

بررسی اثرات آنتی اکسیدان عصاره الکلی کلاله زعفران در مقابله با سمیت کبدی ریفامپین

داریوش مهاجری^۱، یوسف دوستار^۲، جعفر رحمانی^۳

^۱ دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ایران

^۲ استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ایران

^۳ استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ایران

چکیده

زمینه و هدف

بیماری سل هم چنان به عنوان یک مسئله بهداشت عمومی در سراسر جهان مطرح است. ریفامپین که به عنوان یک آنتی بیوتیک به طور معمول برای درمان بیماری سل مورد استفاده قرار می گیرد، یک عامل توکسیک قوی برای کبد به شمار می رود. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات آنتی اکسیدانی عصاره الکلی کلاله زعفران در مقابل سمیت کبدی ریفامپین در موش صحرایی است.

روش بررسی

موش های صحرایی نروستار به طور تصادفی در ۵ گروه ۸ سری توزیع گردیدند. گروه ۱ به عنوان شاهد سالم، نرمال سالیین (۱۰ml/kg) و گروه ۲ نیز به عنوان شاهد مسموم، ریفامپین (۵۰mg/kg) دریافت کرد. به گروه های ۳ تا ۵ به ترتیب سیلیمارین (۵۰mg/kg) و عصاره الکلی کلاله زعفران در دوزهای ۴۰mg/kg و ۸۰mg/kg همراه با ریفامپین (۵۰mg/kg) تجویز گردید. کلیه تیمارها از طریق خوراکی به شکل محلول در نرمال سالیین (۱۰ml/kg)، به طور روزانه و به مدت یک ماه انجام گردید. در پایان دوره آزمایش، ماحصل پراکسیداسیون لیپیدی (مالون دی آلدئید)، فعالیت سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو در هموژنات بافت کبد مورد سنجش قرار گرفت. گروه ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی بونفرونی با هم مقایسه گردیدند. سطح معنی داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

عصاره الکلی کلاله زعفران (۸۰ و ۴۰ mg/kg) و سیلیمارین به طور معنی داری میزان پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش و سطوح آنتی اکسیدان ها را در موش های تیمار شده با ریفامپین، به صورت وابسته به دوز افزایش دادند.

نتیجه گیری

یافته های بررسی حاضر نشان می دهد که اثرات محافظتی کلاله زعفران در آسیب اکسیداتیو کبدی ناشی از ریفامپین، ممکن است با خواص آنتی اکسیدانی و زداپندگی رادیکال آزاد آن مرتبط باشد.

کلیدواژه: زعفران، ریفامپین، سمیت کبدی، آنتی اکسیدان، موش صحرایی

گوارش / دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۸، ۲۱۱-۲۱۸

زمینه و هدف

بیماری سل هم چنان به عنوان یک مسئله بهداشت عمومی در سراسر جهان

نویسنده مسئول: تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی،

گروه پاتوبیولوژی، بخش آسیب شناسی، کد پستی ۵۱۵۸۹

تلفن و نمابر: ۰۴۱۱-۶۳۷۳۹۳۵

پست الکترونیک: daryoushmohajeri@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۲۷ تاریخ اصلاح نهایی: ۸۹/۲/۲۸

تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۳۰

مطرح است، به ویژه این که با شیوع بیماری ایدز یکی از عوامل عمده منجر به فوت در مبتلایان بزرگسال شده است. (۱)، ریفامپین* که به عنوان یک آنتی بیوتیک به طور معمول برای درمان بیماری سل مورد استفاده قرار می گیرد، یک عامل توکسیک قوی برای کبد به شمار می رود. (۲)، هپاتیت بالینی در ۱/۱ درصد از افراد مسنی که با ریفامپین درمان شده اند، گزارش شده است. (۳)، ولی از آنجایی که ریفامپین اکثراً همراه با سایر داروهای ضد بیماری

* Rifampin

درون تنی ***** و برون تنی ***** مورد بررسی قرار گرفته و به اثبات رسیده است، بنابراین از آن به عنوان عاملی استاندارد برای مقایسه محصولات فارماکولوژیک با منشا گیاهی، در زمینه حفاظت از کبد در برابر عوامل توکسیک استفاده می شود. (۱۵و۱۴)، به همین جهت، در این مطالعه نیز از میان عوامل متعدد محافظت کننده کبد، سیلیمارین به دلیل گیاهی بودن منشا آن، خواص آنتی اکسیدانی، سهولت دسترسی و مهم تر از همه نداشتن اثرات توکسیک و عوارض جانبی حتی در دوزهای بالا، جهت مقایسه نتایج، برگزیده شد. (۱۸-۱۶)

روش بررسی

مواد دارویی: زعفران مورد استفاده در این مطالعه از شرکت نوین زعفران (مشهد، ایران) تهیه گردید. برای تهیه عصاره، ابتدا کلالة زعفران توسط آسیاب مکانیکی کاملاً پودر گردید. سپس به کمک حلال اتانولی (۱۰ گرم پودر در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درجه) اقدام به عصاره گیری به روش ماسراسیون ***** گردید. عمل عصاره گیری سه بار تکرار شد و عصاره های حاصله توسط دستگاه روتاری اوپورتور ***** تحت خلا و دمای ۴۵ درجه سانتی گراد کاملاً خشک گردید. عصاره خشک شده تا زمان استفاده در یخچال و در دمای زیر صفر درجه نگه داری شد. (۱۹)

تهیه و نگه داری حیوانات: برای انجام این مطالعه، تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی 20 ± 20 گرم که از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه شده بودند، به طور تصادفی در ۵ گروه ۸ سری شامل گروه های شاهد سالم، شاهد مسموم *****، کنترل مثبت، تیمار با دوز پائین عصاره و تیمار با دوز بالای عصاره توزیع گردید. شرایط نگه داری برای تمام گروه ها یکسان و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی و دمای 21 ± 2 درجه سانتی گراد در قفس های مخصوص و در بستری از پوشال در نظر گرفته شد. جیره غذایی

* Isoniazid
** Pyrazinamide
*** TripeptideGlutathione
**** Iridaceous
***** Crocin
***** Ischemia-reperfusion
***** Aflatoxin B1
***** Cisplatin
***** Silymarin
***** Flevonoid
***** Silybum marianun
***** in vitro
***** in vivo
***** Maceration
***** Rotary evaporator
***** Toxicant Control

سل نظیر ایزونیاژید* و پیرازینامید** تجویز می گردد، لذا میزان وقوع واقعی هیپاتیت ناشی از مصرف ریفامپین به طور مجزا، ناشناخته باقی مانده است. (۴) مکانیسم آسیب کبدی ناشی از ریفامپین هنوز به طور کامل مشخص نشده است. برخی از مطالعات نشان داده اند که ریفامپین از طریق آسیب اکسیداتیو منجر به پراکسیداسیون لیپیدی و تخلیه آنتی اکسیدان تری پتید گلوکوتایون*** و آنزیم های زداینده رادیکال های آزاد می شود. (۵)، بررسی برای یافتن دارویی مفید در جهت پیش گیری از سمیت کبدی ریفامپین هنوز از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده و تلاش برای یافتن اثرات محافظتی هر فرآورده طبیعی در این زمینه از اهمیت کلینیکی ویژه ای برخوردار است. زعفران به عنوان گرانترین چاشنی در جهان به طور گسترده ای در ایران، هندوستان و یونان کشت داده می شود، زعفران متعلق به خانواده زنبق**** است. به عنوان یک گیاه دارویی، زعفران برای درمان اختلالات معدی و سوء هاضمه و هم چنان افزایش اشتها و ضد اسپاسم کاربرد دارد. گزارش شده است که زعفران دارای اثرات کاهنده چربی خون، ضد التهاب، آنتی اکسیدان و ضد سرطان نیز هست. هم چنین از زعفران برای درمان اختلالات عصبی و آسم نیز استفاده می شود. (۶-۸)، زعفران و ماده موثره آن یعنی کروسین مانع از مرگ آپوپتوزی سلول های عصبی در اثر عوامل القاء گر داخلی و خارجی می شود. (۹)، عصاره آبی زعفران و ماده موثره آن یعنی کروسین***** در پیش گیری از آسیب اکسیداتیو ناشی از ایسکمی برقراری مجدد خون***** در موش های صحرایی، مفید بوده است. (۱۰)، تحقیقات نشان داده است که عصاره زعفران هیپاتوسیت های اولیه را نیز در مقابل آسیب های اکسیداتیو محافظت می نماید. هم چنین مشخص شده است که زعفران سمیت آفلاتوکسین B₁***** را تعدیل نموده و ضایعات کبدی ناشی از آن را کاهش می دهد. ثابت شده است که عصاره زعفران، مثانه را نیز در مقابل سمیت ناشی از سیکلوفسفامید محافظت می کند. (۱۱)، بررسی ها نشان داده است که عصاره زعفران اثرات جانبی نفروتوکسیک سیس پلاتین***** را هم کاهش می دهد، لکن مکانیسم دقیق آن در این زمینه هنوز مشخص نشده است. (۱۲)

با توجه به مجموعه فوق الذکر، فرض بر این است که زعفران می تواند کبد را در برابر استرس اکسیداتیو داروی ضد سل ریفامپین نیز محافظت کند. بنابراین، مطالعه حاضر برای اولین بار برای ارزیابی اثرات آنتی اکسیدانی عصاره الکلی کلالة زعفران در مقایسه با سیلیمارین در برابر سمیت کبدی ریفامپین در موش صحرایی طراحی و اجرا گردید.

سیلیمارین*****، عصاره فلاونوئید***** تصفیه و خالص سازی شده دانه گیاه سیلیوم ماریانوم***** می باشد که به طور وسیع برای درمان بیماری های کبدی با منشا مختلف مورد استفاده قرار می گیرد. (۱۳)، از آنجائی که جنبه های مختلف فارماکولوژیکی سیلیمارین به خوبی مشخص و خواص حفاظت از کبدی آن با هر دوروش

اثرات آنتی اکسیدان عصاره کلالة زعفران

به عنوان مقیاسی از پراکسیداسیون چربی، در قالب TBARS (Thiobarbituric acid reacting substances) و با استفاده از روش استربایر ***** و چیسمن ***** مورد سنجش قرار گرفت. (۲۰)، به طور خلاصه، مخلوط واکنشگری متشکل از ۰/۲ میلی لیتر لوریل سولفات سدیم ۸/۱ درصد، ۱/۵ میلی لیتر محلول اسید استیک ۲۰ درصد با pH=۳/۵ و ۱/۵ میلی لیتر از محلول آبی ۰/۸ درصد تیوباربیتریک اسید در ۰/۲ میلی لیتر ۱۰ PMS درصد (w/v)، ایجاد گردید. حجم مخلوط به دست آمده، توسط آب مقطر به ۴ میلی لیتر افزایش یافت، سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. پس از خنک شدن در آب جاری، ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۵ میلی لیتر از مخلوط n-بوتانول و پیریدین (۱۵:۱، v/v) به آن افزوده سپس سانتریفیوژ گردید. لایه ارگانیک آن برداشته شد و شدت جذب در ۵۳۲ (nm) نانومتر اندازه گیری گردید. میزان TBARS با استفاده از ضریب $M^{-1}cm^{-1} \times 10^5 = 1/56$ اندازه گیری و به صورت نانومول TBARS در میلی گرم پروتئین بیان گردید. پروتئین بافتی با استفاده از روش بیوره اندازه گیری و مقدار TBARS به صورت نانومول در میلی گرم پروتئین بیان گردید. (۲۰)

ب) اندازه گیری فعالیت سوپراکسید دسموتاز: فعالیت سوپراکسید دسموتاز توسط روش نیشیکیمی ***** (۲۱) مورد سنجش و توسط روش کاکار ***** (۲۲) نیز تعدیل گردید.

در حدود ۵ میکروگرم از پروتئین های تام هر یک از هموژنات های کبدی با بافر پیروفسفات سدیم، (Phenazine methosulfate)PMT و NBT (Nitro-blue Terazolium) مخلوط گردید. واکنش با افزودن NADH (Nicotinamide-adenine dinucleotide) آغاز گردید. مخلوط واکنش در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه انکوبه و با افزودن ۱ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال متوقف گردید. شدت جذب مخلوط رنگزای تشکیل شده در ۵۶۰ nm اندازه گیری گردید. هر واحد از فعالیت سوپراکسید دسموتاز به صورت غلظت آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از تولید رنگ تا ۵۰ درصد در ۱ دقیقه، تحت شرایط مطالعه، تعیین گردید.

ج) اندازه گیری فعالیت کاتالاز: فعالیت کاتالاز توسط روش کالیبورن ***** (۲۳) و بر اساس تجزیه پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ نانومتر، مورد سنجش قرار گرفت. به طور خلاصه، مخلوط مورد سنجش متشکل از

و آب نیز به طور آزاد در دسترس قرار گرفت. پس از یک هفته عادت به وضعیت جدید، مطالعه روی موش ها انجام گردید. در این مطالعه، کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل های کار روی حیوانات آزمایشگاهی (مورد تأیید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز) لحاظ شد.

تعیین سمیت حاد*: برای تعیین سمیت حاد عصاره به دست آمده، ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۳۰۰ گرم و سن ۱۰ هفته در ۶ گروه چهار تایی توزیع گردید و عصاره الکلی زعفران با دوزهای ۵، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن و به شکل محلول در سالیین نرمال (۱۰ ml/kg) به صورت خوراکی به موش ها خورانده شد. سپس موش ها به مدت ۶ ساعت به فواصل یک ساعته و بالاخره در پایان ۲۴ ساعت از لحاظ رفتارهای ظاهری، علایم عصبی، میزان مصرف غذا، وضعیت مدفوع و ادرار و مرگ تحت نظر بودند. تعداد مرگ و میر بعد از ۲۴ ساعت اندازه گیری شد.

طرح آزمایش: مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده و در سال ۱۳۸۸ در مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام پذیرفته است. جامعه آماری این مطالعه شامل موش های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم و سن ۱۰ هفته می باشد. برای انجام این مطالعه نمونه ای به حجم ۴۰ سر موش صحرایی از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه و به طور تصادفی در ۵ گروه مساوی ۸ سری تقسیم شدند. گروه ۱ به عنوان شاهد سالم، نرمال سالیین را به میزان ۱۰ ml/kg دریافت کرد. گروه ۲ به عنوان شاهد مسموم، داروی ریفامپین را با دوز ۵۰۰ mg/kg دریافت کرد. گروه ۳ به عنوان کنترل مثبت، سیلیمارین را با دوز ۵۰۰ mg/kg همراه با ریفامپین (۵۰۰ mg/kg) دریافت کرد. گروه ۴ ریفامپین (۵۰۰ mg/kg) را همراه با عصاره الکلی کلالة زعفران به میزان ۴۰ mg/kg دریافت کرد. گروه ۵ ریفامپین (۵۰۰ mg/kg) را همراه با عصاره الکلی کلالة زعفران به میزان ۸۰ mg/kg دریافت کرد.

کلیه تیمارها از طریق خوراکی به شکل محلول در نرمال سالیین (۱۰ ml/kg)، به طور روزانه انجام و به مدت ۳۰ روز ادامه یافت. در پایان دوره آزمایش و ۲۴ ساعت پس از آخرین تیمار، هم زمان همه موش ها با ایجاد در رفتگی در مهره های گردن راحت کشتی شدند. کبد موش ها سرریعاً خارج و در سالیین بسیار سرد شستشو و هموژنات ۱۰٪ در ۱/۱۵ (w/v) کلرور پتاسیم تهیه گردید. هموژنات با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد و محلول شناور جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی از طریق اندازه گیری مقدار مالون دی آلدئید* و هم چنین برای اندازه گیری فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی سوپراکسید دسموتاز**، کاتالاز***، گلوکوتایون پراکسیداز**** و گلوکوتایون ردوکتاز***** مورد استفاده قرار گرفت.

الف) اندازه گیری مقدار مالون دی آلدئید: مالون دی آلدئید،

* Acute toxicity (Lethal Dose 50)

** Malondialdehyde

*** Superoxide dismutase

**** Catalase

***** Glutathione peroxidase

***** Glutathione reductase

***** Esterbauer

***** Cheesman

***** Nishikimi

***** Kakkar

***** Claiborne

دوزهای مختلف (۵، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰) عصاره الکلی کلاله زعفران در موش های صحرایی هیچ گونه اثر توکسیک و یا مرگی مشاهده نشد. در موش های تیمار شده با ریفامپین مقادیر آنزیم های سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز، در مقایسه با گروه شاهد، به طور معنی داری ($p < 0.001$) کاهش و میزان مالون دی آلدئید به طور معنی داری ($p < 0.001$) افزایش یافته بود. تیمار با دوز ۸۰ mg/kg عصاره الکلی کلاله زعفران و سیلیمارین مقادیر آنزیم های آنتی اکسیدانی فوق را که در اثر ریفامپین کاهش یافته بود، به طور معنی دار ($p < 0.001$) و تا حد طبیعی افزایش دادند. تغییرات فوق با دوز ۴۰ mg/kg عصاره الکلی کلاله زعفران نیز معنی دار ($p < 0.05$) بود، لکن این میزان مصرف عصاره هرگز نتوانست مقادیر آنزیم های مذکور را به حد طبیعی برساند. تیمار با دوز ۸۰ mg/kg عصاره و سیلیمارین مقدار افزایش یافته مالون دی آلدئید را در موش های تیمار شده با ریفامپین به طور معنی دار ($p < 0.001$) و تا حد نرمال کاهش داد. کاهش مالون دی آلدئید با دوز ۴۰ mg/kg عصاره الکلی کلاله زعفران نیز معنی دار ($p < 0.05$) بود، لکن این میزان مصرف عصاره هم چنان نتوانست مقدار مالون دی آلدئید را در موش های تیمار شده با ریفامپین به حد طبیعی خود برساند (جدول ۱).

جدول ۱: تاثیر عصاره الکلی کلاله زعفران و سیلیمارین بر فعالیت آنتی اکسیداتیوی کبد در آسیب ناشی از ریفامپین در موش صحرایی

گروه	تیمار	فراسنجه های بیوشیمیایی (انحراف استاندارد ± میانگین)			
		مالون دی آلدئید (nmol/g protein)	سوپراکسید دسموتاز (U/mg protein)	کاتالاز (U/mg protein)	گلوکاتایون پراکسیداز (U/mg protein)
۱	نرمال سالین	۳/۱۷±/۱۲ ^{bd}	۱۶/۸۳±/۷۳ ^{bd}	۶۸/۹۲±/۲۹ ^{bd}	۱۳/۱۸±/۹۳ ^{bd}
۲	ریفامپین	۴/۳۶±/۱۳ ^{cd}	۱۰/۸۹±/۵۶ ^{cd}	۴۲/۹۵±/۶۹ ^{cd}	۷/۳۴±/۷۵ ^{cd}
۳	ریفامپین + سیلیمارین	۳/۲۸±/۱۳ ^b	۱۵/۴۲±/۸۴ ^b	۶۲/۶۴±/۹۷ ^b	۱۲/۹۸±/۵۹ ^b
۴	ریفامپین + عصاره (۴۰)	۳/۷۵±/۱۴ ^{ab}	۱۳/۸۵±/۵۴ ^{ab}	۵۶/۱۷±/۶۳ ^{ab}	۱۰/۴۲±/۵۵ ^{ab}
۵	ریفامپین + عصاره (۸۰)	۳/۲۶±/۱۲ ^b	۱۵/۹۳±/۵۱ ^b	۶۴/۸۴±/۲۰ ^{ab}	۱۱/۴۵±/۵۴ ^b

آنالیز واریانس یک طرفه: df=۲۵/۴، p=۰/۰۰۰؛ F=۱۲/۸۳ (p<۰/۰۵)
 a: نشانگر اختلاف معنی دار با گروه ۱، b: نشانگر اختلاف معنی دار با گروه ۲، c: نشانگر اختلاف معنی دار با گروه ۳، d: نشانگر اختلاف معنی دار با گروه ۴، e: نشانگر اختلاف معنی دار با گروه ۵.

بحث

از آنجائی که هیچ گونه اثر توکسیک و یا مرگی با مصرف خوراکی دوزهای

* Rotruck
 ** Ethylenediamine tetra-acetic acid
 *** Sodium azide
 **** Mohandas
 ***** Statistical Package for Social Sciences
 **** One-way analysis of variance
 ***** Bonferroni

۱/۹۵ میلی لیتر بافر فسفات (۰/۰۵ M، pH=۷)، ۱ میلی لیتر پراکسید هیدروژن (۰/۰۱۹ M) و ۰/۰۵ میلی لیتر PMS (۱۰٪) در حجم نهایی ۳ میلی لیتر بود. تغییرات در جذب در ۲۴۰ nm اندازه گیری گردید. در نهایت نتیجه به شکل "فعالیت کاتالاز در دقیقه" محاسبه گردید.

اندازه گیری فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز: فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز با استفاده از روش روتروک* و همکاران (۲۴) و بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت.

(گلوکاتایون احیاء) $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$ (گلوکاتایون اکسید)
 گلوکاتایون پراکسیداز، در هموژنات بافتی، گلوکاتایون را اکسیده کرده که به طور هم زمان پراکسید هیدروژن به آب احیاء می گردد. این واکنش پس از ۱۰ دقیقه توسط تری کلرواستیک اسید متوقف و گلوکاتایون باقیمانده توسط محلول DTNB (Dithiobis nitrobenzoic acid) مجدداً فعال گردیده و منجر به تشکیل ترکیب رنگی می گردد که با اسپکتروفتومتر در ۴۲۰ nm اندازه گیری می شود. مخلوط واکنشگر متشکل از ۰/۲ میلی لیتر EDTA* ۰/۸ mM، ۰/۱ میلی لیتر آزید سدیم*** ۰/۱ mM، ۰/۱ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۰/۲ mM، ۰/۵ میلی لیتر هموژنات بود که در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد متوقف و لوله ها با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۳ میلی لیتر دی سدیم هیدروژن ۰/۸ mM و ۰/۱ میلی لیتر DTNB ۰/۴ درصد به محلول شناور افزوده شد و بلافاصله رنگ حاصله در ۴۲۰ nm اندازه گیری شد. فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز به صورت میکرومول گلوکاتایون اکسید/دقیقه/میلی گرم پروتئین بیان گردید.

اندازه گیری فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز: فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز با استفاده از روش مهندس**** و همکاران (۲۵) بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت.



در حضور گلوکاتایون ردوکتاز، گلوکاتایون اکسیده، احیاء گردیده و هم زمان، NADPH به $NADP^+$ اکسیده می شود. فعالیت آنزیم در دمای اتاق (r.t) توسط سنجش میزان ناپدید شدن NADPH/دقیقه در ۳۴۰ nm با اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید.

آنالیز آماری: برای تحلیل داده ها از بسته نرم افزاری SPSS***** ویرایش ۱۱۳ استفاده شد. داده های به دست آمده کمی، به صورت میانگین ± انحراف استاندارد ارائه و اختلاف معنی دار بین گروه ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه***** و آزمون تعقیبی بونفرونی***** مورد ارزیابی قرار گرفت. اختلافات در سطح $p < 0.05$ معنی دار تلقی شد.

یافته ها

در مرحله تعیین سمیت حاد عصاره الکلی کلاله زعفران، با مصرف خوراکی

آنتی‌اکسیدانی نیز منجر گردیده و بدین ترتیب ممانعت از تولید مفرط رادیکال‌های آزاد هم مقدور نخواهد بود. (۳۴)، به عبارتی دیگر افزایش میزان مالون دی‌آلدئید در کبد در اثر ریفامپین حاکی از افزایش پراکسیداسیون لیپیدی است که منجر به آسیب بافت کبد و هم چنین ناتوانی مکانیسم تدافعی آنتی‌اکسیدانی در ممانعت از تشکیل بی‌رویه رادیکال‌های آزاد می‌گردد.

سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلو‌تاتیون پراکسیداز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که یک سیستم تدافعی را علیه گونه‌های فعال اکسیژن یا (ROS) **** تشکیل داده‌اند. (۳۵)

کاهش فعالیت سوپراکسید دسموتاز شاخص حساس در مورد آسیب سلول‌های کبدی است. این آنزیم یکی از مهم‌ترین عوامل در سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی آنزیماتیک است. سوپراکسید دسموتاز آنیون سوپراکسید را از طریق تبدیل آن به پراکسید هیدروژن مورد زدايش قرار داده و بدین ترتیب اثرات توکسیک آن را کاهش می‌دهد. (۳۶)، در بررسی حاضر، میزان سوپراکسید دسموتاز در موش‌های تیمار شده با ریفامپین به دلیل تشکیل فراوان آنیون‌های سوپراکسید، به طور معنی‌داری کاهش یافت. هم‌چنین فعالیت آنزیم‌های زدايننده پراکسید هیدروژن یعنی کاتالاز و گلو‌تاتیون پراکسیداز نیز در این موش‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت. به نظر می‌رسد که غیرفعال شدن سوپراکسید دسموتاز توسط آنیون‌های افزایش یافته سوپراکسید، منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌های کاتالاز و گلو‌تاتیون پراکسیداز می‌شود. در مطالعه ما، مصرف عصاره زعفران مانع از کاهش سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلو‌تاتیون پراکسیداز شد که این ممکن است در اثر زدايش رادیکال‌ها توسط عصاره باشد که منجر به حفظ و بقاء این آنزیم‌ها شده است.

کاتالاز آنزیم آنتی‌اکسیدانی است که در بافت‌های حیوانی به طور گسترده‌ای منتشر می‌شود و دارای بیشترین فعالیت در کبد و گلبول‌های قرمز است. کاتالاز پراکسید هیدروژن را تجزیه می‌کند و باعث محافظت بافت‌ها از رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل می‌شود. (۳۷)، بنابراین کاهش فعالیت کاتالاز ممکن است منجر به برخی اثرات مخرب ناشی از رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن گردد.

گلو‌تاتیون ردوکتاز يك آنزیم سیتوزولی کبدی است که در کاهش گلو‌تاتیون اکسید (GSSG) - به عنوان محصول نهایی فعالیت گلو‌تاتیون پراکسیداز بر روی گلو‌تاتیون احیاء (GSH) - دخیل است. (۳۸)، در مطالعه ما، متعاقب تیمار با ریفامپین کاهش قابل توجهی در میزان گلو‌تاتیون پراکسیداز حاصل می‌شود که منجر به دسترس گلو‌تاتیون ردوکتاز به سوبسترا شده و بدین

* Tasduq
** Santhosh
*** Prabakan
**** Biotransformation
***** Reactive oxygen species

مختلف (۵ mg/kg، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰) عصاره الکلی کلالة زعفران در موش‌های صحرایی مشاهده نشد، بنابراین مقادیر مصرف مورد نظر عصاره فوق (دوزهای ۴۰ و ۸۰ mg/kg) برای مطالعات بعدی بی‌خطر و مناسب شناخته شد. برخی از داروها، مواد شیمیایی و ویروس‌ها باعث آسیب شدید کبد و نکروز آن می‌گردند که درمان آن بسیار مشکل و گاهی اوقات امکان‌ناپذیر است، لذا داروها و موادی که بتوانند باعث پیشگیری و یا درمان نارسایی کبد شوند، بسیار ارزشمندند. (۲۶)

بررسی حاضر، همان‌طور که قبلاً نیز به آن اشاره شد، اولین مطالعه‌ای است که در آن به بررسی اثرات محافظت کبدی عصاره الکلی کلالة زعفران در برابر اثرات توکسیک ریفامپین پرداخته شده است. در این مطالعه، مصرف ریفامپین از طریق خوراکی با دوز ۵۰۰ mg/kg در مدت ۳۰ روز باعث آسیب شدید کبد شد به طوری که افزایش قابل توجه میزان مالون دی‌آلدئید و کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلو‌تاتیون پراکسیداز و گلو‌تاتیون ردوکتاز را به همراه داشت. نتایج بررسی حاضر از این لحاظ با یافته‌های تاسدوک* و همکاران، سانتوش** و همکاران و پراباکان*** و همکارانش هم‌خوانی دارد. (۲۹-۲۷)، لازم به ذکر است که این میزان مصرف داروی ریفامپین بسیار بیشتر از دوز مصرف آن در درمان موارد بالینی بیماری سل در انسان می‌باشد، چرا که در حیواناتی نظیر موش‌های صحرایی که دارو را به سرعت متابولیزه می‌کنند، دوزهای بالاتر مورد نیاز است. (۳۰)

ریفامپین یک القاء کننده قوی سیستم سیتوکروم P450 است که تولید متابولیت‌های سمی داروها و اتصال کووالان آنها به ماکرومولکول‌های کبدی را سبب می‌گردد. (۳۱)، به عبارتی دیگر، بیوترانسفورماسیون**** ریفامپین به متابولیت‌های فعال که قادر به اتصال به ماکرومولکول‌های سلول‌های کبدی هستند، منجر به آسیب کبد می‌شود. (۳۲)، تحقیقات نشان داده است که استرس اکسیداتیو مکانیسم اصلی ریفامپین در ایجاد اثرات توکسیک در کبد موش‌های صحرایی است. (۳۳)، یافته‌های مطالعه حاضر الگوی فوق را مورد تأیید قرار می‌دهد به طوری که، در بافت کبد موش‌های گروه دریافت کننده ریفامپین (گروه ۲) افزایش معنی‌داری در میزان پراکسیداسیون لیپیدی مشاهده شد که این خود در راستای کاهش معنی‌دار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد مطالعه بود.

در این مطالعه به نظر می‌رسد که رادیکال‌های آزاد حاصل از واکنش متابولیت‌های ریفامپین با اکسیژن یا واکنش رادیکال‌های سوپراکسید با پراکسید هیدروژن باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و هم‌چنین اسیدهای چرب غیر اشباع توری داخل سیتوپلاسمی گردیده است که منجر به تشکیل پراکسیدهای لیپیدی (مالون دی‌آلدئید) و از بین رفتن تمامیت غشاء سلول و در نهایت آسیب کبد شده است. افزایش میزان مالون دی‌آلدئید در موش‌های تیمار شده با ریفامپین، نشان دهنده افزایش واکنش‌های پراکسیداسیونی است که به ضعف مکانیسم‌های تدافعی

محافظت کبد در مقابل آسیب اکسیداتیوریفامپین وابسته به دوز بوده و با دوز 80mg/kg نتیجه بهتری حاصل می گردد.

نتیجه گیری

نتایج بررسی حاضر اثرات مفید فارماکولوژیکی عصاره زعفران را در مقایسه با سیلیمارین در برابر سمیت کبدی ریفامپین نشان می دهد که پس از انجام کارآزمایی های شاهد اترفاقی و حصول نتایج مثبت می تواند به عنوان یک داروی گیاهی با خواص آنتی اکسیدانی، به صورت مکمل و افزودنی غذایی و یا از طریق صنایع داروسازی جهت پیشگیری از آسیب های کبدی ناشی از استرس اکسیداتیو متعاقب درمان با ریفامپین در مورد انسان مورد استفاده قرار گیرد. لکن، تعیین تاثیر دوزهای مختلف عصاره و شناخت دقیق مکان و مکانیسم یا مکانیسم های مولکولی و سلولی موثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن نیاز به مطالعات آتی دارد.

سپاسگزاری

مولفین مراتب سپاس خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز و مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز ابراز می دارند.

* Naik
** Panda
*** Ginkgo biloba L
**** Ramakrishnan
***** Pradeep

REFERENCES

- Gajalkshmi V, Peto R, Kanaka TS, Jha P. Smoking and mortality from tuberculosis and other diseases in India: retrospective study of 43000 adult male deaths and 35000 controls. *Lancet* 2003;362:507-15.
- Parathasarathy R, Sarma GR, Janardhanam B, Ramachandran P, Santha T, Sivasubramanian S, et al. Hepatic toxicity in South Indian patients during treatment of tuberculosis with short-course regimens containing isoniazid, rifampicin and pyrazinamide. *Tubercle* 1986;67:99-108.
- Steele MA, Burk RF, Desprez RM. Toxic hepatitis with isoniazid and rifampin. A meta-analysis. *Chest* 1991;99:465-71.
- Bachs L, Pares A, Elena M, Piera C, Rodes J. Effects of long-term rifampicin administration in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1992;102:2077-80.
- Sodhi CP, Rana SF, Attri S, Mehta S, Yaiphei K, Mehta SK. Oxidative-hepatic injury of isoniazid-rifampicin in young rats subjected to protein and energy malnutrition. *Drug Chem Toxicol* 1998;21:305-17.
- Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp Biol Med* 2002;227:20-5.
- Abe K, Saito H. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. *Phytother Res* 2000;14:149-52.
- Rios JL, Recio MC, Giner RM, Manez S. An update review of saffron and its active constituents. *Phytother Res* 1996;10:189-93.
- Soeda S, Ochiai T, Paopong L, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced cell death of neuronally differentiated PC-12 cells. *Life Sci* 2001;69:2887-98.
- Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ziaee T, Danaee A. Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. *J Pharm Pharm Sci* 2005;8:387-93.
- Giaccio M. Crocetin from saffron: An active component of an ancient spice. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004;44:155-72.
- El Daly ES. Protective effect of cysteine and vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced

- toxicity in rats. *J Pharm Belg* 1998;53:87-95.
13. El-Samaly MS, Afifi NN, Mahmoud EA. Evaluation of hybrid liposomes-encapsulated silymarin regarding physical stability and in vivo performance. *Int J Pharm* 2006;319:121-9.
 14. Stickel F, Schuppan D. Herbal medicine in the treatment of liver diseases. *Dig Liver Dis* 2007;39:293-304.
 15. Dhiman RK, Chawla YK. Herbal medicines for liver diseases. *Dig Dis Sci* 2005;50:1807-12.
 16. Gupta YK, Sharma M, Chaudhary G. Pyrogallol-induced hepatotoxicity in rats: a model to evaluate antioxidant hepatoprotective agents. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2007;24:497-500.
 17. Gupta YK, Sharma M, Chaudhary G, Katiyar CK. Hepatoprotective effect of New Livfit, a polyherbal formulation, is mediated through its free radical scavenging activity. *Phytother Res* 2004;18:362-4.
 18. Upadhyay G, Kumar A, Singh, MP. Effect of silymarin on pyrogallol- and rifampicin-induced hepatotoxicity in mouse. *Eur J Pharmacol* 2007;565:190-201.
 19. Mohajeri D, Mousavi Gh, Mesgari M, Doustar Y, Khayat Nouri MH. Subacute toxicity of Crocus sativus L. (saffron) stigma ethanolic extract in rats. *Am J Pharm & Toxicol* 2007;2:189-93.
 20. Esterbauer H, Cheesman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186:407-21.
 21. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 1972;46:849-54.
 22. Kakkar P, Das B, Viswanathan PN. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian J Biochem Biophys* 1984;21:130-2.
 23. Claiborne A. Catalase activity. In: Boca Raton FL, editor. CRC Handbook of methods for oxygen radical research. Florida: CRC Press, Boca Raton; 1985.P.283-4.
 24. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973;179:588-90.
 25. Mohandas J, Marshall JJ, Duggin GG, Horvath JSL, Tiller DG. Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. *Cancer Res* 1984;44:5086-91.
 26. Shena X, Tang Y, Yang R, Yu L, Fang T, Duan JA. The protective effect of Zizyphus jujube fruit on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in mice by anti-oxidative activities. *J Ethnopharmacol* 2009;122:555-60.
 27. Tasduq SA, Peerzada K, Koul S, Bhat R, Johri RK. Biochemical manifestations of anti-tuberculosis drugs induced hepatotoxicity and the effect of silymarin. *Hepatol Res* 2005;31:132-5.
 28. Santhosh S, Sini TK, Anandan R, Mathew PT. Hepatoprotective activity of chitosan against isoniazid and rifampicin-induced toxicity in experimental rats. *Eur J Pharmacol* 2007;572:69-73.
 29. Prabakan M, Anandan R, Devaki T. Protective effect of Hemidesmus indicus against rifampicin and isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia* 2000;71:55-9.
 30. Pellikan EW. Toxicity in chemotherapy. In: Schmitzer RJ, Hawking F, editors. Experimental Chemotherapy. New York: Academic Press;1963.P.25.
 31. Powell-Jackson PR, Tredger JM, Smith HM, Davis M, Williams R. Effect of isoniazid administration on selected rat and mouse hepatic microsomal mixed-function oxidases and in vitro [14C]acetylhydrazine-derived covalent binding. *Biochem Pharmacol* 1982;31:4031-4.
 32. Georgieva N, Gadjeva V, Tolekova A. New isonicotinoylhydrazones with SSA protect against oxidative-hepatic injury of isoniazid. *TJS* 2004;2:37-43.
 33. Attri S, Rana SV, Vaiphei K, Sodhi CP, Kaytal R, Goel RC, et al. Isoniazid and rifampicin induced oxidative hepatic injury protection by N-acetylcysteine. *Hum Exp Toxicol* 2000; 19:517-22.
 34. Naik SR. Antioxidants and their role in biological functions: An overview. *Indian Drugs* 2003;40:501-16.
 35. Lil JL, Stantman FW, Lardy HA. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 1988;263:150-6.
 36. Curtis SJ, Mortiz M, Sondgrass PJ. Serum enzyme derived from liver cell fractions. The response of carbon tetrachloride intoxication in rats. *Gastroenterology* 1972;62:84-92.
 37. Chance B, Greenstein DS, Roughton RJW. The mechanism of catalase action. I. Steady-state analysis. *Arch Biochem Biophys* 1952;37:301-39.
 38. Naik SR, Panda VS. Hepatoprotective effect of Ginkgoselect Phytosome in rifampicin induced liver injury in rats: evidence of antioxidant activity. *Fitoterapia* 2008;79:439-45.
 39. Ochiai T, Soeda S, Ohno S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin prevents the death of PC-12 cells through sphingomyelinase-ceramide signaling by increasing glutathione synthesis. *Neurochem Int* 2004;44:321-30.
 40. Ochiai T, Ohno S, Soeda S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno Y. Crocin prevents the death of rat pheochromocytoma (PC12) cells by its antioxidant effects stronger than those of α -tocopherol. *Neurosci Lett* 2004;362:61-4.
 41. Soeda S, Ochiai T, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno Y. Prevention of ischemic neuron death by a saffron's carotenoid pigment crocin and its mechanism of action. In: Coleman RM, ed. Focus on Neurochemistry Research. NY: Nova Science Publishers; 2005:139-56.
 42. Ochiai T, Shimeno H, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanaka H, et al. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General subjects* 2007;1770:574-84.
 43. Ramakrishnan G, Raghavendran HR, Vinodhkumar R, Devaki T. Suppression of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats. *Chem Biol Interact* 2006;161:104-14.
 44. Pradeep K, Mohan CVR, Gobianand K, Karthikeyan S. Silymarin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. *Euro J Pharmacol* 2007;560:110-6.

Antioxidant Activity of Ethanolic Extract of *Crocus sativus* L. (Saffron) stigma Against Rifampin Induced Hepatotoxicity

Mohajeri D¹, Doustar Y², Rahmani J³

¹ Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Iran

² Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Iran

³ Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Iran

ABSTRACT

Background: Tuberculosis continues to be a common health problem worldwide. Rifampin, an antibiotic used routinely for tuberculosis chemotherapy is documented to be a potent hepatotoxicant. The aim of the present study was to assess the antioxidant activity of ethanolic extract of *Crocus sativus* L. stigma (EECSL.S) against rifampin induced hepatotoxicity in the rats.

Materials and Methods: Male Wistar rats were randomly assigned into 5 groups of 8 animals each. Group I served as normal control and received normal saline (10 ml/kg). Group II served as toxicant control and received rifampin (500 mg/kg). The reference drug silymarin (50 mg/kg), EECSL.S at 40 mg/kg and EECSL.S at 80 mg/kg were administered to the groups III-V, respectively. These three groups received rifampin (500 mg/kg) too. All treatments were administered by P.O. route dissolving in 10 ml/kg normal saline daily for 1 month. At the end of experiment, product of lipid peroxidation (MDA), activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR) were assayed in liver homogenates to evaluate antioxidant activity. Significant differences among the groups were determined by one-way analysis of variance followed by Bonferroni post-test. Statistical significance was considered at $p < 0.05$.

Results: In rifampin-treated rats, EECSL.S (40 and 80 mg/kg) and silymarin significantly decreased the lipid peroxidation and elevated the levels of antioxidant enzymes, in a dose dependent manner.

Conclusion: The present findings suggest that the hepatoprotective effect of *Crocus sativus* L. stigma in rifampin induced oxidative damage may be related to its antioxidant and free radical scavenging activity.

Keywords: *Crocus sativus* L, Rifampin, Hepatotoxicity, Antioxidant, Rat.

Govaresh/ Vol. 14, No.4, Winter 2010; 211-218

Corresponding author:

Daryoush Mohajeri, MD

Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran

Tel: +98 411 6372274 Fax: +98 411 6373935

E-mail: daryoushmohajeri@yahoo.com

Received: 16 Feb. 2010 Edited: 18 May 2010

Accepted: 20 May 2010