Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 36, No. 3, Aug. – Sep. 2014, Pages: 44-51

The Effect of Hydroalcoholic Extract of *Nasturtium Officinale* R.Br on Antioxidant Status and DNA Damage in Liver and Kidney Rats Exposed to Arsenic

Felor Zargari[1*], Amir Ghorbanihaghjo[2], Hossein Babaei[3], Safar Farajnia[4], Nasim Hayati Roodbari[1]

[1]Department of Biology Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Clinical Biochemistry, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3]Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[4]Department of Biotechnology, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 17 Jun, 2013 Accepted: 5 Aug, 2013

Abstract

Background and Objectives: Oxidative stress has been implicated in various pathological consequences including such as cardiovascular disease , cancer, diabetes and aging. The present study investigated the effects of hydroalcoholic extract of *Nasturtium Officinale* on antioxidant status and DNA damage in arsenic –induced oxidative damage in liver and kidney tissue.

Materials and Methods: In this experimental study ,48 male rats were selected and randomly divided **into** 6 groups: Group 1: normal healthy rat, group II was treated with sodium arsenite (SA) {i.p. injection at dose of 5.5 mg/kg body weight }, group III and group IV was treated with hydroalcoholic extract of *N.Officinale* (via gavage) at a dose of 200 and 500 mg/kg body weight respectively , group V and group VI was treated with hydroalcoholic extract of *N.Officinale* (via gavage) at a dose of 200 and 500 mg/kg body weight respectively + SA. Blood samples were collected and then examined antioxidant enzymes: **Catalase** (CAT), **Superoxiddismutase** (SOD) and **Glutathion Peroxidase** (GPx) activities, MDA **(Malondialdehyde)** content, 8-OHdG concentration in liver and kidney.

Results: Results of current study indicates that *N.Officinale* consumption significantly increased the activities of antioxidant enzymes and decreased MDA content, 8-OHdG**(8-hydroxydeoxyguanosine)** Concentration in liver. The consumption of plant extract significantly increased the activity of GPx in kidney.

Conclusions: *N.Officinale* (Watercress) reduces the arsenic-induced oxidative damage in liver and it has the little protective effect in kidney.

Keywords: Oxidative Stress, *Nasturtium.Officinale* R.Br, Antioxidant Enzymes, DNA Oxidative Damage,

*Corresponding author:
E-mail: felorzargari@marandiau.ac.ir

تاثیر عصاره هیدرو الکلی گیاه بولاغ اوتی (*Nasturtium Officinale* R.Br) بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و آسیب اکسیداتیو DNA در بافت کبد و کلیه موش های صحرایی دریافت کننده آرسنیک

فلور زرگری[1*]، امیر قربانی حق جو[2]، حسین بابایی[3]، صفر فرج نیا[4]، نسیم حیاتی رودباری[1]

[1]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران
[2]گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[3]مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[4]گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۲/۳/۲۷ پذیرش: ۹۲/۵/۱۴

چکیده

زمینه و اهداف: استرس اکسیداتیو یک نقش مهم در پاتوژنز بیماری هایی مثل بیماری قلبی عروقی، سرطان، دیابت و پیری دارد. این مطالعه به بررسی تایثر عصاره هیدرو الکلی بولاغ اوتی (NO) بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و آسیب DNA ناشی از تجویز آرسنات در بافت کبد و کلیه رت می پردازد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۴۸ موش صحرایی نر بالغ انتخاب و به طور تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند. گروه اول شامل موش صحرایی های سالم، گروه دوم، موش صحرایی های دریافت کننده آرسنیک به فرم سدیم آرسنیت (SA) در غلظت ۵/۵ میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن از طریق تزریق داخل صفاقی گروه سوم و چهارم موش صحرایی های دریافت کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه بولاغ اوتی در دوزهای ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن و گروه پنجم و ششم موش صحرایی هایی که عصاره بولاغ اوتی را به ترتیب در دوز های ۲۰۰و ۵۰۰ میلی گرم به ازای کیلو گرم وزن بدن از طریق گاواژ به همراه SA(۵/۵ میلی گرم برکیلوگرم وزن بدن) به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت نمودند بعد از دوره تیمار (۲۸ روز) موش صحرایی ها بیهوش شدند، خونگیری انجام و سرم جدا گردید. فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، غلظت مالون دی آلدئید (MDA)، غلظت ۸-OHdG و آنزیم‌های کبدی در سرم بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که مصرف عصاره بولاغ اوتی باعث افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و کاهش فعالیت آنزیم های کبدی و همچنین کاهش غلظت MDA و۸-OHdG در عصاره کبد گردید. مصرف عصاره (NO) فقط باعث افزایش معنی دار در فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز کلیه گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر حاکی از تاثیر عصاره بولاغ اوتی در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از SA و آسیب اکسیداتیو DNA در کبد و همچنین افزایش گلوتاتیون پراکسیداز در کلیه است.

کلید واژه ها: استرس اکسیداتیو، *Nasturtium Officinale R.Br*، آنزیم‌های آنتی اکسیدان، آسیب اکسیداتیو DNA

*ایمیل نویسنده رابط: felorzargari@marandiau.ac.ir

مقدمه

رادیکال های آزاد مولکول‌ها و اتم‌هایی هستند که به دلیل داشتن الکترون آزاد حاوی انرژی بالایی هستند و قادرند به بافت ها و سلول ها آسیب برسانند. این مولکول ها در غلظت های فیزیولوژیکی برای عملکرد نرمال سلول (انتقال پیام های سلولی) ضروری هستند و در غلظت های بالا باعث ایجاد وضعیتی به نام استرس اکسیداتیو می‌شوند (۱). این مولکول ها به دلیل عدم پایداری تمایل بسیار شدیدی برای واکنش با دیگر مولکول ها داشته و بدین ترتیب باعث آسیب به لیپیدها، پروتئین‌ها، DNA و

تخریب سلول می شوند (۱). علی رغم وجود سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی سلول برای خنثی‌کردن آسیب اکسیداتیو، آسیب های ایجاد شده طی دوره زندگی در تولید بیماری های وابسته به سن مثل سرطان، آترواسکلروز و آرتریت نقش دارند (۲). تحت شرایط پاتولوژیکی غلظت بالای رادیکال های آزاد ممکن است منجر به تغییرات دائم در بیان ژن گردد (۱). بسیاری از مطالعات بر روی سمیت ناشی از فلزات و سرطان زایی با تاکید بر نقش آن ها در تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سیستم های بیولوژیکی متمرکز شده‌اند. تشکیل رادیکال های آزاد به واسطه فلزات، ممکن است باعث تغییرات گوناگون بازهای DNA، افزایش پر اکسیداسیون لیپیدی و تغییر در هموستازی Ca و سولفیدریل شود (۲). آرسنیک فلزی بسیار سمی است که در خاک، آب و هوا وجود دارد، استفاده از حشره کش ها و علف کش های حاوی آرسنیک میانگین آرسنیک موجود در محیط اطراف را افزایش می دهد و منجر به ورود این ماده سمی به چرخه غذایی و بدن انسان می شود و سلامت انسان را به مخاطره می اندازد. مطالعات زیادی تولید رادیکال های آزاد طی متابولیسم آرسنیک را تائید کرده است. تولید رادیکال های آزاد ناشی از آرسنیک می تواند با فعال سازی مسیرهای پیام رسانی حساس به اکسیداتیو باعث مرگ سلول شود. تیول‌های سلولی مثل گلوتاتیون و سیستئین، سلول ها را بر علیه اثرات سمی آرسنات محافظت می‌کنند (۲). تولید رادیکال های آزاد از منابع مختلف باعث توسعه مکانیسم های دفاعی توسط موجودات زنده شده است، که شامل مکانیسم های پیشگیری کننده، ترمیم، فیزیکی و آنتی اکسیدانی است. ما بین این مکانیسم ها دخالت آنتی اکسیدانی مهم است (۲). دفاع آنتی اکسیدانی بیانگر حذف مستقیم رادیکال های آزاد و حفاظت بیشتر نواحی بیولوژیکی است و شامل سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی (کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز) و غیر آنزیمی (ویتامین C، E، کارتنوئیدها، فلاوونوئیدها و ملاتونین می باشد (۲). توجهات اخیر به ترکیبات فنلی به ویژه فلاوونوئیدها به دلیل ظرفیت آنتی اکسیدانی بالا و نقش مفید آن ها در سلامتی افزایش یافته است. ترکیبات فنلی ممکن است به عنوان خاتمه دهنده واکنش های زنجیره ای رادیکال های آزاد و یا به عنوان شلاتور یون های فلزی فعال کننده ردوکس که باعث پر اکسیداسیون می‌گردند عمل کنند (۲). گیاه بولاغ اوتی *Nasturtium Officinale R.Br* (NO) از تیره شب بو و خانواده Brassicacea است. خانواده Brassicacea حاوی مقادیر زیادی ترکیبات فنلی می باشند (۳). بولاغ اوتی به علف چشمه معروف است و گیاهی علفی پایا با ساقه های بالارونده می باشد که در کنار جویبارها و چشمه ها در مجاورت آب های زلال جاری می روید. بولاغ اوتی حاوی ترکیب گلوکوناستورتین Gluconasturtin بوده و دارای ویتامین های E، A، C و مواد معدنی مثل آهن، فسفر و ید می باشد (۴). مهمترین فلاوونوئیدهای موجود در بولاغ اوتی لوتئین و کوئرستین می باشد. بولاغ اوتی دارای اثرات درمانی گوناگون است. مصرف سبزیجاتی مثل کلم، بولاغ اوتی، بروکلی توام با کاهش خطر سرطان است (۴و۳). بولاغ اوتی یک گیاه دارویی با خاصیت مدری است و در کاهش قند خون بالا، چربی خون بالا، فشارخون بالا و بیماری های قلبی عروقی وریوی موثر است (۵). مطالعات اخیر حاکی از اثرات ضد سرطانی آن می‌باشد (۷و۶). با توجه به این که تاکنون مطالعه جامعی در خصوص اثر محافظتی گیاه بولاغ اوتی بر آسیب اکسیداتیو ناشی از آرسنیک انجام نگرفته است لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی نقش حفاظتی دوزهای مختلف عصاره بولاغ اوتی در آسیب اکسیداتیو ناشی از سدیم آرسنیت و آسیب اکسیداتیو DNA در کبد و کلیه موش صحرایی می باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری گیاه در فصل بهار از منطقه ۲۵ کیلومتری کلیبر به طرف مغان (بهار چشمه) شروع شد. بعد از جمع‌آوری و تائید توسط هرباریوم مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (به شماره Tbz-fph 711) قسمت های هوایی آن در دمای اتاق و دور از نور خورشید خشک گردید تا به وزن ثابت برسد. گیاه خشک شده به صورت پودر آسیاب شد و سپس ۷۰۰ گرم از پودر گیاه با استفاده از اتانول آبی ۸۰٪ دوبار در دمای اتاق عصاره گیری گردید. سپس عصاره تحت فشار پایین در یک دستگاه تبخیر روتاری تغلیظ شد. باقی مانده (۲۲٪ ماده خشک) تا قبل از مصرف در فریزر نگهداری شد و برای استفاده عصاره خشک شده در آب مقطر حل گردید. تحقیق به روش تجربی انجام گرفت و با در نظر گرفتن حجم نمونه مطالعات مشابه و فرمول محاسبه حجم نمونه ۴۸ موش صحرایی نر بالغ (Sprague Dawley) از محل پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده پزشکی تبریز خریداری و سپس در اتاق حیوانات مرکز تحقیقات کاربرد دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در دمای $۲۲\pm۲^{\circ}C$ و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند که به آب و غذای کافی همواره دسترسی داشتند. تمامی مراحل آزمایش برای موش ها با رعایت کامل موازین اخلاقی انجام گرفت. بعد از ۷–۵ روز سازگاری با محیط به ۶ گروه ۸ تایی به طور تصادفی تقسیم شدند. گروه اول به نام گروه کنترل که از رژیم غذایی استاندار استفاده نمودند و روزانه یک سی سی آب مقطر از طریق گاواژ دریافت کردند. گروه دوم موش هایی که روزانه به میزان یک سی‌سی سدیم آرسنیت (SA) با غلظت ۵/۵ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن که به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. گروه سوم و چهارم موش هایی که عصاره بولاغ اوتی را به ترتیب در دوزهای ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن به صورت گاواژ دریافت نمودند. گروه چهارم و پنجم موش‌هایی که عصاره بولاغ اوتی را به ترتیب در دوز های ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن از طریق گاواژ به همراه SA (۵/۵ میلی گرم برکیلوگرم وزن بدن) به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت نمودند. بعد از پایان دوره مورد نظر (۲۸ روز) خونگیری انجام و بعد از جداسازی سرم جهت آنالیز در دمای ۲۰ – نگهداری شد.

نمونه بافت کبد و کلیه به تکه های کوچک برش داده شد و سپس در محلول ۱/۱۵٪ کلریدپتاسیم توسط هموژنایزر شیشه‌ای هموژنیزه شدند. نمونه‌های هموژنیزه شده به مدت ۵ دقیقه در

۶۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ^{c}۴ سانتریفوژ شدند. محلول رویی بدست آمده جهت آنالیز بیوشیمیایی در ^{c} ۷۰ – نگهداری شدند. غلظت پروتئین هر عصاره توسط روش Lowry تعیین شد (۸).

بررسی بافت‌شناسی و پاتولوژیک نمونه های بافت کبد و کلیه

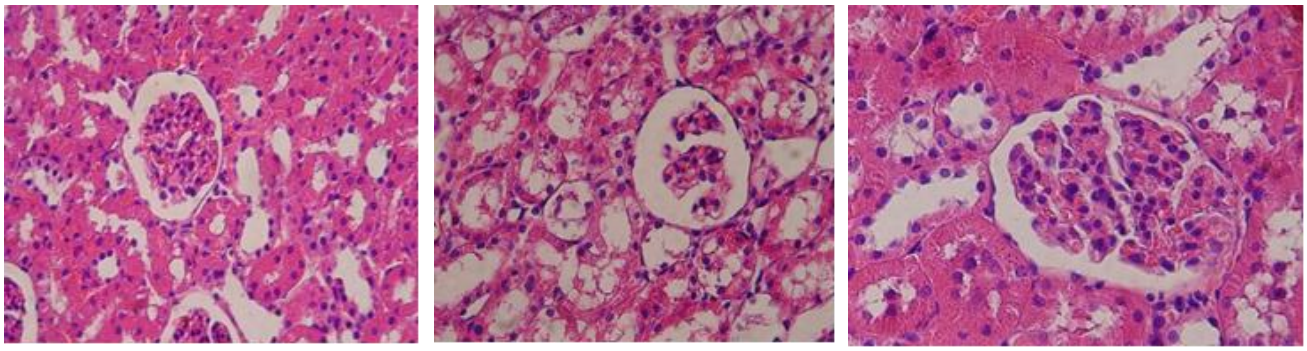
بر روی نمونه هایی که در داخل محلول فرمالین ۱۰٪ نگهداری شده بودند در بخش بافت شناسی و پاتولوژی بیمارستان امام رضا تبریز به صورت تهیه لام و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین و بررسی زیر میکروسکوپ نوری انجام گرفت و میزان آسیب در تک تک نمونه ها تعیین شد. فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) توسط کیت‌های تجاری (پارس آزمون–ایران) به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از اتو آنالیزور هیتاچی مورد سنجش قرار گرفت. غلظت MDA (به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی) نمونه ها بر اساس روش رنگ سنجی و بر پایه واکنش با تیو باربیتوریک اسید (TBA) و استخراج با بوتانل نرمال و اندازه‌گیری در طول موج ۵۳۲ nm انجام شد (۹). برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم CAT (کاتالاز) از روش Abei (۱۰) بر اساس میزان تجزیه شدن پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ nm استفاده شد. فعالیت SOD (سوپر اکسید دیسموتاز) با استفاده از کیت RANSOD (Randox labs.Crumlin UK) بر اساس درجه مهار رادیکال های آزاد سوپر اکسید در طول موج ۵۰۵ nm استفاده شد (۱۱). فعالیت GPx (گلوتاتیون پراکسیداز) با استفاده از کیت RANSEL (Randox labs. Crumlin UK) و روش شرح داده شده توسط Paglia و Valentin (۱۲) بر روی نمونه‌ی هموژنیزه سنجیده شد. در این واکنش اکسیداسیون NADPH به $NADP^{+}$ باعث کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ nm می گردد که متناسب با فعالیت GPx می باشد. کیت مورد استفاده بر مبنای تعیین OHdG–۸ ناشی از آسیب اکسیداتیو DNA می باشد که بر اساس دستور العمل مربوطه مورد سنجش قرار گرفت (Scientific Research center Glory Science Co Ltd sensitivity = 0.024ng/ml Assay range 0.05-20ng/ml). در این روش نمونه‌های آماده شده با محلول آنتی بادی اولیه در چاهک هایی که قبلا با OHdG–۸ پوشیده شده به مدت یک ساعت انکوبه شد. در این زمان آنتی بادی‌ها به طور رقابتی برای اتصال با OHdG–۸ در نمونه و چاهک عمل می‌کنند. آنتی بادی های متصل شده با نمونه شستشو داده شده و در مرحله بعد آنتی بادی دوم اضافه شد (آنزیم لیبل‌شده) که به آنتی بادی چسبیده به OHdG–۸ در چاهک وصل می گردد. آنتی بادی های ثانویه نیز با بافر شستشو، شستشو داده شدند. در این هنگام محلول کروماتیک و محلول رقیق‌کننده اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه گردید و سپس محلول خاتمه واکنش اضافه شد و میزان جذب در ۴۵۰ nm بررسی شد. نتایج بر اساس واحد ng/ml بیان گردید. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS.16 و آزمون آماری من ویتنی (Mann-Whitney U) جهت بررسی تفاوت معنی‌دار مابین گروه ها انجام گرفت. داده‌های حاصل از آزمایش برای نمایش نتایج به شکل Mean ± SD محاسبه گردیدند، و P<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف معیار آنزیم‌های کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز کلیه در گروه‌های مورد بررسی در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود. مقایسه دو به دوی گروه‌ها بر اساس آزمون من ویتنی نشان داد که مصرف سدیم آرسنیت تغییر معنی داری را در فعالیت GPx کلیه نشان نداد. سدیم آرسنیت باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT کلیه گردید (P <۰/۰۵). ولی مصرف عصاره به همراه سدیم آرسنیت تغییر معنی داری در فعالیت این آنزیم ها ایجاد نکرد. در عین حال مصرف عصاره به تنهایی در دوز ۵۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم توانست فعالیت آنزیم SOD را افزایش دهد (P <۰/۰۵).

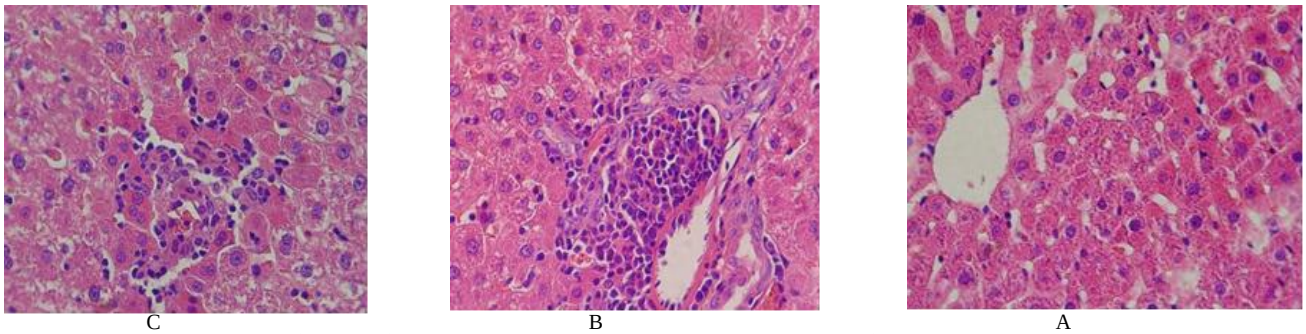
تاثیر عصاره هیدروالکلی NO بر میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی (AST،ALT)

میانگین و انحراف معیار آنزیم‌های کبدی در گروه های مورد بررسی در جدول ۲ مشاهده می گردد. مقایسه دو به دوی گروه ها بر اساس آزمون من ویتنی نشان می دهد که مصرف سدیم آرسنیت باعث افزایش معنی‌دار (P <۰/۰۱) آنزیم های کبدی (AST,ALT) می گردد. مصرف عصاره در هر دو غلظت (۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) به همراه سدیم آرسنیت (گروه پنجم و ششم) باعث کاهش معنی‌دار (P <۰/۰۱) در فعالیت آنزیم های کبدی گردید. مقایسه دو به دوی گروه ها براساس آزمون من ویتنی نشان داد که سدیم آرسنیت باعث افزایش معنی دار در غلظت MDA کبدی (P<۰/۰۱) گردید و مصرف عصاره (در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به همراه سدیم آرسنیت باعث کاهش معنی دار غلظت MDA کبد گردید. مصرف سدیم آرسنیت و عصاره تغییرات معنی‌داری را در MDA کلیه ایجاد نکرد. مقایسه دو به دوی گروه‌ها بر اساس آزمون من ویتنی نشان داد که مصرف سدیم آرسنیت سبب کاهش معنی‌دار در فعالیت آنزیم های (GPx،SOD،CAT) در مقایسه با گروه کنترل در کبد گردید (P<۰/۰۱ در مورد GPx و P< ۰/۰۵ در مورد SOD و CAT). مصرف عصاره باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های (GPx،SOD،CAT) گردید. عصاره گیاه به ویژه در دوز ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به همراه سدیم آرسنیت منجر به افزایش معنی‌دار در فعالیت GPx (P<۰/۰۵) گردید. مصرف عصاره در هر دو دوز منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم CAT و SOD گردید (به ترتیب P<۰/۰۵ و P<۰/۰۱). نتایج حاصل از مقایسه دو به دوی گروه‌ها در مورد غلظت OHdG–۸ با آزمون من ویتنی حاکی از تاثیر عصاره در هر دو دوز در کاهش معنی‌دار غلظت OHdG–۸ کبد می‌باشد (P <۰/۰۵). این تغییرات در کلیه معنی دار نبود (جدول ۲). در مطالعات هیستوپاتولوژیک مشخص شد که سدیم آرسنیت باعث التهاب پورتال و آپوپتوزیس در کبد می‌شود (شکل B– ۲) و تیمار با عصاره بولاغ اوتی اثرات حفاظتی در برابر تغییرات ناشی از سدیم آرسنیت در کبد را نشان داد (شکل–۲C). سدیم آرسنیت باعث از دست‌رفتن خفیف شکل منظم توبول‌های کلیوی، و افزایش فضای داخل توبول، و افزایش فضای بومن در کلیه گردید (شکل B–۱) و تیمار با عصاره در کلیه منجر به کاهش تغییرات ایجاد شده و برگشت به حالت-های تقریبا طبیعی گردید (شکل C–۱).



C **B** **A**

شکل ۱: A نمونه نرمال (بافت کلیه) B) نمونه تیمار با سدیم آرسنیت، C تیمار با عصاره هیدروالکلی بولاغ اوتی به همراه سدیم آرسنیت (رنگ آمیزی H&E و بزرگ نمایی ۴۰۰ X)



C B A

شکل ۲: Aنمونه نرمال (بافت کبد) B) نمونه تیمار با سدیم آرسنیت (التهاب پورتال) C) تیمار با عصاره هیدروالکلی بولاغ اوتی به همراه سدیم آرسنیت (رنگ آمیزی H&E و بزرگ نمایی ۴۰۰ X)

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار مالون دی آلدئید، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و ۸-هیدروکسی داکسی گوانوزین کلیه در گروه رت های مورد مطالعه

پارامترها	گروه ۱ میانگین و انحراف معیار	گروه ۲ میانگین و انحراف معیار	گروه ۳ میانگین و انحراف معیار	گروه ۴ میانگین و انحراف معیار	گروه ۵ میانگین و انحراف معیار	گروه ۶ میانگین و انحراف معیار
مالون دی آلدئید (MDA) (nmol/mg protein)	۰/۲۶± ۰/۴۹	۰/۱۹± ۰/ ۵۴	۰/۰۰± ۰/۵۳	۰/۰۰± ۰/۴۷	۰/۰۰± ۰/۵۲	۰/۰۰±۰/۵۰
کاتالاز (CAT) (U/mg/protein)	۱/۶۲± ۵/۲۴	۰/۳۳± ۳/۳۱	۱/۴± ۴/۲۰	۱/۴۶± ۴/۳۸	۱/۱۱± ۳/۹۵	۰/۸۶± ۳/۶۸
گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) (U/mg/protein)	۰/۲۳± ۰/۵۴	۰/۵۰± ۰/۵۳	۰/۰۵± ۰/۵۱	۰/۰۳± ۰/۵۱	۰/۲۹± ۰/۵۹	۰/۰۶± ۰/۶۳
سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) (U/mg/protein)	۰/۶۸± ۹/۰۵	۰/۲۳± ۷/۹۴	۰/۶۷± ۸/۳۵	۰/۵۱± ۸/۳۸	۰/۶۱± ۸/۲۷	۰/۵۱± ۷/۹۶
۸-هیدروکسی داکسی گوانوزین (8-OHdG) (ng/ml)	۰/۳۶± ۲/۱۶	۰/۴۰± ۲/۲۳	۰/۲۴± ۱/۹۷	۰/۴۰± ۱/۹۹	۰/۳۶± ۲/۱۶	۰/۴۰± ۲/۱۴

گروه ۱: تغذیه شده با رژیم نرمال، گروه ۲: تیمارشده با سدیم آرسنیت[SA]، گروه۳: تیمار شده با عصاره بولاغ اوتی mg/kg ۲۰۰،گروه ۴: تیمار شده با عصاره بولاغ اوتیmg/kg ۵۰۰، گروه ۵: تیمار شده با عصاره بولاغ اوتیmg/kg ۲۰۰ + SA، گروه ۶: تیمار شده با عصاره بولاغ اوتیmg/kg ۵۰۰ + SA

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار ALT، AST، مالون دی آلدئید، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و ۸-هیدروکسی داکسی گوانوزین کبد در گروه رت های مورد مطالعه

پارامترها میانگین و انحراف معیار	گروه ۱ میانگین و انحراف معیار	گروه ۲ میانگین و انحراف معیار	گروه ۳ میانگین و انحراف معیار	گروه ۴ میانگین و انحراف معیار	گروه ۵ میانگین و انحراف معیار	گروه ۶ میانگین و انحراف معیار
آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) (U/L)	۱/۱±۳۲/۰۸	۳۵/۰۳±۱/۱	۳۳/۰±۱	۳۱/۹۰±۰/۹۸	۳۳/۰۴±۱/۱	۳۳/۱۴±۱/۱
آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) (U/L)	۲۶/۱±۱/۳	۳۰/۷۰±۱/۳	۲۶/۹۸±۱/۴	۲۷/۳۰±۰/۸۸	۲۸/۲۲±۱/۳۶	۲۶/۹۸±۱/۲
مالون دی آلدئید (MDA) (nmol/mg protein)	۰/۰۴۱± ۰/۱۶۷	۰/۰۳۵± ۰/۲۳۵	۰/۰۱۴± ۰/۱۷۰	۰/۱۷۲± ۰/۱۶۹	۰/۰۳۹± ۰/۱۹۰	۰/۰۲۴±۰/۱۸۸
کاتالاز (CAT) (U/mg/protein)	۱/۰۶± ۸/۷۰	۰/۴۵± ۷/۶۲	۲/۱۴± ۱۱/۱۵	۳/۷۲± ۱۵/۵۱	۲/۱۴± ۱۱/۱۵	۳/۷۲±۱۵/۵۱
گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) (U/mg/protein)	۰/۰۵± ۰/۷۹	۰/۰۲± ۰/۶۷	۰/۰۳± ۰/۷۲	۰/۰۹± ۰/ ۸۲	۰/۰۹± ۰/۷۵	۰/۰۴±۰/۸۰
سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) (U/mg/protein)	۱ /۵± ۶/۳	۰/۸۸± ۴/۸۴	۶/۷۸±۱/۰۳	۱/۰۸± ۵/ ۸۰	۰/۵۵± ۶/۰۱	۰/۸۰±۶/۵۱
۸-هیدروکسی داکسی گوانوزین (8-OHdG) (ng/ml)	۰/۵۲± ۲/۱۶	۰/۲۷ ± ۳/۲۶	۰/۴۷± ۲/۵۰	۰/۳۶± ۲/۴۵	۰/۴۶± ۲/۳۴	۰/۵۷± ۲/۱۹

گروه ۱: تغذیه شده با رژیم نرمال، گروه ۲: تیمارشده با سدیم آرسنیت[SA]، گروه۳: تیمار شده با عصاره بولاغ اوتی mg/kg ۲۰۰، گروه ۴: تیمار شده با عصاره بولاغ اوتیmg/kg ۵۰۰، گروه ۵ : تیمار شده با عصاره بولاغ اوتیmg/kg ۲۰۰ + SA، گروه ۶: تیمار شده با عصاره بولاغ اوتیmg/kg ۵۰۰ + SA

بحث

مواجهه با رادیکال های آزاد از منابع مختلف منجر به توسعه مکانیسم های دفاعی شامل آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیرآنزیمی می شود (۲). گیاهان دارویی به ویژه آنهایی که دارای ترکیبات پلی فنلی خصوصا فلاوونوئیدها هستند اثر حفاظتی در برابر آسیب های ناشی از رادیکال های آزاد دارند و به دلیل سهولت دسترسی، عوارض جانبی کمتر، سمیت اندک و قیمت ارزان به عنوان جایگزین های شیمیایی مورد توجه بوده اند (۲). در مطالعه حاضر مصرف عصاره بولاغ اوتی در هر دو دوز منجر به کاهش آنزیم های آمینو ترانسفراز (ALT،AST) گردید. به نظر می رسد علت افزایش آنزیم های کبدی در پلاسما می تواند به دلیل تخریب سلول های کبدی بواسطه سدیم آرسنیت باشد. یافته های ما مشابه یافته‌های، Odunolal و همکاران (۱۳)، Singh و همکاران (۱۴)، بود که دریافتند آرسنیک باعث آسیب کبد و تغییر آنزیم های کبدی می‌شود و مصرف ترکیبات حاوی فلاوونوئید نظیر سیر و همچنین مصرف ویتامین C، باعث کاهش این آنزیم‌ها و حفاظت کبدی می شود. Bahramikia و همکاران (۱۵) نشان دادند که مصرف عصاره بولاغ اوتی در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن سبب کاهش آنزیم های کبدی می گردد. Natanzi Ebadollahi و همکاران (۱۶) نیز به نتایج مشابه بعد از مصرف عصاره بولاغ اوتی در غلظت ۱۷۵ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن دست یافتند. احتمالا عصاره به خاطر داشتن ترکیبات فلاوونوئیدی از جمله کوئرستین توانسته باعث حفاظت کبدی گردد. بر اساس گزارشات، کوئرستین سبب مهار پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش فعالیت آنزیم های کبدی می‌گردد (۱۷). غلظت MDA (شاخص پراکسیداسیون لیپیدی) در رت های دریافت‌کننده سدیم آرسنیت در کبد به طور معنی داری افزایش یافت که این افزایش در کلیه معنی دار نبود. و مصرف هم زمان عصاره بولاغ اوتی با سدیم آرسنیت سبب کاهش غلظت MDA کبدی گردید. Usoh و همکاران (۱۸) و Singh و همکاران (۱۴) در مطالعات خود گزارش کردند که مصرف سدیم آرسنیت با غلظت های مختلف (۱۰ و ۴ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) منجر به افزایش غلظت MDA می‌گردد. و تیمار با ویتامین C باعث مهار پراکسیداسیون لیپید و کاهش غلظت MDA می‌گردد. تاثیر عصاره بولاغ اوتی در کاهش غلظت MDA می‌تواند به واسطه ترکیبات فنلی به ویژه فلاوونوئیدها باشد. آنتی اکسیدان های فنلی (PhOH) با دادن سریع هیدروژن به رادیکال ها از اکسیداسیون لیپیدها و دیگر مولکول ها جلوگیری می‌کنند. واسطه های رادیکال فنوکسی (PhO) نسبتا پایدار هستند و به عنوان خاتمه دهنده واکنش‌های زنجیره ای رادیکال‌های آزاد عمل می کنند (۲). آرسنیک باعث کاهش معنی‌دار در فعالیت GPx، CAT و SOD در کبد، SOD و CAT در کلیه گردید. کاهش GPx در کلیه معنی‌دار نبود. SOD واکنش تبدیل O_2^- به H_2O_2 را کاتالیز می کند. بنابراین کاهش فعالیت SOD ممکن است کمک به افزایش تولید رادیکال سوپر اکسید بکند و افزایش تولید سوپر اکسید فعالیت کاتالاز را مهار می کند (۱۹). کبد مهمترین مکان متیلاسیون آرسنیک برای دتوکسیفیکاسیون آن است. دتوکسیفیکاسیون آرسنیک (تبدیل شدن آرسنیک به مونو متیل آرسنیک و دی متیل آرسنیک توسط S-آدنوزیل متیونین در حضور گلوتاتیون GSH) احتمالا باعث کاهش GSH و فعالیت آنزیم های وابسته به گلوتاتیون و افزایش استرس اکسیداتیو می‌گردد (۲۰و۱۴). علت عدم تغییر معنی دار در فعالیت آنزیم GPx کلیه احتمالا به دلیل تفاوت در مکانیسم های حفاظتی مختلف این دو ارگان در مواجهه با آرسنیک می‌تواند باشد (۲۱). تیمار با عصاره باعث افزایش فعالیت آنزیم‌ها به خصوص در کبد گردید. احتمالا گیاه بولاغ اوتی به دلیل دارا بودن ایزو تیوسیانات ها به ویژه فتیل ایزو تیوسیانات و تحریک فعالیت آنتی اکسیدان ها احتمالا باعث بهبود فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کبد گردیده است (۲۳و۲۲). غلظت OHdG-۸ کبد موش‌های دریافت کننده سدیم آرسنیت همراه با عصاره در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت که می تواند نشانگر نقش عصاره در پیشگیری از آسیب اکسیداتیو DNA باشد. این تغییرات در کلیه معنی دار نبود. سدیم آرسنیت با القا استرس اکسیداتیو و ایجاد گونه های فعال اکسیژن منجر به افزایش غلظت OHdG-۸ (از اکسیداسیون داکسی گوانوزین تولید می شود) می‌گردد (۱۶-۱۴). در سال های اخیر OHdG-۸ برای اندازه‌گیری آسیب اکسیداتیو DNA و فاکتور خطر برخی بیماری‌ها از جمله سرطان استفاده می‌شود (۲۴). دی متیل آرسنیک با اکسیژن مولکولی می تواند با تشکیل رادیکال هایی نظیر $(CH3)_2AS$ و آنیون‌های سوپر اکسید همراه باشد. رادیکال $(CH3)_2AS$ می‌تواند به مولکول دیگر اکسیژن وصل شده و تشکیل رادیکال $(CH3)_2Aso$ را بدهد که مواجهه با این رادیکال ها می تواند منجر به آسیب DNA گردد. هیپو متیلاسیون DNA نیز با توجه به کاهش S- آدنوزیل متیونین در دتوکسیفیکاسیون آرسنیک منجر به مهار ترمیم DNA یا القاء استرس اکسیداتیو می‌شود (۲۰). فیتوکمیکال هایی مثل کوئرستین، هیدروکسی نامیک اسید، لوتئین و بتا کاروتن اثرات آنتی پرولیفراتیو، پاکسازی کنندگی رادیکال ها، مهار کنندگی آنزیم های فاز I مثل سیتوکروم P450 دارند (۲۷-۲۵). که می‌توان برخی از خواص آنتی اکسیدانی ظاهر شده بولاغ اوتی در آسیب اکسیداتیو در مطالعه حاضر را به وجود این ترکیبات در آن نسبت داد. یافته های حاصل از مطالعات هیستوپاتولوژیکی بافت کبد و کلیه نشان داد که عصاره اثر حفاظتی بر این بافت ها را دارد و با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و محافظت از پر اکسیداسیون لیپیدی تغییرات ایجاد شده توسط سدیم آرسنیت را کاهش داده است؛ البته مطالعات بیشتر در زمینه شناسایی ترکیبات فعال بولاغ اوتی و سایر مکانیسم های تاثیر عصاره در افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و سایر فلاوونوئیدها در رابطه با حفاظت از آسیب اکسیداتیو DNA در بافت‌های مختلف ضروری است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های ما نشان می‌دهد که عصاره بولاغ اوتی نه تنها ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کبد را افزایش می‌دهد بلکه همچنین باعث کاهش

غلظت ۸–OHdG (شاخص آسیب اکسیداتیو DNA) در کبد می گردد. در اکثر موارد هر دو دوز منجر به تغییر معنی‌دار در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مالون دی‌آلدئید و ۸–OHdG گردیدند به غیر از GPx کبد و مالون دی‌آلدئید که فقط عصاره در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست منجر به افزایش آن‌ها گردد. که این مسئله احتمالا ناشی از وجود برخی ترکیبات مثل سلنیوم در بولاغ اوتی و نقش آن در فعالیت آنزیم‌های وابسته به سلنیوم از جمله گلوتاتیون پراکسیداز می تواند باشد. و با توجه به تغییرات اعمال شده در کلیه به نظر می‌رسد که عصاره اثرات حفاظتی کم در کلیه دارد و این ممکن است به دلیل اثرات حفاظتی مختلف بافت کبد و کلیه در مواجهه با آرسنیک باشد. در نهایت، مطالعات بیشتر و همچنین جداسازی عناصر و فراکشن های موثر بولاغ اوتی در مطالعات آینده توصیه می گردد.

References

1. Nordberg J. Arener ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; **31**(11): 1287-1312.
2. Valko M, Rhodes CJ, Monco J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interaction* 2006; **160**: 1-40.
3. Soengas P, Sotelo T, Velasco P, Cartea EM. Antioxidant properties of Brassica vegetables. *Functional Plant Science and Biotechnology* 2011; **5**(Special Issue 2): 43-55.
4. Gill CIR, Haldar S, Boyd LA, Bennett R, Whiteford J, Buler M, et.al. Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults. *Am J Nutr* 2007; **85**: 504-510.
5. Zargari A. *Medicinal Plants.* Tehran, Tehran University press, 1987; PP: 199-204.
6. Syed Alwi SS, Cavell BE, Telang U, Morris M.E, Parry BM, Packham G. In vivo modulation of 4E binding protein 1 (4E-BP1) phosphorylation by watercress: a pilot study. *British Journal of Nutrition* 2010: **104**(9): 1288-1296. doi: 10.1017/S0007114510002217. Epub 2010 Jun 15.
7. Boyd LA, McCann MJ, Hashim Y, Bennett RN, Gill CIR, Rowland IR. Assessment of the Antigen toxic, anti-proliferative, and anti-metastatic potential of crude watercress extract in human colon cancer cells. *Nutrition and Cancer* 2006; **55**(2): 232-241.
8. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randll RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**(1): 265-275.
9. Yagi K: Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. In: *Free Radicals in Diagnostic Medicine*.1st ed, New York, Plenum Press, 1994; PP: 1-15.
10. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; **105**: 121–126.
11. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; **34**: 497-500.
12. Paglia DE, Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; **70**: 158-169.
13. Odunola OA, Akinwumi KA, Ibegbu DM. The influence of garlic and spondias mombin on sodium arsenite induced clastogenicity and hepatotoxicity in rats. *The Pacific Journal of Science and Technology* 2011; **12**(2): 401-409.
14. Singh S, Rana SVS. Amelioration of arsenic toxicity by L-ascorbic acid in laboratory rat. *Journal of Environmental Biology* 2007; **28**(2): 377-384.
15. Bahramikia S, Yazdanparaet R. Effect of hydroalcoholic extract of Nasturtium Officinal leaves on lipid profile in high-fat diet rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2008; **115**: 116-121.
16. Ebadollahi Natanzi AR, Ghahramani MH, Monsef Esfahani HR, Minaei MB, Nazarian H, Sabzevari O. Evaluation of antihepatotoxic effect of watercress extract and its fractions in rats. *International Journal of Pharmacology* 2010; **6**(6): 896-902.
17. Mandal AK, Suubhankar D, Mukul KB, Rohini NC, Nirmalendu D. Hepatoprotective activity of liposomal flavonoid against arsenite-induced liver fibrosis. *JPET* 2006; **320**: 994-1001.
18. Usoh I.F, Akpan EJ, Etim EO, Faromb EO. Antioxidant actions of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. on sodium arsenite-induced oxidative stress in rats. *Pakistan Journal of Nutrition* 2005; **4**(3): 135-141.
19. Yamanaka K, Hoshino M, Okamoto M, Sawamura R, Hasegawa A. Induction of DNA damage by dimethyl arsine, a metabolite of inorganic arsenic is for the major part likely due to its peroxyl radical. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **168**: 58-64.
20. Roy P, Saha A. Metabolism and toxicity of arsenic: A human carcinogen. *Current Science* 2002; **82**(1): 38-45.
21. Maiti S, Chatterjee AK. Differential response of cellular antioxidant mechanism of liver and kidney to arsenic exposure and its relation to dietary protein deficiency. *Environ Tox Pharmacol* 2000; **8**: 227-235.
22. özen T. Investigation of antioxidant properties of *Nasturtium Officinale* (watercress) leaf extracts. *Acta Pol Pharm* 2009; **66**(2): 187-193.
23. Lynn A, Collins A, Fuller Z, Hillman K, Ratcliffe B. Cruciferous vegetables and colo-rectal cancer. *Proc Nutr Soc* 2006; **65**(1): 135-144.
24. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2_-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health Part C* 2009; **27**: 120–139.
25. Agualo G, Payrastre LG, Fernandez Y, Anciaux N, Demigne C, Remesy C. Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of

a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). *Cancer Lett* 1996; **105**: 61-70.

26. Ferguson LR, Zhu ST, Harris PJ. Antioxidants and anti-genotoxic effects of plant cell wall hydroxynnamic acid in cultured ht29 cells. *Mol Nutr Food Res* 2005; **49**(6): 585-593.

27. Zobel BLP, Bub A, Wollowski I, Rechkemmer G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis* 1997; **18**(9): 1847-1850.