت‌های سپتیکی با عصاره هیدروالکلی زیره سیاه بلافاصله بعد از انجام CLP به صورت داخل صفاقی، تأثیری بر روی بهبود پارامترهای دخیل در آسیب بافتی کلیه ندارد و این عصاره در حفاظت از بافت کلیه در برابر آسیب اکسیداتیو ایجادشده توسط سپسیس ناتوان است.

کلید واژه‌ها: عصاره هیدروالکلی؛ زیره سیاه؛ آسیب‌های قلب؛ کلیه؛ سی‌ال‌پی؛ استرس اکسیداتیو.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: dadkhash_bio@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۱۱

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۱۳

مقدمه

بیماران مراقبت‌های ویژه می‌باشد (۲). یکی از عوارض و مشکلات ناشی از سپسیس به هم خوردن تعادل سیستم استرس اکسیداتیو بدن است (۳). در شرایط فیزیولوژیک بین تشکیل گونه‌های اکسیدکننده و حذف آنها توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان تعادل وجود دارد. استرس اکسیداتیو زمانی ایجاد

سپسیس عارضه‌ای است که مشکلات بالینی و اقتصادی فراوانی را در پی دارد و تحقیقات وسیعی در زمینه‌های مختلف آن صورت گرفته است (۱). با وجود پیشرفت‌های درمانی در زمینه سپسیس، این بیماری و عواقب ناشی از آن مهم‌ترین عامل مرگ و میر در

می شود که این تعادل در اثر تولید زیاد رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS (Reactive Oxygen Species و یا تضعیف سیستم دفاع آنتی اکسیدانی مختل شود (۴)، رخداد این دو فرآیند در سپسیس (۱)، منجر به آسیب اکسیداتیو بسیاری از بافت های بدن از جمله قلب، کلیه و در نهایت از کارافتادن بافت ها می گردد (۵). امروزه داروهای مختلفی از جمله آنتی بیوتیک ها، NSAID ها (Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) و غیره برای کاهش و یا درمان عوارض ناشی از سپسیس استفاده می شود. با توجه به نقش مهم و اصلی استرس اکسیداتیو در عوارض ناشی از سپسیس، استفاده از آنتی اکسید آنها و عوامل طبیعی در کاهش این عوارض، مورد توجه می باشد (۱). عصاره آبی گیاهان دارویی خواص بیولوژیکی و درمانی متفاوتی دارند. در مطالعه ای نشان داده شد Tempol (یک گیرنده رادیکال های آزاد)، فاکتورهای استرس اکسیداتیو از جمله NO (Nitric Oxide)، O₂ و IL-1β را در پلاسمای رت های مدل CLP کاهش می دهد. همچنین شاخص های آسیب کبدی ALT (Alanine Transaminase)، AST (Aspartate Transaminase) و شاخص های آسیب کلیه (کراتینین و اوره) نیز در پلازما کاهش می یابد. در این مطالعه مشخص گردید با کاهش استرس اکسیداتیو توسط Tempol، طول عمر رت ها نیز زیاد می شود (۶). ترکیب دیگری به نام Bicucullin نیز دارای اثرات ضد التهابی است و تیمار رت های مدل CLP با آن باعث کاهش α-TNF، IL-1β، پراکسیداسیون لیپیدها و نیتريت، همچنین کاهش آسیب کبدی و مرگ و میر حیوانات می شود (۷، ۸). تزریق آسکوربیک اسید (۱۰۰ mg/kg b.w) (i.v) به رت های مدل CLP باعث کاهش ALT و AST، پراکسیداسیون لیپیدها، گلوتاتیون و کاهش بیان ژن های iNOS، اکسیژناز، α-TNF و COX-2 می گردد (۹).

زیره سیاه در قدیم به عنوان یک گیاه دارویی مورد استفاده بوده است. این گیاه در اروپای مرکزی و شمالی، سبزی، ترکیه، هند، آفریقای شمالی و ایران کشت داده می شود. زیره سیاه برای اولین بار توسط اعراب و فیلینی های قدیمی، به خاطر برطرف کردن علائم هیستریکی و رنگ پریدگی چهره، معرفی گردید. در افسانه های گذشتگان آمده که جولیس سزار و سربازان والریوس، مخلوط ریشه های زیره سیاه با شیر "Chara" را به صورت نان مصرف می کرده اند. در زمان شکسپیر نیز خوردن سیب همراه با زیره سیاه به صورت دسر معمول بوده است (۱۰). امروزه از دانه های زیره سیاه

به عنوان طعم دهنده نان، پنیر، شیرینی ها، محصولات گوشتی، سس ها و نوشابه ها استفاده می کنند. همچنین کاروون موجود در اسانس این گیاه معطر در وسایل آرایشی - بهداشتی، خمیر دندان، آدامس و داروسازی کاربرد دارد. این دانه ها در طب سنتی به عنوان ملین در درمان بیماری های روده ای (کولیک) و تازه کننده نفس و کمک کننده هضم غذا به خصوص در بچه ها، استفاده می شود. همچنین دانه های این گیاه دارای اثرات ضد اسپاسمی، ضد نفخی، ضد باکتریایی، ضد سرطانی، ازدیاد قاعدگی، خلط آور (اسپکتورانت)، شیر آور، اشتها آور و نیروبخش می باشند (۱۰). نتایج تخلیص و بررسی ترکیبات زیره سیاه نشان می دهد فاز آبی این محصول دارای ترکیبات منوترپنئید و انواع ترکیبات آروماتیک، فلاونوئیدها، گلوکوزیدها و نوکلئوزیدها است (۱۱). اجزای فلاونوئیدی زیره سیاه با کروماتوگرافی ستون سلولزی مشخص می شود که شامل: Quercetin 3-glucuronide, Isoquercitrin, Kaempferol 3-glucoside و Quercetin 3-O-Caffeoylglucoside می باشد (۱۲). همچنین مشخص شده است که فاز آبی زیره سیاه فعالیت آنتی اکسیدانی دارد که به دلیل حلالیت ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدی در فاز آبی می باشد (۱۳). مطالعات نشان داده اند عصاره آبی گیاهان دارویی و فلاونوئیدها دارای خواص فارماکولوژیکی گوناگونی هستند. به عنوان مثال Quercetin موجود در زیره سیاه در کاهش سیروز کبدی القاشده توسط CCl₄ در رت ها مؤثر است و عمل خود را با افزایش آنزیم های آنتی اکسیدان و کاهش اثر پرواکسیدان ها انجام می دهد (۱۴). همچنین Quercetin، سلول های هپاتومای H4IIE را در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از قرار گرفتن در معرض پراکسید هیدروژن محافظت می کند (۱۵). با توجه به انواع ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره آبی زیره سیاه می توان پیش بینی نمود که این عصاره دارای خواص بیولوژیکی گوناگونی است. در یک مطالعه دیگر نیز مشاهده گردید خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره آبی زیره سیاه از آسکوربیک اسید بیشتر است (۱۶). تیمار رت های دیابتی القاشده با Streptozotocin به صورت خوراکی با عصاره آبی دانه زیره سیاه (۲۰ mg/kg b.w)، باعث کاهش کلسترول و تری گلیسیرید پلازما می شود (۱۷). مقاله ای در سال ۲۰۰۶ گزارش نمود که عصاره آبی دانه زیره سیاه باعث مهار اثر موتازنیکی N-متیل - N' - نیترو - N-نیتروزوگوانیدین در سالمونلا می شود (۱۸). تیمار رده سلولی کبدی Chang با

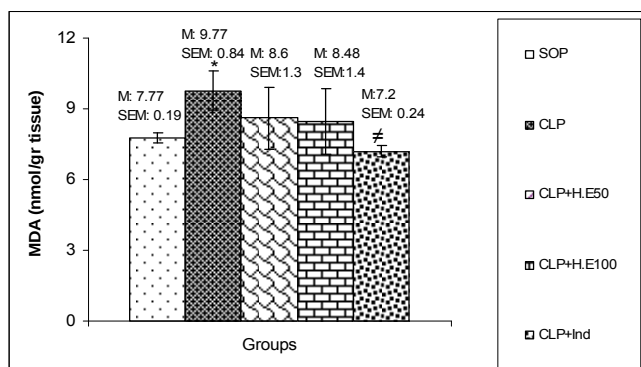
Quercetin و Kaempferol ($200 \mu\text{mol/L}$ - ۵)، به صورت وابسته به دوز، باعث کاهش سطح پروتئین و بیان ژن های iNOS و COX-2 و CRP می گردد (۱۹). Quercetin نیز به عنوان یک فلاونوئید آنتی اکسیدانی، وضعیت ROS را در سلول ها تحت تأثیر قرار می دهد (۲۰). تیمار Mcell های صفاقی تحریک شده رت با عصاره آبی گیاهی حاوی Quercetin، باعث کاهش ترشح هیستامین از این سلول ها می شود (۲۱). همچنین تیمار رت با Quercetin (200 mg/kg b.w) به صورت خوراکی ۲ ساعت قبل از تزریق LPS، سطح MDA و NO را در بافت این حیوانات کاهش می دهد (۲۲). امروزه یافتن فرمولاسیون های جدید به ویژه با منشأ گیاهی، از جمله استراتژی های درمانی سپسیس است. با این وجود، در مورد اثرات درمانی زیره سیاه برای کاهش عوارض ناشی از سپسیس، به خصوص کاهش آسیب های اکسیداتیو بافت ها در اثر سپسیس مطالعه ای صورت نگرفته است. بنابراین این مطالعه با هدف بررسی عملکرد عصاره هیدروالکلی استخراج شده از زیره سیاه در درمان سپسیس انجام شد. بدین منظور در این تحقیق تأثیر عصاره هیدروالکلی زیره سیاه بر سطح فاکتورهای استرس اکسیداتیو نظیر LP و GSH در ۲ بافت قلب و کلیه، همچنین پارامترهای آسیب بافت قلب و کلیه نظیر اوره، کراتینین و CK-MB در پلاسما موش های صحرایی بررسی گردید.

روش بررسی

در این تحقیق، از رت های نر بالغ و یستار با وزن متوسط 160 g استفاده گردید. رت ها از مراکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. غذای حیوانات از کارخانجات فرآورده های غذایی تهران به صورت Pellet با فرمول استاندارد، خریداری شد. حیوانات بالغ نیز دسترسی آزاد به غذا و آب آشامیدنی از طریق بطری داشتند. در این روش، پس از بیهوش کردن رت ها توسط مخلوط کتامین و گزیلوزین، در دیواره شکمی آنها به اندازه 2 cm برش ایجاد گردید. سپس با خارج کردن سکوم و با فشار انگشت، مدفوع درون سکوم به انتها انتقال داده شد. در ادامه، بخش سکوم تا زیر دریچه ایلئوسکال توسط نخ بخیه ۳-۰ بخیه زده شد و در سکوم (بدون آسیب به رگ های خونی)، ۲ سوراخ توسط سر سوزن G20 ایجاد شد. بعد از این مرحله، با برگرداندن روده به داخل محفظه شکمی، پوست و

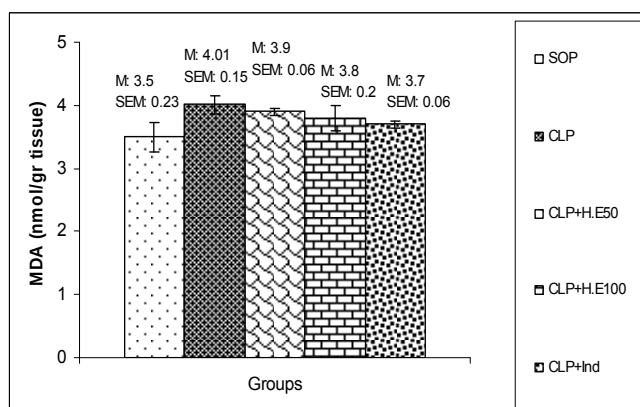
صفاق بخیه زده شد. در گروه کنترل (لاپاراتومی) نیز، جراحی فوق بدون بستن دریچه ایلئوسکال و سوراخ کردن سکوم انجام گرفت (۲۳). سپس حیوانات مورد بررسی به پنج گروه ۶ تایی تقسیم شدند. در گروه کنترل (SOP)، رت ها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و DMSO به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شد. در گروه CLP حیوانات تحت جراحی CLP قرار گرفته و DMSO به همان صورت به آنها تزریق گردید. دو گروه مختلف تیمار نیز، عصاره هیدروالکلی (H.E) استخراج شده از زیره سیاه (50 mg/kg b.w)، را بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p دریافت کردند. همچنین در گروه کنترل مثبت، ایندومتاسین (10 mg/kg b.w) بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p به آنها تزریق شد. سپس ۲۴ ساعت پس از تیمار، رت ها را کشته و بافت قلب و کلیه آنها به منظور اندازه گیری پارامترهای مورد نظر جدا شد. همچنین پس از خونگیری از قلب، پلاسما جهت اندازه گیری مارکرهای آسیب بافتی جدا گردید.

میزان TBARS [که به طور عمده MDA (Malone Dialdehyde) می باشد] با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از معرف تیوباریتوریک اسید (TBA)، براساس روش ارائه شده توسط Buege و Aust (سال ۱۹۸۷) اندازه گیری شد. در این روش 15 g از بافت قلب و کلیه در $1/5 \text{ ml}$ بافر فسفات 100 mM هموژن گردید و به مدت ۵ دقیقه در 3000 g سانتریفوژ شد. 1 ml از محلول رویی به لوله درب دار منتقل و به آن 2 ml از معرف TBA اضافه و ورتکس شد. سپس درب لوله بسته و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. پس از سرد شدن، لوله ها در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه با قدرت 3000 g سانتریفوژ شدند و جذب محلول رویی در مقابل بلانک در 535 nm توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان TBARS با استفاده از ضریب خاموشی آن محاسبه گردید (۲۴). در مرحله بعد، GSH با استفاده از معرف Ellman's و براساس روش Seldak و Lindsay (۱۹۸۶) اندازه گیری شد (۲۵). در این روش به 200 mg بافت قلب و کلیه، 8 ml محلول EDTA، 0.2 M اضافه و هموژن گردید. به 5 ml از این هموژنات، 4 ml آب مقطر و 1 ml محلول 50% TCA افزوده شد و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه ورتکس گردید. سپس جهت رسوب کامل پروتئین های بافتی، مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دور 3000 g در دمای اتاق سانتریفوژ شد. در ادامه، 2 ml از



نمودار شماره ۱: تأثیر عصاره زیره سیاه بر روی سطح MDA در بافت کلیه رت‌های مبتلا به سپسیس

در گروه کنترل (SOP) رت‌ها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و DMSO به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. در گروه CLP جراحی CLP قرار گرفته و DMSO به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. در دو گروه مختلف تیمار، عصاره هیدروآلکلی (H.E) استخراج شده از زیره سیاه (۵۰، ۱۰۰ mg/kg b.w) بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p به آنها تزریق شده است. گروه کنترل مثبت نیز، ایندومتاسین (۱۰ mg/kg b.w) را بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p دریافت کرده‌اند. مقادیر براساس میانگین ۶ نمونه $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است. علامت * نشان دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه کنترل معنی دار می باشد ($p < 0.05$). علامت # نشان دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی دار هستند ($p < 0.05$).



نمودار شماره ۲: تأثیر عصاره زیره سیاه بر روی سطح MDA در بافت قلب رت‌های مبتلا به سپسیس

در گروه کنترل (SOP) رت‌ها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و DMSO به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. در گروه CLP حیوانات تحت جراحی CLP قرار گرفته و DMSO به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. دو گروه مختلف تیمار نیز، عصاره هیدروآلکلی (H.E) استخراج شده از زیره سیاه (۵۰، ۱۰۰ mg/kg b.w) بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p به آنها تزریق شده‌اند. در گروه کنترل مثبت، ایندومتاسین (۱۰ mg/kg b.w) بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p به آنها تزریق شده است. مقادیر براساس میانگین ۶ نمونه $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است.

میزان گلو تاتیون احیا (GSH) در هموزن بافت کلیه و قلب رت‌های سپتیکی در تمام گروه‌ها، ۲۴ ساعت بعد از القای سپسیس، در نمودار شماره ۳ و ۴ نشان داده شده است. طبق نمودار، سطح گلو تاتیون در بافت کلیه و قلب رت‌های مبتلا به

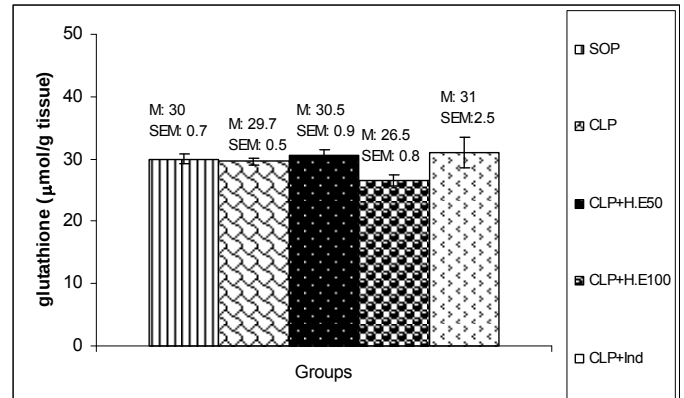
محلول رویی با ۴ ml بافر تریس ۰/۴ M، EDTA، ۰/۲ M (pH=۸/۹) و ۰/۱ ml محلول DTNB، ۰/۰۱ M (در متانول) مخلوط گردید و بلافاصله جذب آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۲ nm خوانده شد. میزان GSH با استفاده از منحنی استاندارد گلو تاتیون احیا اندازه گیری شد.

به منظور بررسی آسیب احتمالی سلول‌های بافت قلب و کلیه، میزان فعالیت برخی از پارامترهای آنزیمی و غیر آنزیمی آسیب بافت کلیه و قلب (به ترتیب CK-MB, Urea, Creatinin) ۲۴ ساعت بعد از القای سپسیس در پلازما اندازه گیری شدند. اندازه گیری پارامترهای مذکور طبق پروتکل تأیید شده موجود در کیت‌های خریداری شده از شرکت پارس آزمون انجام گرفت. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (SEM) گزارش شدند. اختلافات و تفاوت‌های بین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ و آزمون واریانس تعیین گردید. آزمون تعقیبی مورد استفاده در این آنالیز Tukey's HSD (Honestly Significant Differences) بود. معیار معنی دار بودن داده‌ها در کمتر از ۰/۰۵ ($p < 0.05$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

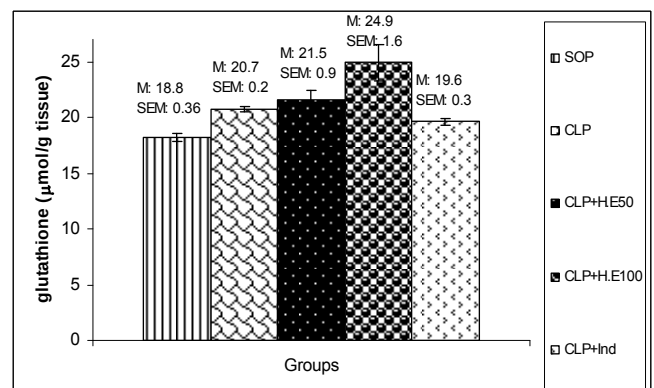
همان‌طور که در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است، سطح MDA به عنوان محصول لیپید پراکسیداسیون در بافت کلیه رت‌های مبتلا به سپسیس، ۲۴ ساعت بعد از القای سپسیس (گروه CLP)، ۲۶٪ افزایش یافته است ($p < 0.05$). تیمار رت‌های سپتیکی با عصاره هیدروآلکلی زیره سیاه در دوز ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg b.w هیچ گونه تغییر معنی داری بر روی سطح پراکسیداسیون لیپیدها ایجاد نکرده است، برخلاف عصاره، سطح MDA در گروه‌های تیمار شده با داروی ضد التهابی ایندومتاسین کاهش معنی داری داشته است ($p < 0.05$). همان‌طور که در نمودار شماره ۲ مشاهده می شود، سطح MDA در بافت قلب همه گروه‌ها در سطح یکسانی قرار دارد، به طوری که پراکسیداسیون لیپیدها در بافت قلب رت‌های گروه CLP تغییر معنی داری نیافته است. تیمار رت‌های مبتلا به سپسیس با عصاره حاصل از زیره سیاه نیز تغییر معنی داری در میزان MDA بافت قلب ایجاد نکرده است.

سپسیس (گروه CLP) نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری نیافته است. تیمار رت‌های سپتیک با عصاره استخراج شده از زیره سیاه در ۲ دوز ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg b.w نیز تأثیری بر روی میزان گلوتاتیون نداشته که این عدم تغییر در گروه تیمار شده با ایندومتاسین نیز قابل مشاهده می‌باشد.



نمودار شماره ۳: تأثیر عصاره زیره سیاه بر روی سطح GSH در بافت کلیه رت‌های مبتلا به سپسیس

در گروه کنترل (SOP) رت‌ها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و DMSO به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. در گروه CLP حیوانات تحت جراحی CLP قرار گرفته و DMSO به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. دو گروه مختلف تیمار، عصاره هیدروالکلی (H.E) استخراج شده از زیره سیاه (۵۰، ۱۰۰ mg/kg b.w) را بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p دریافت کرده‌اند. در گروه کنترل مثبت، ایندومتاسین (۱۰ mg/kg b.w) بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p به آنها تزریق شده است. مقادیر براساس میانگین ۶ نمونه $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است.



نمودار شماره ۴: تأثیر عصاره زیره سیاه بر روی سطح GSH در بافت قلب رت‌های مبتلا به سپسیس

در گروه کنترل (SOP) رت‌ها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و DMSO به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. در گروه CLP حیوانات تحت جراحی CLP قرار گرفته و DMSO به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. دو گروه مختلف تیمار، عصاره هیدروالکلی (H.E) استخراج شده از زیره سیاه (۵۰، ۱۰۰ mg/kg b.w) را بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p دریافت کرده‌اند. در گروه کنترل مثبت، ایندومتاسین (۱۰ mg/kg b.w) بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p به آنها تزریق شده است. مقادیر براساس میانگین ۶ نمونه $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است.

به منظور بررسی آسیب بافت کلیه و قلب، ۲۴ ساعت بعد از CLP، مارکرهای آنزیمی و غیر آنزیمی اندازه گیری شدند که نتایج آن در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. نسبت اوره به کراتینین در گروه CLP به میزان زیادی (حدود ۵/۵ برابر) نسبت به گروه کنترل افزایش دارد ($p < 0.05$). افزایش معنی دار این پارامتر که نشان دهنده آسیب بافت کلیه می‌باشد در گروه تیمار شده با ایندومتاسین به طور معنی داری کاهش یافته است ($p < 0.05$). برخلاف ایندومتاسین، تیمار رت‌های سپتیک با عصاره هیدروالکلی زیره سیاه در هر دو دوز، هیچ گونه تغییر معنی داری در نسبت اوره به کراتینین در پلاسما ایجاد نکرده است. آنزیم CK-MB که نشان دهنده آسیب بافت قلب می‌باشد، در هیچ کدام از گروه‌ها تغییری نیافته است، بدان معنی که این شاخص آسیب بافتی در گروه سپسیس (گروه CLP) افزایش نیافته و همچنین تیمار رت‌ها با عصاره زیره سیاه و داروی ایندومتاسین نیز تغییری در سطح این آنزیم در پلاسما ایجاد نکرده است.

جدول: تأثیر عصاره هیدروالکلی زیره سیاه بر روی مارکرهای آسیب بافتی در پلاسمای رت‌های مبتلا به سپسیس

گروه‌ها	Urea/creatinine (mg/dl)	CK-MB (U/L)
لاپاراتومی (SOP)	۸۴/۸±۱۲	۴۷۵/۲±۳۳
CLP	۴۶۲/۵±۸۱ [*]	۴۸۰/۷±۳۴
CLP+H.E50	۴۷۴/۳±۲۳	۳۹۷±۹۰
CLP+H.E100	۴۷۷/۳±۱۴	۶۴۹±۹
CLP+Ind10	۳۶/۸±۱۱ [‡]	۴۲۳/۳±۶۶

در گروه کنترل (SOP) رت‌ها تحت جراحی لاپاراتومی قرار گرفته و DMSO به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. در گروه CLP حیوانات تحت جراحی CLP قرار گرفته و DMSO به عنوان حلال عصاره به آنها تزریق شده است. در دو گروه مختلف تیمار، رت‌ها عصاره هیدروالکلی (H.E) زیره سیاه (۵۰، ۱۰۰ mg/kg b.w) را بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p دریافت کرده‌اند. در گروه کنترل مثبت، ایندومتاسین (۱۰ mg/kg b.w) بلافاصله بعد از CLP به صورت i.p به آنها تزریق شده است. مقادیر براساس میانگین ۶ نمونه $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است. علامت * نشان دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CLP بوده که با گروه کنترل معنی دار می‌باشد ($p < 0.05$). علامت ‡ نشان دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CLP معنی دار هستند ($p < 0.05$).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد ترکیبات آنتی اکسیدانی از جمله انواع فلاونوئیدها، ترکیبات موجود در عصاره هیدروالکلی زیره سیاه را

تشکیل می‌دهند (۲۶). بنابراین در این تحقیق، اثرات محافظتی این عصاره در آسیب بافت قلب و کلیه در سپسیس القاشده توسط مدل تجربی التهابی CLP در رت بررسی شد که در این راستا پارامترهای دخیل در آسیب اکسیداتیو بافتی از جمله GSH، LP، همچنین پارامترهای پلاسمایی شاخص آسیب بافت کلیه (اوره به کراتینین) و بافت قلب (CK-MB) اندازه‌گیری شدند. نتایج این مطالعه نشان داد سپسیس القاشده توسط مدل التهابی CLP باعث آسیب نسبی بافت کلیه می‌شود که افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، همچنین افزایش نسبت اوره به کراتینین این مطلب را تأیید می‌کند (نمودار شماره ۲). مطالعات دیگری نیز نشان داده‌اند استرس اکسیداتیو در سپسیس رابطه مستقیمی با آسیب بافتی در مدل CLP دارد. افزایش قابل توجه ROS در سپسیس می‌تواند از مسیرهای مختلف از جمله پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و نیز آسیب اکسیداتیو به پروتئین و DNA، منجر به آسیب سلولی گردد (۲۷، ۲۳). همچنین در این مطالعه، گلوکاتیون به‌عنوان یک جزء مهم در مکانیسم دفاع داخل سلولی (۲۸)، در بافت کلیه رت‌های مبتلا به سپسیس تغییری ایجاد نکرد. این امر نشان‌دهنده این نکته است که آسیب بافت کلیه آن‌قدر جدی نبوده که باعث کاهش معنی‌دار GSH گردد (نمودار شماره ۳). از طرف دیگر، یافته‌ها مطالعه حاضر نشان داد بافت قلب پس از القای سپسیس توسط مدل تجربی التهابی CLP دچار آسیب جدی نشده است. عدم تغییر معنی‌دار پارامترهای دخیل در آسیب اکسیداتیو بافتی از جمله GSH، LP، همچنین CK-MB پلاسما در تمام گروه‌ها این نتیجه را تأیید می‌کند ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۲، ۴ و جدول شماره ۲).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تیمار رت‌ها با عصاره هیدروالکلی زیره در ۲ دوز ۵۰ و ۱۰۰ mg به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تأثیری در پارامترهای استرس اکسیداتیو (GSH و TBARS) در ۲ بافت قلب و کلیه ندارد ($p < 0.05$) و این در حالی است که داروی ایندومتاسین باعث کاهش معنی‌داری در سطح LP و نیز کاهش نسبت اوره به کراتینین (شاخص عملکرد کلیه) در پلاسمای رت‌های تیمار شده می‌شود ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۴-۱ و جدول شماره ۲). مطالعات قبلی بر روی بافت ریه نیز نشان داد عصاره هیدروالکلی زیره سیاه در ۲ دوز ۵۰ و ۱۰۰ mg به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تأثیری بر روی پارامترهای دخیل در آسیب

اکسیداتیو بافتی (GSH، MPO، LP) ندارد (۲۶)؛ در صورتی که اثرات مثبت اسانس حاصل از زیره سیاه در مطالعات قبلی گزارش شده است. اسانس حاصل از دانه‌های زیره سیاه با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی در *In Vitro* (۲۶) با تعدیل فاکتورهای دخیل در سیستم استرس اکسیداتیو/آنتی‌اکسیدانی، از آسیب بافت کبد و ریه ناشی از سپسیس جلوگیری می‌کند (۳۰، ۲۹). نتایج حاصل از بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس در رت‌های سپتیکی نشان می‌دهد اسانس زیره سیاه در ساعات مختلف پس از القای سپسیس باعث تعدیل سطح فاکتورهای دخیل در تعادل سیستم آنتی‌اکسیدانی/استرس اکسیداتیو در دو بافت کبد و ریه می‌شود و این در حالی است که عصاره هیدروالکلی تأثیری بر روی پارامترهای فوق ندارد (۳۱). خواص فارماکودینامیکی و توزیع ترکیبات موجود در عصاره زیره سیاه در بدن می‌تواند یکی از دلایل عدم تأثیر عصاره هیدروالکلی بر روی پارامترهای دخیل در آسیب اکسیداتیو بافتی باشد. وجود ترکیبات آروماتیک گلوکوزیدی، آلکیل گلوکوزیدها، گلوکوسیدها، نوکلئوزیدها و فلاونوئیدها در عصاره هیدروالکلی زیره سیاه (۱۱)، باعث زیست دسترسی (Bioavailability) پایین این عصاره می‌شود. محدود بودن زیست دسترسی پلی‌فنل‌ها، نه تنها به دلیل خواص فیزیکیوشیمیایی مولکول؛ بلکه به دلیل متابولیسم آن نیز می‌باشد که موجب ورود یک‌باره این گونه مولکول‌ها به فاز ۲ متابولیسم می‌شود (۳۲-۳۴). به‌علاوه، باوجود اثبات فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها، در مطالعات متعددی نیز فعالیت پرواکسیدانی این ترکیبات گزارش شده است (۳۵-۳۷). نتایج تحقیقات Robaszkiewicz و همکارانش نشان داد اثرات پرواکسیدانی فلاونوئیدها می‌تواند به‌صورت وابسته به دوز باشد. این محققین گزارش کردند تیمار رده سلولی سرطان ریه انسانی A549 با غلظت‌های پایین Quercetin (۵ و ۱۰ μM) منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، کاتالاز، GST و کاهش تولید ROS در این سلول‌ها می‌شود، ولی این ترکیب فلاونوئیدی در غلظت زیاد (۱۰۰ μM) به‌عنوان یک ترکیب پرواکسیدان عمل کرده و منجر به افزایش تولید ROS و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (۳۸). همچنین تیمار رده سلولی لوکمیای انسان HL-60 با یک ترکیب فلاونوئید به‌نام اپی‌ژنین منجر به تولید ROS در این سلول‌ها می‌شود. این در

پرواکسیدان عمل نمایند (۲۰). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد در شرایط سپسیس، میزان تولید ROS و فعالیت آنزیم MPO افزایش و سطح آنتی اکسیدان‌هایی نظیر گلوکاتایون کاهش می‌یابد. بنابراین احتمالاً در این شرایط، پلی فنل‌ها و فلاونوئیدهای موجود در عصاره هیدروالکلی زیره سیاه به حالت اکسید درآمده و به عنوان یک عامل پرواکسیدان عمل می‌کنند؛ به طوری که قادر به جبران آسیب‌های ناشی از سپسیس نمی‌باشند. همچنین نباید تأثیر نوع تزریق، زمان تزریق و نوع مدل التهابی را در عدم تأثیر عصاره هیدروالکلی زیره سیاه نادیده گرفت. از طرفی نیز بررسی راههای دیگر تزریق از جمله تزریق زیرپوستی، وریدی و یا تیمار به صورت خوراکی و زمانهای مختلف تزریق، قبل و بعد از القای سپسیس باید مدنظر قرار گیرد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد تزریق i.p عصاره هیدروالکلی زیره سیاه بلافاصله بعد از القای سپسیس، هیچ گونه تأثیری بر روی تعدیل پارامترهای اکسیداتیو دخیل در آسیب بافتی در کلیه و قلب نداشته است. البته در این راستا بررسی مدل‌های دیگر القای سپسیس، همچنین استفاده از راههای دیگر تیمار حیوانات نیز نباید نادیده گرفته شود.

حالی است که تیمار همزمان این سلول‌ها با مهارکننده‌های آنزیم MPO، تولید ROS توسط اپی ژنین را کاهش می‌دهد. نتایج این تحقیق نشان داد اکسیداسیون اپی ژنین توسط آنزیم MPO و تبدیل شدن آن به رادیکال فنوکسیل، مسئول اثرات پرواکسیدانی اپی ژنین است (۳۹). آنزیم MPO در حضور H_2O_2 با گرفتن یک الکترون از حلقه کاتکول B موجود در فلاونوئیدها آنها را به رادیکال فنوکسیل تبدیل می‌کند که منجر به آسیب اکسیداتیو به ماکرومولکول‌های سلول می‌شود (۲۰). همچنین مطالعات نشان داده است فعالیت پرواکسیدانی پلی فنل‌ها در اثر واکنش با فلزاتی مانند آهن و مس ایجاد می‌شود؛ بدین صورت که پلی فنل‌ها به Fe^{3+} متصل شده و آن را به Fe^{2+} احیا می‌کنند. در این فرآیند، خود پلی فنل‌ها به سمی کوئینون (Semiquinone) اکسید می‌شوند که در ادامه قادرند یک اتم Fe^{3+} دیگر را به Fe^{2+} احیا و خود به کوئینون تبدیل شوند. Fe^{2+} حاصل از فرآیند فوق با شرکت در واکنش شبه فنتونی، منجر به تولید رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شود (۴۰). همچنین پلی فنل‌ها با فعالیتی همانند آنزیم سوپر اکسید دسموتاز با آنیون‌های سوپر اکسید واکنش داده و H_2O_2 و رادیکال‌های سمی کوئینون را ایجاد می‌کنند. از طرفی، H_2O_2 حاصل از فرآیند فوق نیز قادر است با شرکت در واکنش فنتون و در حضور Fe^{2+} ، رادیکال‌های هیدروکسیل بیشتری تولید کند (۴۰). به طور کلی، با توجه به مطالب فوق می‌توان بیان نمود که پلی فنل‌ها و فلاونوئیدها در حالت احیا مانند آنتی اکسیدان عمل می‌کنند؛ در صورتی که همین ترکیبات در حالت اکسید شده (مثل رادیکال فنوکسیل یا کوئینون) می‌توانند به عنوان یک عامل

References:

- Victor VM, Rocha M, Fuente MD. Immune Cells: Free Radicals and Antioxidants in Sepsis. *Int Immunopharmacol* 2004;4:327-347.
- Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. *Chest* 1997;112:235-243.
- Basu S, Eriksson M. Lipid Peroxidation Induced by an Early Inflammatory Response in Endotoxaemia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2000;14:17-23.
- Gutteridge JM, Mitchell J. Redox Imbalance in the Critically Ill. *Br Med Bull* 1999;55:9-75.
- Basu S, Eriksson M. Vitamin E in Relation to Lipid Peroxidation in Experimental Septic Shock. *Eur J Pharmacol* 2006;534:202-209.
- Liaw WJ, Chen TH, Lai ZZ, Chen SJ, Chen A, Tzao C, et al. Effects of a Membrane-Permeable Radical Scavenger, Tempol, on Intraperitoneal Sepsis-Induced Organ Injury in Rats. *Shock* 2005;23(1):88-96.

7. Hsu DZ, Liu MY. Effects of Sesame Oil on Oxidative Stress after the Onset of Sepsis in Rats. *Shock* 2004;22(6):582-585.
8. Hsu DZ, Li YH, Chien SP, Liu MY. Effects of Sesame Oil on Oxidative Stress and Hepatic Injury after Cecal Ligation and Puncture in Rats. *Shock* 2004;21(5):466-469.
9. Kim JY, Lee SM. Effect of Ascorbic Acid on Hepatic Vasoregulatory Gene Expression during Polymicrobial Sepsis. *Life Sci* 2004;75(16):2015-26.
10. De Carvalho CCCR, Da Fonseca, MMR. Carvone: Why and Howshould one Bother to Produce This Terpene. *Food Chem* 2006;95:413-422.
11. Matsumura T, Ishikawa T, Kitajima J. Water-Soluble Constituents of Caraway: Aromatic Compound, Aromatic Compound Glucoside and Glucides. *Phytochemistry* 2002;61(4):455-459.
12. Kunzemann J, Herrmann K. Isolation and Identification of Flavon(ol)-O-Glycosides in Caraway (*Carum Carvi* L), Fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill), Anise (*Pimpinella Anisum* L), and Coriander (*Coriandrum Sativum* L), and of Flavon-C-Glycosides in Anise. I Phenolics of Spices (Author's Transl). *Z Lebensm Unters Forsch* 1977;164(3):194-200.
13. Padmashree A, Roopa N, Semwal AD, Sharma GK. Star-Anise (*Illicium Verum*) and Black Caraway (*Carum Nigrum*) as Natural Antioxidants. *Food Chem* 2007;104:59-66.
14. Pavanato MA, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS. Quercetin Prevents Oxidative Stress in Cirrhotic Rats. *Dig Dis Sci* 2007;52(10):2616-21.
15. Elke Röhrdanz, Achim Bittne, Quynh-Hoa Tran-Thi, Regine Kahl. The Effect of Quercetin on the mRNA Expression of Different Antioxidant Enzymes in Hepatoma Cells. *Mol Toxicol* 2003;77(9):506-510.
16. Satyanarayana S, Sushruta K, Sarma GS, Srinivas N, Subba Raju GV. Antioxidant Activity of the Aqueous Extracts of Spicy Food Additives-Evaluation and Comparison with Ascorbic Acid in in-Vitro Systems. *J Herb Pharmacother* 2004;4(2):1-10.
17. Lemhadri A, Hajji L, Michel JB, Eddouks M. Cholesterol and Triglycerides Lowering Activities of Caraway Fruits in Normal and Streptozotocin Diabetic Rats. *J Ethnopharmacol* 2006;106(3):321-326.
18. Mazaki M, Kataoka K, Kinouchi T, Vinitketkumnun U, Yamada M, Nohmi T, et al. Inhibitory Effects of Caraway (*Carum Carvi* L) and Its Component on N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidine-Induced Mutagenicity. *J Med Invest* 2006;53(2):123-133.
19. García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, et al. The Anti-Inflammatory Flavones Quercetin and Kaempferol Cause Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase, Cyclooxygenase-2 and Reactive C-Protein, and Down-Regulation of the Nuclear Factor Kappa B Pathway in Chang Liver Cells. *Eur J Pharmacol* 2007;557(3):221-229.
20. Galati G, O'Brien PJ. Potential Toxicity of Flavonoids and other Dietary Phenolics: Significance for their Chemopreventive and Anticancer Properties. *Free Radic Biol Med* 2004;37(3):287-303.
21. Haggag EG, Abou-Moustafa MA, Boucher W, Theoharides TC. The Effect of a Herbal Water-Extract on Histamine Release from Mast Cells and on Allergic Asthma. *J Herb Pharmacother* 2003;3(4):41-54.
22. Abd EI-Gawad HM, Khalifa AE. Quercetin, Coenzyme Q10, and l-Canavanine as Protective Agents Against Lipid Peroxidation and Nitric Oxide Generation in Endotoxin-Induced Shock in Rat Brain. *Pharmacol Res* 2001;43(3):257-263.
23. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD. Cecal Ligation and Puncture. *Shock* 2005;24:52-57.
24. Buege JA, Aust SD. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-311.
25. Seldak J, Lindsay RH. Estimation of Total Protein Bound and Non-Protein Sulfidryl Groups in Tissue with Elman's Reagent. *Anal Biochem* 1986;25:192-205.
26. Fatemi F, Allameh A, Khalafi H, Rezaei MB, Seyhoun M. The Effect of Essential Oils and Hydroalcoholic Extract of Caraway Seed on Oxidative Stress Parameters in Rats Suffering from Acute Lung Inflammation before and after γ -Irradiation. *IJMAP* 2010;25:441-455.

27. Gutteridge, JMC. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clin Chem* 1995;41:1819-28.
28. Villa P, Saccani A, Sica A. Glutathione Protects Mice from Lethal Sepsis by Limiting Inflammation and Potentiating Host Defense. *J Infect Dis* 2002;185:1115-20.
29. Fatemi F, Allameh A, Khalafi H, AshrafiHelan J. Hepatoprotective Effects of G-Irradiated Caraway Essential Oils in Experimental Sepsis. *Appl Radiat Isot* 2010;68:280-285.
30. Fatemi F, Allameh A, Khalafi H, Rajaei R, Rezaei MB. Biochemical Properties of γ -Irradiated Caraway Essential Oils. *J Food Biochem* 2010;In Press.
31. Davoodian N. Considering the Statues of Oxidative Stress and Antioxidant Defense System in Septic Rats Treated with Hydroalcoholic and Essential Oils Derived from Caraway seeds. Tehran: Medical Department, Tarbiat Modares Univresity; 2009. p. 45-73.
32. Lu H, Meng X, Yang CS. Enzymology of Methylation of Tea Catechins and Inhibition of Catechol-O-Methyltransferase by (-)-Epigallocatechin Gallate. *Drug Metab Dispos* 2003;31:572-579.
33. Lu H, Meng X, Li C, Sang S, Patten Ch, Sheng Sh, et al. Glucuronides of Tea Catechins: Enzymology of Biosynthesis and Biological Activities. *Drug Metab Dispos* 2003;31:452-461.
34. Yang CS, Sang S, Lambert JD, Lee MJ. Bioavailability Issues in Studying the Health Effects of Plant Polyphenolic Compounds. *Mol Nutr Food Res* 2008;52:139-151.
35. Panemangalore M, Bebe FN. Short-and Long-Term Exposure to Low Levels of Pesticide and Flavonoid Mixtures Modify Endogenous Antioxidants in Tissues of Rats. *J Environ Sci Health* 2009;44:357-364.
36. Murzakhmetova M, Moldakarimov S, Tancheva L, Abarova S, Serkedjieva J. Antioxidant and Prooxidant Properties of a Polyphenol-Rich Extract from Geranium Sanguineum L. In Vitro and In Vivo Phytother Res 2008;22:746-751.
37. Babich H, Gottesman RT, Liebling EJ, Schuck AG. Theaflavin-3-Gallate and Theaflavin-3-Gallate, Polyphenols in Black Tea with Prooxidant Properties. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;103:66-74.
38. Robaszkiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G. Antioxidative and Prooxidative Effects of Quercetin on A549 Cells. *Cell Biol Int* 2007;31:1245-50.
39. Miyoshi N, Naniwa K, Yamada T, Osawa T, Nakamura Y. Dietary Flavonoid Apigenin is a Potential Inducer of Intracellular Oxidative Stress: The Role in the Interruptive Apoptotic Signal. *Arch Biochem Biophys* 2007;466:274-282.
40. Perron NR, Brumaghim JL. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochem Biophys* 2009;53:75-100.