مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی چهاردهم، شماره‌ی ۴، صفحه‌های ۳۷۴ ـ ۳۶۸ (آبان ۱۳۹۱)

Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 2:39 +0430 on Tuesday March 26th 2019

مقاله‌ی پژوهشی

بررسی نقش کمپلکس‌های منگنز سالن (Mn-salens) در پیشگیری از استئاتوهپاتیت غیرالکلی القا شده در مدل حیوانی

علیرضا رضازاده[۱]، راضیه یزدان‌پرست[۱]، مهسا مولائی[۲]

۱) مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، ۲) مرکز تحقیقات گوارش و بیماری‌های کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول**: مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۳۸۴-۱۳۱۴۵، راضیه یزدان‌پرست؛ e-mail: yazdan@ibb.ut.ac.ir

چکیده

مقدمه: استئاتوهپاتیت غیر الکلی به عنوان یکی از مراحل کبد چرب و با نشانه‌های بیماری‌شناسی میکرو و ماکرووزیکولار استئاتوز، التهاب، بالونینگ، نکروز، اجسام مالوری و فیبروز در افراد بدون سابقه‌ی مصرف معنی‌دار الکل مشاهده می‌شود. استرس اکسیداتیو در بیماری‌زایی و پیشرفت استئاتوهپاتیت نقش مهمی ایفا می‌نماید. پژوهش کنونی با هدف بررسی اثر آنتی‌اکسیدان‌های کاتالیزوری (دو کمپلکس منگنز سالن) در پیشگیری از بروز استئاتوهپاتیت غیر الکلی در حیوانات آزمایشگاهی، تحت تاثیر رژیم غذایی القاکننده‌ی بیماری، صورت پذیرفت. مواد و روش‌ها: استئاتوهپاتیت با تغذیه‌ی موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد N-Mary با رژیم غذایی بدون متیونین و کولین به مدت ۱۴ هفته ایجاد شد. موش‌های صحرایی به طور تصادفی ویتامین C، EUK-8، EUK-134 (۳۰ میلی‌گرم/روز/کیلوگرم وزن) به صورت دهانی، دریافت کردند. در پایان آزمایش بررسی بیوشیمیایی خون و ارزیابی بافت شناسی کبد انجام شد. یافته‌ها با نرم‌افزار SPSS تحلیل و مقادیر با P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. یافته‌ها: تیمار موش‌های صحرایی با ترکیبات منگنز سالن و ویتامین C هم‌زمان با مصرف رژیم غذایی القا کننده‌ی استئاتوهپاتیت، به طور معنی‌داری میزان کلسترول، گلوکز و فعالیت آنزیم‌های آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز سرم را کاهش داد. میزان پراکسیداسیون لیپید و محتوای کربونیل پروتئین نیز به طور معنی‌داری کاهش یافت. در حالی‌که میزان وزن و کلسترول ـ HDL افزایش داشت. به علاوه تیمار با این ترکیبات سبب بهبود نشانه‌های پاتولوژی بیماری گردید. نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر به نظر می‌رسد کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها و کمپلکس‌های منگنزسالن در پیشگیری از استئاتوهپاتیت غیر الکلی، کاهش گلوکز و لیپید خون موثر می‌باشد.

واژگان کلیدی: استئاتوهپاتیت غیر الکلی، آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک، استرس اکسیداتیو، رژیم غذایی فاقد متیونین و کولین، EUK-8، EUK-134

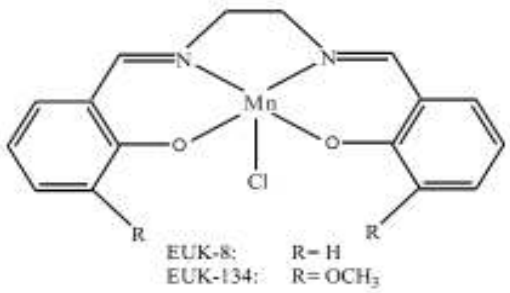
دریافت مقاله: ۹۰/۶/۲۷ـ دریافت اصلاحیه: ۹۰/۱۲/۲۱ ـ پذیرش مقاله: ۹۱/۲/۱۳

مقدمه

بیماری کبد چرب طیفی از آسیب‌های کبدی از تجمع تری‌گلیسرید در هپاتوسیت‌ها (استئاتوز ساده) تا استئاتوهپاتیت، فیبروز و سیروز کبدی را شامل می‌شود. بیماری کبد چرب به عنوان تظاهر کبدی سندرم متابولیک مطرح است که به همراه مقاومت به انسولین، فشار خون بالا، افزایش تری‌گلیسرید، و چربی خون بروز پیدا می‌نماید.[۱] امروزه به دلیل مصرف غذاهای پرکالری و کم‌تحرکی میزان مبتلایان به این بیماری رو به افزایش است. شیوع کبد چرب

Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 2:39 +0430 on Tuesday March 26th 2019

و استئاتوهپاتیت غیرالکلی در جمعیت عمومی به ترتیب حدود ۲۰-۳۰٪ و ۴-۶٪ تخمین زده می‌شود.[۲] بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH) به عنوان یکی از مراحل این بیماری در افراد بدون سابقه‌ی مصرف معنی‌دار الکل، مشاهده می‌گردد.[۳] نشانه‌های بیماری‌شناسی این بیماری شامل میکرو و ماکرووزیکولار استئاتوز، التهاب، بالونینگ، نکروز، اجسام مالوری و فیبروز می‌باشد.[۳] به طور معمول در افراد مبتلا به این بیماری، میزان آنزیم‌های آمینوترانسفراز خون مانند آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) بالاتر از حد طبیعی است. در حال حاضر ساز و کار پیشرفت استئاتوز ساده به استئاتوهپاتیت به درستی مشخص نیست، اما براساس فرضیه‌ی شوک دو گانه‌ی ارایه شده توسط Day و James، تجمع چربی و مقاومت به انسولین به عنوان اولین شوک، هپاتوسیت‌ها را به شوک(های) دوم شامل استرس اکسیداتیو، سیتوکین‌ها و پراکسیداسیون لیپید حساس می‌نمایند که در نهایت منجر به آسیب‌های جدی کبدی مانند التهاب و فیبروز می‌گردد.[۴۵] با فرض دخالت استرس اکسیداتیو در پیشرفت بیماری کبد چرب به مرحله استئاتوهپاتیت،[۶] استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان یک استراتژی درمانی مورد توجه قرار گرفته است.[۷] علاوه بر استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مانند ویتامین C و E ، بکارگیری آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک به منظور درمان بیماری‌ها رو به افزایش است. آنتی‌اکسیدان‌های کاتالیزوری دسته‌ای از این ترکیبات به شمار می‌روند. تاکنون تعدادی از این مواد ساخته شده و برای درمان بیماری‌ها با منشا استرس اکسیداتیو مورد آزمایش قرار گرفته‌اند، که از آن جمله می‌توان به کمپلکس‌های فلزی سالن، نیتروکسیدها و متالوپورفیرین‌ها اشاره نمود.[۸] کمپلکس‌های منگنز سالن[i] به دلیل شباهت ساختاری به جایگاه فعال آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، دارای فعالیت پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتازی هستند. عمده‌ترین برتری این ترکیبات نسبت به مشابه‌های پروتئینی، دسترسی زیستی بالا و پایداری بیشتر است.[۹] تاکنون چندین ترکیب از کمپلکس‌های منگنز سالن ساخته شده است. EUK-8 وEUK-134 دو عضو از این خانواده و دارای خاصیت سوپراکسید دیسموتازی مشابه می‌باشند، در حالی‌که فعالیت کاتالازی EUK-134 تقریبا دو برابر EUK-8 می‌باشد (شکل ۱).[۱۰] ویژگی‌های آنزیمی و پایداری مناسب، سبب استفاده از کمپلکس‌های منگنز سالن در بررسی‌ها شده است. کاربرد این ترکیبات در چندین پژوهش پیرامون بیماری‌های مربوط به استرس اکسیداتیو، نتایج خوبی به همراه داشته است.[۱۰]



شکل۱- ساختار شیمیایی EUK-8 و EUK-134.

به منظور بررسی کبد چرب، مدل‌های حیوانی متعددی وجود دارد. استفاده از رژیم غذایی فاقد متیونین و کولین[ii] (MCD) یکی از این مدل‌هاست که تظاهرات استئاتوهپاتیت القا شده توسط آن با نوع انسانی بیماری شباهت زیادی دارد.[۱۱] به دلیل فقدان کولین و متیونین در این رژیم، حیوانات آزمایشگاهی تغذیه شده با آن، توانایی سنتز فسفاتیدیل کولین و در نتیجه خروج تری‌گلیسرید از کبد را از دست خواهند داد، که در نهایت منجر به استئاتوز کبدی می‌شود. این رژیم به طور قابل ملاحظه‌ای میزان گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه استرس اکسیداتیو را بالا می‌برد.[۱۲] بنابراین استفاده از این رژیم غذایی برای بررسی نقش استرس اکسیداتیو در بیماری‌زایی استئاتوهپاتیت و تاثیر آنتی‌اکسیدان‌ها مناسب به نظر می‌رسد.

در پژوهش حاضر، اثر ترکیبات آنتی‌اکسیدان ویتامین C، EUK-8 وEUK-134 بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم و پاتولوژیکی کبد در مدل حیوانی استئاتوهپاتیت مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

موش‌های نر بالغ نژاد N-Mary با محدوده‌ی وزنی ۲۰۰-۲۵۰ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری و در شرایط

i- salen= bis(salicylaldehyde)ethylenediamine

ii- Methionine - choline deficient

Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 2:39 +0430 on Tuesday March 26th 2019

آزمایشگاهی مناسب با درجه حرارت حدود ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، و رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰٪ نگه‌داری شدند. در طول مدت آزمایش، حیوانات همواره به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. به منظور القا بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی، از رژیم غذایی فاقد متیونین و کولین استفاده گردید.[۱۲] مدت انجام آزمایش ۱۴ هفته بوده است. دو کملپکس منگنز سالن به نام های EUK-8 وEUK-134 بر اساس روش‌های یاد شده در منابع سنتز گردید.[۱۰] از ویتامین C نیز به عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد استفاده شد. حیوانات مورد پژوهش به طور تصادفی به ۵ گروه شش تایی تقسیم شدند. گروه اول: موش‌های صحرایی سالم (شاهد) تغذیه شده با غذای طبیعی؛ گروه دوم: موش‌های صحرایی تغذیه شده با رژیم غذایی MCD؛ گروه‌های سوم، چهارم و پنجم: موش‌های صحرایی تغذیه شده با رژیم غذایی MCD که به طور روزانه و به ترتیب EUK-8، EUK-134 و ویتامین C به میزان ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت دهانی دریافت کرده‌اند. تمام ترکیبات به شکل تازه در آب مقطر حل گردید. در ابتدا و انتهای پژوهش، موش‌های صحرایی برای بررسی تغییرات وزن، توزین شدند. پس از گذشت ۱۴ هفته، حیوانات را که به مدت ۱۲ ساعت ناشتا بودند، با استفاده از اتر بیهوش نموده و کبدشان برای انجام بررسی‌های پاتولوژی جدا گردید. هم‌چنین پس از خون‌گیری از قلب، سرم به منظور اندازه‌گیری‌های بیوشیمیایی و نشان‌گرهای آسیب کبدی جداسازی شد. به منظور انجام بررسی‌های پاتولوژیک، بلافاصله پس جداسازی کبدها، تکه‌ای از آن‌ها در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده، و پس از پردازش بافتی، از آن‌ها بلوک‌های پارافینی تهیه شد. برش‌های چهار میکرونی تهیه شده از بافت‌های قالب‌گیری شده با پارافین، با هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) و ماسون تری کروم رنگ‌آمیزی گردیدند. تمام نمونه‌ها توسط یک آسیب‌شناس مورد ارزیابی قرار گرفت. در شروع و پایان مداخله، میزان قند خون ناشتا با استفاده از روش کالری‌متری آنزیمی با گلوکز اکسیداز اندازه‌گیری شد. سطح کلسترول تام (TC) سرم با استفاده از روش کالری‌متری آنزیمی با آنزیم کلسترول استراز و کلسترول اکسیداز مورد سنجش قرار گرفت. غلظت کلسترول ـ HDL سرم توسط رسوب لیپوپروتئین‌های حاوی آپولیپوپروتئین B با اسید فسفوتنگستیک و غلظت تری‌گلیسرید (TG) با روش کالری‌متری آنزیمی و آنزیم گلیسرول فسفات اکسیداز اندازه‌گیری شد. تمام اندازه‌گیری‌های عنوان شده به صورت دستی و با استفاده از کیت‌های تجاری مربوط (پارس آزمون ـ ایران) و دستگاه اسپکتروفتومتر CARRY-100 انجام گرفت. فعالیت آنزیم‌های آلانین ترانس آمیناز (ALT)، آسپارتات ترانس آمیناز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و گاما گلوتامیل ترانسفراز (GGT) در سرم نیز با استفاده از کیت‌های مربوط پارس آزمون (ایران) براساس دستورالعمل کیت، مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

ضریب تغییرات درون و برون آزمونی به ترتیب ۳/۸ و ۴/۵٪ برای قند خون ناشتا، ۴/۶ و ۴/۷٪ برای کلسترول تام، ۴/۱ و ۶/۵٪ برای کلسترول ـ HDL، ۳/۳ و ۵/۷٪ برای تری‌گلیسرید، ۲/۹ و ۴/۵٪ برای ALT، ۴/۴ و ۵/۶٪ برای AST، ۴/۹ و ۶/۶٪ برای ALP و ۴/۳ و ۵/۹٪ برای GGT بود.

به منظور بررسی تاثیر استرس اکسیداتیو بر سلول‌های کبد، میزان پراکسیداسیون لیپید و اکسیداسیون پروتئین هموژنه‌های کبد اندازه‌گیری شد. برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپید، از روش اندازه‌گیری مواد واکنش‌دهنده با تیوباربیتوریک اسید (TBARS) به عنوان شاخصی از تولید مالون‌دی‌آلدهید (MDA) استفاده گردید. به طور کلی به ۰/۵ میلی‌لیتر از هر کدام از نمونه‌های هموژنه‌ی کبدی، ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواسیداستیک (W/V,10%) اضافه، و به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس نمونه‌ها با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به دو میلی‌لیتر از سوپرناتانت، ۱ میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید (TBA) (W/V,67%) اضافه گردید. هر لوله به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش گذاشته شد و بعد از خنک شدن در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر در مقابل محلول بلانک به وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر CARRY-100 قرائت شد. غلظت MDA بر اساس ضریب جذب مولی کمپلکس TBA-MDA ($\varepsilon=1/56\times10^{5}$) محاسبه، و به صورت نانومول به ازای هر میلی‌گرم بافت بیان گردید.[۱۳]

مقدار اکسیداسیون پروتئین سلول‌های کبدی از راه سنجش میزان محتوی کربونیل پروتئین و بر اساس روش 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۲۰ نانومتر بررسی (اسپکتروفتومتر CARRY-100) و محاسبات بر اساس ضریب جذب مولی DNPH ($\varepsilon=2/2\times10^{4}$) انجام شد.[۱۴]

Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 2:39 +0430 on Tuesday March 26th 2019

تمام داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه واریانس یک طرفه قرار گرفت و مقایسه‌ی میانگین با استفاده از روش دانکن در سطح آماری P<۰/۰۵ انجام شد.

یافته‌ها

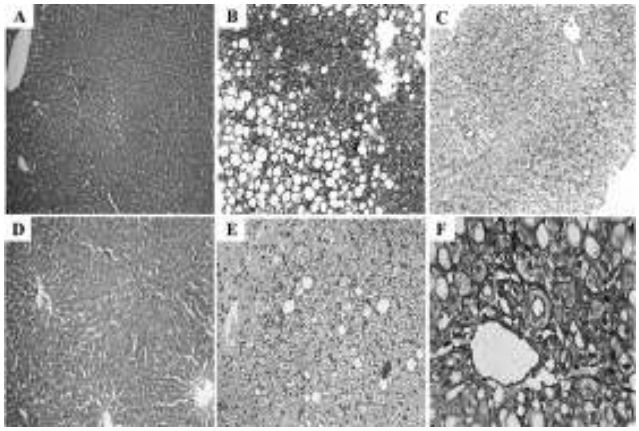
از نظر وزن، قبل از انجام آزمایش‌ها تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها وجود نداشت. تغییرات وزن موش‌ها طی ۱۴ هفته آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- تغییرات وزن حیوانات در گروه‌های مورد مطالعه، قبل و بعد از مداخله*

گروه	وزن (گرم)	
	قبل از مداخله	بعد از مداخله
سالم	۲۶۵±۲۵	۳۱۰±۲۸
NASH	۲۴۱±۲۰	۲۱۲±۲۱†
EUK-8	۲۵۱±۲۵	۲۷۶±۱۹‡
EUK-134	۲۵۹±۲۲	۲۹۸±۲۵‡
Vit. C	۲۴۲±۳۱	۲۶۱±۲۳‡

*تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۶ عدد است ومقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.† P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه سالم و ‡ P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه NASH.

موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی MCD، کاهش ۱۰ درصدی وزن نسبت به موش‌های سالم نشان دادند. در حالی‌که تیمار موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی MCD با EUK-8، EUK-134 و ویتامین C وزن را به طور معنی‌داری افزایش داد، و تاثیر ترکیبات منگنز سالن بر افزایش وزن از ویتامین C بیشتر بود (P<۰/۰۵). یافته‌های بررسی‌های پاتولوژی، حاکی از بهبود تظاهرات بیماری استئاتوهپاتیت در موش‌های تیمار شده با آنتی‌اکسیدان‌ها است (شکل ۲). نمونه‌های کبد موش‌های سالم هیچ‌گونه استئاتوز، التهاب و یا فیبروز را نشان ندادند (شکل ۲A). در حالی‌که در موش‌های تغذیه شده با غذای بدون متیونین و کولین، استئاتوز، التهاب و بالونینگ مشاهده می‌گردد (شکلB ۲). در مقایسه با گروه اخیر، تیمار با هر یک از سالن‌ها (EUK-8، EUK-134) بافت کبد را بهبود داد (شکل ۲ به ترتیب C، D). در گروه تیمار شده با ویتامین C ماکرواستئاتوز موضعی بدون التهاب دیده گردید (شکل ۲E).



شکل۲- ارزیابی پاتولوژی نمونه‌های کبد. فتوگراف بافت‌ها بعد از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین-ائوزین (A-E) و ماسون تریکروم (F). شکل A) کبد موش صحرایی گروه سالم، B) نمونه‌ی بافت کبد موش صحرایی تغذیه شده با غذای MCD: بالونینگ، استئاتوز ماکروویکولار و التهاب لوبلار. C) تیمار با EUK-8 در گروه تغذیه شده با غذای MCD: بدون نشانه‌های مشخص التهاب و استئاتوز . D) تیمار با EUK-134 در گروه تغذیه شده با غذای MCD: بدون نشانه‌های مشخص التهاب و استئاتوز. E) تیمار با ویتامینC در گروه تغذیه شده با غذای MCD: استئاتوز ماکروویکولار موضعی. F) فیبروز مشخصی در موش‌های صحرایی تغذیه شده با غذای MCD مشاهده نشد.

قبل از مداخله تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها از نظر میزان قند خون ناشتا و شاخص‌های لیپیدی وجود نداشت (جدول ۲). یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد میزان قند خون ناشتا در گروه سالم و NASH به ترتیب ۱۱۵/۴±۷/۵ و ۲۴۵/۲±۵/۱ بود. در حالی‌که تیمار موش‌های مبتلا به NASH با EUK-8، EUK-134 و ویتامین C سبب کاهش معنی‌داری در این شاخص گردید (به ترتیب ۱۶۷/۳±۴/۶، ۱۵۷/۶±۵/۵ و ۱۸۴/۲±۶/۲). غلظت کلسترول در گروه NASH (۹۸/۳±۴/۷) در مقایسه با گروه سالم (۶/۷ ± ۷۵/۳)، به طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). تیمار EUK-8، EUK-134 و ویتامین C این مقدار را به ترتیب تا غلظت ۷۷/۹±۵/۴، ۸۱/۲±۵/۵ و ۸۸/۲±۳/۴ کاهش داد. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد در موش‌های مبتلا به NASH، در مقایسه با موش‌های سالم، سطح تری‌گلیسرید و کلسترول ـ HDL سرم در گروه مبتلا به NASH به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری نسبت به گروه سالم داشته، در حالی‌که در گروه‌های تیمار شده با آنتی‌اکسیدان، به طور معنی‌داری میزان تری‌گلیسرید و کلسترول ـ HDL بهبود یافته است (P<۰/۰۵).

Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 2:39 +0430 on Tuesday March 26th 2019

جدول ۳ نشان می‌دهد قبل از مداخله‌ی میانگین فعالیت آنزیم‌های کبدی سرم بین گروه‌های مورد پژوهش تفاوت معنی‌داری نداشت. در پایان هفته چهاردهم، در موش‌های تغذیه شده با MCD، در مقایسه با گروه سالم، میزان فعالیت سرمی آنزیم‌های ALT،AST،ALP وGGT به طور چشمگیری افزایش داشت. تیمار موش‌های مبتلا به استئاتوهپاتیت با EUK-8، EUK-134 و ویتامین C، میزان فعالیت سرمی آنزیم‌های مورد اشاره را به طور معنی‌داری کاهش داده است (P<۰/۰۵). میزان تاثیر EUK-8 و EUK-134 در مقایسه با ویتامین C، فقط در کاهش فعالیت آنزیم‌های ALT و ALP معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵). هم‌چنین، در مورد آنزیم AST فقط تفاوت تاثیر EUK-8 و ویتامین C از لحاظ آماری معنی‌دار است (P<۰/۰۵). در مورد آنزیمGGT، تفاوتی بین اثر ترکیبات منگنز سالن با ویتامین C مشاهده نشده است.

جدول ۲- غلظت سرمی گلوکز، کلسترول تام، تری‌گلیسیرید و لیپوپروتئین با دانسیته‌ی بالا (HDL) در گروه‌های مورد بررسی، قبل و بعد از مداخله*

	سالم		NASH		EUK-8		EUK-134		Vit. C	
	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد
گلوکز (میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر)	۱۰۹/۲±۱۱/۳	۱۱۵/۴±۷/۵	۱۰۴/۵±۱۶/۷	۲۴۵/۲±۵/۱†	۱۱۴/۷±۸/۷	۱۶۷/۳±۴/۶ ‡	۱۰۸/۶±۲۰/۲	۱۵۷/۶±۵/۵‡	۱۱۰/۴±۱۴/۶	۱۸۴/۲±۶/۲‡
کلسترول تام (میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر)	۶۹/۴±۵/۲	۷۵/۳±۶/۷	۶۸/۶±۶/۴	۹۸/۳±۴/۷†	۶۷/۳±۵/۹	۷۷/۹±۵/۴‡	۶۵/۹±۶/۸	۸۱/۲±۵/۵‡	۶۶/۳±۵/۵	۸۸/۳±۳/۴‡
تری‌گلیسیرید (میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر)	۴۷/۴±۴/۸	۵۰/۵±۵/۶	۵۰/۹±۳/۶	۶۸/۳±۳/۳†	۴۸/۴±۶/۳	۵۵/۲±۵/۳‡	۴۷/۹±۶/۶	۵۴/۶±۵/۳‡	۵۲/۳±۴/۲	۵۸/۴±۴/۷‡
کلسترول HDL- (میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر)	۴۰/۴±۵/۳	۴۱/۸±۵/۶	۴۲/۷±۶/۶	۳۰/۵±۲/۶†	۴۱/۴±۵/۳	۵۰/۵±۴/۱‡	۳۹/۸±۴/۹	۴۹/۴±۳/۸‡	۴۱/۸±۴/۵	۴۸/۱±۴/۱‡

تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۶ عدد است. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.† P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه سالم برای شاخص مربوطه؛‡ P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه NASH برای شاخص مربوطه

جدول ۳- میزان فعالیت سرمی آنزیم‌های آلانین ترانسفراز (ALT)، آسپارتات ترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، گاماگلوتامیل‌ترانسفراز (GGT) در گروه‌های مورد مطالعه، قبل و بعد از مداخله.

	سالم		NASH		EUK-8		EUK-134		Vit. C	
	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد
ALT (میلی‌واحد در لیتر)	۸۰/۴±۴/۵	۸۵/۸±۶/۳	۷۹/۳±۸/۶	۱۶۰/۱±۵/۴†	۸۲/۱±۸/۶	۱۰۳/۶±۵/۵‡	۸۵/۶±۷/۵	۱۰۱/۷±۶/۹‡	۸۱/۴±۵/۳	۱۲۹/۶±۴/۷‡
AST (میلی‌واحد در لیتر)	۵۵/۴±۵/۲	۵۹/۶±۴/۰	۵۷/۶±۶/۴	۹۹/۶±۵/۷†	۶۰/۳±۷/۶	۶۵/۴±۴/۳‡	۵۹/۳±۶/۴	۶۶/۱±۵/۱‡	۵۶/۷±۵/۹	۷۴/۹±۵/۴‡
ALP (میلی‌واحد در لیتر)	۲۸۷/۷±۱۵/۷	۳۰۰/۷±۱۶/۲	۲۹۴/۴±۱۲/۶	۸۴۱/۵±۱۹/۳†	۲۹۰/۷±۱۳/۲	۴۷۸/۲±۱۰/۲‡	۲۹۸/۵±۱۶/۷	۵۲۷/۴±۱۳/۲‡	۳۰۱/۵±۱۶/۷	۵۷۳/۴±۱۸/۲‡
GGT (میلی‌واحد در لیتر)	۸/۷±۰/۶	۹/۲±۰/۷	۸/۹±۰/۴	۱۱/۳±۰/۴†	۸/۶±۰/۵	۱۰/۵±۰/۶‡	۸/۷±۰/۷	۹/۸±۰/۴‡	۸/۹±۰/۶	۹/۸ ±۰/۸‡

*تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۶ عدد است و مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.† P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه سالم برای شاخص مربوطه؛ ‡ P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه NASH برای شاخص مربوطه.

جدول ۴ تاثیر آنتی‌اکسیدان‌های مورد استفاده در بررسی حاضر را بر پراکسیداسیون لیپید و اکسیداسیون پروتئین‌های کبد نشان می‌دهد. در موش‌های مبتلا به NASH میزان این دو فاکتور نسبت به گروه سالم افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است (به ترتیب ۱۰۰ و ۷۶٪). تیمار EUK-8، EUK-134 و ویتامین C منجر به کاهش معنی‌دار پراکسیداسیون لیپید و اکسیداسیون پروتئین‌های کبد در موش‌های مبتلا به استئاتوهپاتیت شده است (P<۰/۰۵). میزان تاثیر ترکیبات منگنز سالن بر پراکسیداسیون لیپید مشابه ویتامین C بوده، در حالی‌که تاثیر EUK-8 در مقایسه با دو ترکیب دیگر، بر کاهش اکسیداسیون پروتئین‌های کبد به طور معنی‌داری بیشتر بوده است (P<۰/۰۵).

Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 2:39 +0430 on Tuesday March 26th 2019

جدول ۴- میانگین میزان پراکسیداسیون لیپید (TBARS) و محتوای کربونیل پروتئین در بافت کبد*

	سالم	NASH	EUK-8	EUK-134	Vit. C
TBARS (نانومول/ میلی‌گرم پروتئین)	۴/۸±۰/۲	۹/۶±۰/۳ †	۶/۹±۰/۲‡	۵/۸±۰/۴‡	۶/۴±۰/۴‡
کربونیل پروتئین (نانومول/ میلی‌گرم پروتئین)	۱/۴±۰/۲	۲/۴±۰/۱ †	۱/۸±۰/۲‡	۱/۷±۰/۳‡	۱/۶±۰/۱‡

* تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۶ عدد است و مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.† P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه سالم برای شاخص مربوطه؛ ‡ ۰/۰۵ >Pدر مقایسه با گروه NASH برای شاخص مربوطه.

بحث

افزایش شیوع چاقی، سندرم متابولیک و پیشرفت NASH به سیروز و سرطان کبد از یک سو، و نبود درمان قطعی برای استئاتوهپاتیت از سویی دیگر، ضرورت انجام بررسی‌ها را به منظور یافتن راه حلی برای این اختلال متابولیک، بیشتر می‌نماید. در مطالعه‌ی آزمایشگاهی حاضر، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها با بهبود شاخص‌های بافت شناسی و بیوشیمیایی در موش‌های مبتلا به استئاتوهپاتیت همراه بود. بررسی‌های تکمیلی برای بررسی سازوکارهای ملکولی این تاثیرات در حال انجام است. با عنایت به نقش استرس اکسیداتیو در بیماری‌زایی NASH، از دو ترکیب سنتتیک (EUK-8 و EUK-134) با فعالیت‌های بیولوژی مشابه آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز، استفاده گردید. در این پژوهش، موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی فاقد متیونین و کولین کاهش وزن نشان داده‌اند که با یافته‌های پژوهش‌گران دیگر نیز همسو می‌باشد.[۱۵] طبق بررسی‌های انجام شده رژیم غذایی MCD از راه‌های مختلفی از جمله توقف بیان آنزیم کبدی SCD-1 (stearoyl-coenzyme A desaturase-1) ، افزایش مصرف بافت چربی و بالا بردن مصرف انرژی سبب القا وضعیت سوخت و سازی و در نتیجه کاهش وزن می‌شود.[۱۵] در بررسی‌های دیگر، علت کاهش وزن در اثر این رژیم غذایی، افزایش التهاب کبدی عنوان می‌گردد.[۱۶] در پژوهش اخیر، افزایش وزن مشاهده شده در گروه‌های مبتلا به استئاتوهپاتیت تیمار شده با آنتی‌اکسیدان‌ها (ترکیبات منگنز سالن و ویتامین C)، به احتمال زیاد به دلیل اثر این ترکیبات بر کاهش التهاب کبدی بوده که توسط بررسی‌های بافت شناسی نیز مورد تایید قرار گرفته است. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد میزان گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسرید سرم در موش‌های مبتلا به NASH، نسبت به موش‌های صحرایی سالم افزایش یافته است. در بررسی کنونی کمپلکس‌های منگنز سالن سبب کاهش این شاخص‌ها شده است. این یافته، به احتمال زیاد به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات بوده است.

یافته‌ها نشان داده رژیم غذایی فاقد متیونین و کولین دارای اثر افزایش دهنده‌ی قند خون بوده که تیمار با آنتی‌اکسیدان‌ها موجب کاهش گلوکز سرم شده است. با توجه به اثر التهابی افزایش قند خون در پژوهش‌های قبلی،[۱۷] به نظر می‌رسد افزایش گلوکز سرم در ایجاد التهاب در مبتلایان به استئاتوهپاتیت بی‌تاثیر نبوده است. بنابراین شاید بتوان ادعا کرد که ترکیبات سالن با کاهش گلوکز سرم نیز منجر به کاهش التهاب شده‌اند.

در بررسی حاضر، در اثر استفاده از کمپلکس‌های منگنز سالن، میزان فعالیت سرمی آنزیم‌های نشان‌گر آسیب کبدی در حیوانات تغذیه شده با رژیم غذایی بدون متیونین و کولین، کاهش معنی‌داری داشته است. این داده‌ها با یافته‌های پژوهش‌های مشابه همسو می‌باشد، به طوری‌که مرات و همکاران در پژوهشی نشان دادند تجویز داروی آنتی‌اکسیدان probucol در بیماران مبتلا به NASH موجب کاهش ALT می‌گردد.[۱۸] نشان‌گرهای آسیب اکسیداتیو سلول‌های کبدی (پراکسیداسیون لیپید و محتوای کربونیل پروتئین) در موش‌های بیمار به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته بود. بررسی‌ها نشان داده‌اند در موش‌های مبتلا به بیماری استئاتوهپاتیت، در اثر افزایش پراکسیدهای لیپیدی و واکنش آن‌ها با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، مانند کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز، فعالیت این آنزیم‌ها کاهش می‌یابد. این مورد منجر به بر هم خوردن بیشتر تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های سلول، و در نهایت افزایش استرس اکسیداتیو و آسیب‌های وارده بر سلول می‌گردد. ترکیبات سالن با فعالیت سوپراکسیددیسموتازی و کاتالازی خود، به ترتیب با جمع‌آوری آنیون سوپراکسید و ملکول پراکسید هیدروژن، مانع شروع واکنش‌های زنجیری پراکسیداسیون

Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 2:39 +0430 on Tuesday March 26th 2019

لیپید و در نتیجه آسیب جدی به بافت کبد شده‌اند. لورنت و همکاران نیز در پژوهشی به این نتیجه رسیدند که استفاده از مشابه‌های آنزیم سوپراکسیددیسموتاز منجر به بهبود نشان‌گرهای سرمی در اختلالات کبدی می‌گردد.[۱۹] یافته‌های پاتولوژی بررسی حاضر، تقویت کننده‌ی این یافته‌ها می‌باشد.

در کل با توجه به یافته‌های بررسی حاضر می‌توان اظهار نمود کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها (به ویژه ترکیبات سالن) در پیشگیری و یا درمان بیماری استئاتوهپاتیت غیر الکلی، کاهش گلوکز و چربی خون موثر می‌باشد. هر چند بررسی‌های بیشتری روی اثر دوزهای مختلف هر کدام از این ترکیبات و انواع دیگر کمپلکس‌های سالن روی تعداد بیشتری از نمونه‌ها مورد نیاز است. در مورد تاثیر این ترکیبات روی گلوکز و لیپید خون نیز استفاده از مدل‌های آزمایشگاهی دیگر ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری: از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر حمایت مالی این پژوهش سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Kotronen A, Yki-jarvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; 28: 27-38.
2. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Pichiri I, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. J Hepatol 2010; 53: 713-8.
3. Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-jarvinen H, Sveqliati-Baroni G. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? Dig Liver Dis 2010; 42: 320-30.
4. Zivkovic AM, German JB, Sanyal A. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. Am J Clin Nutr 2007; 86: 285-300.
5. Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: A review and update. Dig Dis Sci 2010; 55: 560-78.
6. Orangi E, Ostad Rahimi A, Mahdavi R, Somi M, Tarzemani M. Oxidative stress-related parameters and antioxidant status in non-alcoholic fatty liver disease patients. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism 2011; 12: 493-9.[Farsi]
7. Amini R, Nosrati N, Yazdanparast R, Molaei M. Teucrium polium in prevention of steatohepatitis in rats. Liver Int 2009; 29: 1216-21.
8. Day BJ. Catalytic antioxidants: a radical approach to new therapeutics. Drug Discov Today 2004; 9: 557-66.
9. Batinić-Haberle I, Rebouças J, Spasojević I. Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. Antioxid Redox Signal 2010; 13: 877-918.
10. Baker K, Marcus CB, Huffman K, Kruk H, Malfory B, Doctrow SR. Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury. J Pharmacol Exp Ther 1998; 284: 215-21.
11. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. Int J Exp Pathol 2006; 87:1-16.
12. Ustundag B, Bahcecioglu IH, Sahin K, Duzgun S, Koca S, Gulcu F, et al. Protective effect of soy isoflavones and activity levels of plasma paraoxonase and arylesterase in the experimental nonalcoholic steatohepatitis model. Dig Dis Sci 2007; 52: 2006-14.
13. Yazdanparast R, Bahramikia S, Ardestani A. Nasturtium officinale reduces oxidative stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolaemic rats. Chem Biol Interact 2008; 172: 176-84.
14. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. Methods Enzymol 1994; 233: 357-63.
15. Rizki G, Arnaboldi L, Gabrielli B, Yan J, Lee GS, Ng RK, et al. Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. J Lipid Res 2006; 47: 2280-90.
16. Weltman MD, Farrell GC, Liddle C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. Gastroenterology 1996; 111: 1645-53.
17. Chiu CJ, Taylor A. Dietary hyperglycemia, glycemic index and metabolic retinal diseases. Prog Retin Eye Res 2011; 30: 18-53.
18. Merat S, Aduli M, Kazemi R, Sotoudeh M, Sedighi N, Sohrabi M, et al. Liver histology changes in nonalcoholic steatohepatitis after one year of treatment with probucol. Dig Dis Sci 2008; 53: 2246-50.
19. Laurent A, Nicco C, Van Nhieu JT, Borderie D, Chereau C, Conti F, et al. Pivotal role of superoxide anion and beneficial effect of antioxidant molecules in murine steatohepatitis. Hepatology 2004; 39: 1277-85.

Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir at 2:39 +0430 on Tuesday March 26th 2019

Original Article

Evaluation of the Preventive Role of two Mn-salen Complexes in Induction of Steatohepatitis in Rats

Rezazadeh A[1], Yazdanparast R[1], Molaei M[2]

[1]Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, [2]Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran

e-mail: yazdan@ibb.ut.ac.ir

Received: 18/09/2011 **Accepted**: 02/05/2012

Abstract

Introduction: Nonalcoholic steatohepatitis (NASH), a stage of fatty liver, occuring in individuals with little or no alcohol consumption, is characterized by macro- and microvesicular steatosis with inflammation, ballooning degeneration, hepatocyte necrosis, Mallory bodies and fibrosis. It has been suggested that oxidative stress might play an important role in the pathogenesis and progress of NASH. The aim of present study was to determine the preventive effect of catalytic antioxidants (two Mn-salen complexes) on diet-induced steatohepatitis in rats. Materials and Methods: NASH was induced in male N-Mary rats by feeding them with a methionine - choline deficient (MCD) diet for 14 weeks. The rats were randomly assigned to receive vitamin C, EUK-8, EUK-134 (n=5, 30 mg/Kg/day) or vehicle orally. At the end of the experiment, sera biochemical analyses and histopathological examination of liver samples were performed. Results: Treatment of rats with Mn-salens and or vitamin C significantly reduced the sera cholesterol, glucose, aminotransferases and alkaline phosphatase activities, the extent of lipid peroxidation and protein carbonylation whereas the weight and HDL level were significantly increased. In addition, these compounds improved NASH pathological features in liver of MCD fed rats. SPSS statistical software was used for statistical analysis, with P values of less than 0.05 being considered statistically significant. Conclusion: Based on the present data, supplementation of Mn-salen complexes could be beneficial in the prevention of nonalcoholic steatohepatitis in rats.

Keywords: Nonalcoholic steatohepatitis, Synthetic antioxidants, Oxidative stress, Methionine and choline deficient diet, EUK-8, EUK-134