زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره چهارم، تابستان ۱۴۰۲، صفحات ۱۷۶- ۱۶۷

مقاله پژوهشی

ارزیابی اثر محافظتی پیکوماریک اسید بر میزان TNF-α و بیلی‌روبین در اثر ضایعات ناشی از آسیب ایسکمی-رپرفیوژن کبدی در موش صحرایی

فرخنده پرویزی[1]، سید علی مرد[2*]، پریچهره یغمایی[1]، سید علی حائری روحانی[1]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات عفونی گوارش، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران

*مسئول مکاتبات: mard-sa@ajums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۸

DOI: 10.22034/ascij.2023.1967643.1442

چکیده

آسیب ایسکمی-رپرفیوژن کبد یک عارضه اصلی در بسیاری از مشکلات بالینی مانند برداشتن کبد، پیوند کبد و تروما است. پیکوماریک اسید از گروه پلی‌فنلی که از مشتقات سینامیک اسید حاصل شده، به‌دنبال ایسکمی-رپرفیوژن می‌تواند موجب کاهش اکسیداتیواسترس، انفارکتوس و آسیب عصبی در مغز می‌شود. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر محافظتی پیکوماریک اسید بر میزان TNF-α و بیلی‌روبین در اثر ضایعات ناشی از آسیب ایسکمی-رپرفیوژن کبدی در موش صحرایی انجام شد. در این مطالعه از ۴۰ موش در ۵ گروه ۸ تایی (گروه شم، گروه کنترل (NC)، گروه القای ایسکمی-رپرفیوژن (IR-CO)، گروه پیش درمان با پیکوماریک اسید (PC) و گروه پیکوماریک اسید با القای ایسکمی-رپرفیوژن (PC-IR) استفاده شد. گروه‌های شم و القای ایسکمی-رپرفیوژن، DMSO ۷ درصد (۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) دریافت کردند، گروه کنترل ۲ میلی‌لیتر/کیلوگرم نرمال سالین دربافت کرد، گروه پیش‌درمان با پیکوماریک اسید و پیکوماریک اسید با القای ایسکمی-رپرفیوژن، پیکوماریک اسید (۱۰۰ میلی-گرم/ کیلوگرم) را بصورت صفاقی و به مدت ۷ روز متوالی دریافت کردند. سپس گروه‌های شم، NC و PC لاپاراتومی شدند. گروه‌های PC-IR و IR-CO علاوه بر لاپاراتومی تحت ۴۵ دقیقه ایسکمی و ۶۰ دقیقه رپرفیوژن قرار گرفتند. نمونه خون برای آنالیز بیوشیمیایی آنزیم کبدی بیلی‌روبین و TNF-α برداشته شد. نتایج نشان داد که آسیب ایسکمی رپرفیوژن موجب اخلال در عملکرد کبد از طریق افزایش سطح بیلی‌روبین و TNF-α می‌شود. همچنین پیکوماریک اسید موجب کاهش سطح سرمی آنزیم کبدی بیلی‌روبین و TNF-α در بافت کبد شده است. پیکوماریک اسید سبب کاهش سطح آنزیم کبدی بیلی‌روبین و فاکتور التهابی TNF-α می‌شود. پیکوماریک اسید با خاصیت ضدالتهابی یک عامل بسیار قوی در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از ایسکمی-رپرفیوژن در بافت کبد می‌باشد.

کلمات کلیدی: پیکوماریک اسید، ایسکمی-ریپرفیوژن، کبد، بیلی‌روبین، TNF-α.

مقدمه

ایسکمی-رپرفیوژن کبد یکی از مشکلات اولیه جراحی پیوند کبد است و علت تقریباً ۴۰ درصد از نارسایی‌های پیوند کبد محسوب می‌شود (۸). ایسکمی-رپرفیوژن ناشی از جراحی کبد باعث صدمه

به سلول‌های کبدی و کولانژیوسیت‌ها می‌شود که سبب اختلال در جذب انتقال و ترشح اسیدهای صفراوی و در نتیجه کاهش سریع در جریان صفرا و کلستاز داخل کبدی می‌گردد (۱۴). آسیب ناشی از ایسکمی-رپرفیوژن در کبد بیان پمپ سدیم-پتاسیم را هم در کانالیکول‌های مجاری صفراوی و هم در غشای قاعده‌ای- جانبی کاهش می‌دهد و حجم سلول و ساختمان آن را در طی دوره بعد از عمل مختل می‌کند (۴). کبد، ارگانی است که انرژی فراوانی نیاز داشته و وابستگی زیادی به اکسیژن دارد. بنابراین حساس به هیپوکسی یا آنوکسی می‌باشد (۱۸). مطالعات در انسان‌ها و حیوانات نشان داده که دو فاز در طی آسیب ناشی از ایسکمی-رپرفیوژن کبدی رخ می‌دهد. یک فاز غیروابسته به نوتروفیل که به وسیله ROS میانجیگری می‌شود و دیگری آسیب وابسته به نوتروفیل است (۴). پاتوفیزیولوژی ناشی از آسیب ایسکمی-رپرفیوژن به دنبال کمبود اکسیژن ایجاد می-شود و ممکن است از طریق چند مسیر باعث صدمه به سلول شود (۵).

در صورت آسیب دیدگی کبد، بیلی روبین از کبد خارج شده و به خون نشت می‌کند. ورود مقدار زیادی بیلی روبین به جریان خون، می‌تواند باعث زردی شود. به عبارتی دیگر نشت بیلی روبین در خون باعث زرد شدن پوست و چشم ها می شود (۱۹). علائم زردی همراه با آزمایش خون بیلی روبین، می‌تواند به پزشک در تشخیص بیماری‌های کبدی کمک کند. آزمایش بیلی روبین خون یا TSB، میزان بیلی روبین در خون را اندازه گیری می کند (۲۲).

همچنین چند دقیقه بعد از رپرفیوژن کبدی TNF-α به عنوان سیتوکین‌های اولیه افزایش می‌یابند. TNF-α آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو را افزایش می‌دهد و باعث آپوپتوز در سلول‌های کبد می‌شود (۱۹). در طی رپرفیوژن، TNF-α باعث فعال شدن پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز همراه با آزاد شدن سیتوکروم- C به داخل سیتوپلاسم می‌شوند (۶).

به طورکلی TNF-α سیستم‌های کنترلی درگیر در تکثیر سلولی، تمایززایی، التهاب، مرگ و تنظیم ایمنی را فعال می کند، اگرچه سطح طبیعی پاسخ‌های ایمنی بسیار مهم است، اما تداوم واکنش ایمنی که در اثر تولید نابهنجار و بیش از حد آن ایجاد می‌شود میتواند سبب بعضی از بیماری‌های التهابی یا خودایمنی شود (۱۶). از بین بردن رادیکال‌های آزاد و افزایش بیان رسپتورهای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اندوژنیک از خواص آنتی‌اکسیدانی مانند پیکوماریک اسید است. حضور سلول‌های پیکوماریک اسید از گروه ترکیبات پلی‌فنلی که از مشتقات سینامیک اسید حاصل می‌شود و به طور بیولوژیکی از طریق مسیر شیکیمات از واکنش تیروزین و فنیل آلانین به عنوان پیش‌ساز سنتز می‌شود. ترکیبات فنلی در رژیم غذایی مختلف موجب کاهش خطر ابتلا به بیماری از جمله سرطان، دیابت و اختلالات قلبی برای مصرف کنندگان این رژیم‌ها می‌گردد (۲۱، ۹).

با توجه به آنچه بیان شد و از آنجا که عملکرد صحیح کبد از ملزومات ادامه حیات می‌باشد و تحت تاثیر آسیب‌های ناشی از ایسکمی-رپرفیوژن‌های گرم، مانند تروما، شوک و اعمال جراحی و ایسکمی-رپرفیوژن-های سرد مانند پیوند کبد قرار میگیرد، لذا بایستی به دنبال راهکارهای درمانی مناسب بود (۱۳).

از سوی دیگر متمایل شدن جهان پزشکی به سوی داروهای گیاهی کم عارضه و همچنین خلاء حضور یک داروی موثر جهت پیشگیری آسیب در پیوند کبد و سایر اعمال جراحی، پژوهشگران را بر آن داشت تا به ارزیابی اثر محافظتی پیکوماریک اسید بر میزان TNF-α و بیلی‌روبین در اثر ضایعات ناشی از آسیب ایسکمی-رپرفیوژن کبدی در موش صحرایی بپردازند.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی(آزمایشگاهی) بود که در سال ۱۳۹۸ و در مرکز تحقیقات، تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز و با مجوز کمیته اخلاق به شماره IR.IAU.DRE. REC.1397.130 انجام شد. از ٤٠ سر موش صحرایی سفید نر نژاد ویستار به تفکیک گروه‌های هشت‌تایی با محدوده وزنی ۲۰۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. پس از تصویب مطالعه به مکان اجرای مطالعه (مرکز تحقیقات، تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی) مراجعه نموده و موش صحرایی مناسب جهت انجام مطالعه دریافت شد. موش‌ها در شرایط استاندارد حرارتی ۲ ± ۲۲ درجه سانتیگراد، سیکل نوری ۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به غذای استاندارد قرار داشتند و ١٦-١٨ ساعت قبل از اجرای آزمایش، موش‌های صحرایی تحت گرسنگی قرار گرفتند، اما دسترسی آزاد به آب داشتند (۳).

پیکوماریک اسید مورد نیاز این مطالعه که بصورت پودر جامد بود، به جهت انحلال و قابلیت تزریق در حلال DMSO با دوز حداکثر ۷ درصد حل گردید. هر دو ماده از شرکت Sigma Aldrich خریداری شدند.

موش‌ها به ۵ گروه به شرح زیر تقسیم شدند:

۱-گروه شم: این گروه تنها حلال DMSO ۷ درصد را با دوز ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به مدت ۷ روز متوالی از طریق درون صفاقی بدون القای ایسکمی-رپرفیوژن دریافت کرد.در تمامی گروه ها تزریقات در صبح انجام میشد و عمل لاپاراتومی در روز هفتم یک ساعت پس از تزریق آخرین دوز صورت می‌گرفت. در این گروه اگرچه ایسکمی رپرفیوژنی صورت نگرفت اما ۱۰۵ دقیقه (مجموع زمان ایسکمی و رپرفیوژن) زمان تا اتانازی حیوان سپری شد.

۲-گروه کنترل: ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم سرم نرمال سالین به مدت ۷ روز متوالی از طریق درون صفاقی بدون القای ایسکمی-رپرفیوژن به این گروه تزریق شد.این گروه نیز شرایط تماما یکسانی با گروه شم داشت با این تفاوت که حلال پیکوماریک اسید را دریافت نکرد.

۳-گروه پیش‌درمان با پیکوماریک اسید (PC): پیکوماریک اسید با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و به حجم ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به مدت ۷ روز متوالی از طریق درون صفاقی بدون القای ایسکمی رپرفیوژن به این گروه تزریق شد. ٤-گروه پیکوماریک اسید با القای ایسکمی-رپرفیوژن (PC-IR): دریافت پیکوماریک اسید با دوز ۱۰۰ میلی-گرم/کیلوگرم و به حجم ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به مدت هفت روز متوالی از طریق درون صفاقی به همراه القای ایسکمی رپرفیوژن در این گروه صورت گرفت.نحوه القای ایسکمی-رپرفیوژن در ادامه به تفصیل شرح داده می‌شود.

۵-گروه القای ایسکمی-رپرفیوژن (IR-CO): به این گروه نیز حلال DMSO ۷ درصد (۲ میلی-لیتر/کیلوگرم) به مدت ۷ روز متوالی از طریق درون صفاقی تزریق شد و سپس تحت القای ایسکمی-رپرفیوژن قرار گرفتند.

نحوه القای ایسکمی: برای این کار ابتدا حیوان با ترازوی دیجیتالی توزین و سپس در حالی که پوست حیوان در ناحیه دو گوش با دست چپ نگه داشته می‌شد، با استفاده از سرنگ انسولین ترکیب مواد بیهوش کننده کتامین (٦٠ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین هیدروکلراید (۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) از طریق تزریق داخل صفاقی به حیوان تزریق شد (۲). فاصله زمانی این تزریق تا بیهوشی کامل حیوان بین سه تا چهار دقیقه بود. جهت بررسی و تعیین عمق بیهوشی، در حین انجام آزمایش هر ۱۰ دقیقه رفلکس عقب کشیدن پای حیوان توسط نیشگون گرفتن پنجه پا مشخص شد. در صورت مثبت بودن این رفلکس

دوز مکمل از مواد بیهوشی (یک سوم دوز اولیه) جهت حفظ بیهوشی کامل موش تزریق گردید. بعد از تراشیدن شکم و استریل نمودن با سرم نمکی و بتادین حیوان تحت عمل جراحی لاپاراتومی قرار گرفت. به این ترتیب که یک برش تقریباً ٤-۳ سانتیمتری از قسمت وسط شکم ایجاد شد، سپس روده‌ها با دقت خارج و با استفاده از سواب پنبه‌ای تا حد ممکن از حفره شکم دور نگه داشته شد تا ورید پورت و ساختمان های همراه آن نمایان شوند. بعد از آن لوب چهارمی کبد از لوب جانبی چپ با دقت جدا گردید تا تریاد پورت (ورید پورت، شریان کبدی و مجرای صفراوی) آشکار شود. جهت القای ایسکمی-رپرفیوژن یک کلمپ میکروواسکولار با دقت در پایه تریاد پورت یعنی پایین تر از محل منشعب شدن لوب میانی و چپ که تقریبا ۷۰ درصد از توده کبد را تشکیل می‌دهند، قرار گرفت. به این ترتیب یک ایسکمی نسبی ایجاد شد و کبد از رنگ طبیعی قرمز متمایل به قهوه‌ای، به قهوه‌ای کم رنگ تغییر رنگ داد. بعد از کلمپ نمودن روده‌ها به داخل حفره شکم برگردانده شدند و عضلات شکمی و پوست با نخ سیلک ۰-٤ بخیه شدند (۱). بعد از ٤٥ دقیقه ایسکمی، شکم حیوان را باز کرده کلمپ را برداشته و عضلات شکمی و سپس پوست شکم مجددا بخیه شد. سپس به حیوان اجازه داده شد که به مدت ٦۰ دقیقه تحت رپرفیوژن قرار بگیرد (۷).

در نهایت پس از بیهوشی عمیق حیوان به وسیله ماده بیهوشی، با ایجاد برشی در دیافراگم و خونگیری از بطن راست قلب، حیوان بدون درد یوتانازی شد.

اندازه‌گیری بیلی‌روبین: برای انجام آزمایش بیلی‌روبین ۱۰۰میکرولیتر از سرم در درون دستگاه تمام اتوماتیک اتوآنالیرز (Serum autoanalyser; BT-1500-A-A, Rome, Italy) قرار گرفت و سپس جذب نوری آنها در طول موج ٥٤۰ نانومتر به وسیله دستگاه اتوآنالیزر قرائت و ثبت شد. اندازه بیلی‌روبین غیرمستقیم از تفاوت میزان بیلی‌روبین کل از بیلی-روبین مستقیم بدست آورده شد.

اندازه‌گیری TNF-α: برای اندازه‌گیری از روش الایزا استفاده شد. به این منظور از کیت‌های اندازه‌گیری Mouse TNF-alpha ELISA Kit محصول شرکت ZellBio کشور آلمان استفاده شد.

روش اندازه‌گیری TNF-α به شرح زیر بود:

۱- استانداردها آماده‌سازی شدند. ۲- ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در هر چاهک ریخته شد. ۳- ٥۰ میکرولیتر از TNF-α آنتی‌رت بیوتینه به همه چاهک‌ها اضافه شد. ٤- بعد از ریختن آنتی‌بادی ۳ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد (پوشش پلاستیکی روی چاهک‌ها قرار گیرد). ٥- برداشتن پوشش و شستشو به روش زیر:

الف) آسپیره مایع از هر چاهک ب) ریختن۳ دهم میلی لیتر از محلول شستشو به داخل هر چاهک

ج) آسپیره کردن محتویات از چاهک‌ها

د) این عمل چند بار انجام شد.

٦- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استرپتوویدین به همه چاهک ها اضافه شد.

۷- پوشش پلاستیکی روی پلیت (چاهک‌ها) قرار گرفت و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد.

۸- شستشو مانند مرحله ٥

۹- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول TMB که آماده در کیت وجود داشت به همه چاهک ها اضافه شد.

۱۰- انکوباسیون در مدت ۱۲ تا ۱٥ دقیقه در تاریکی و در دمای محیط با فویل آلومینیومی روی پلیت‌ها پوشانده شد.

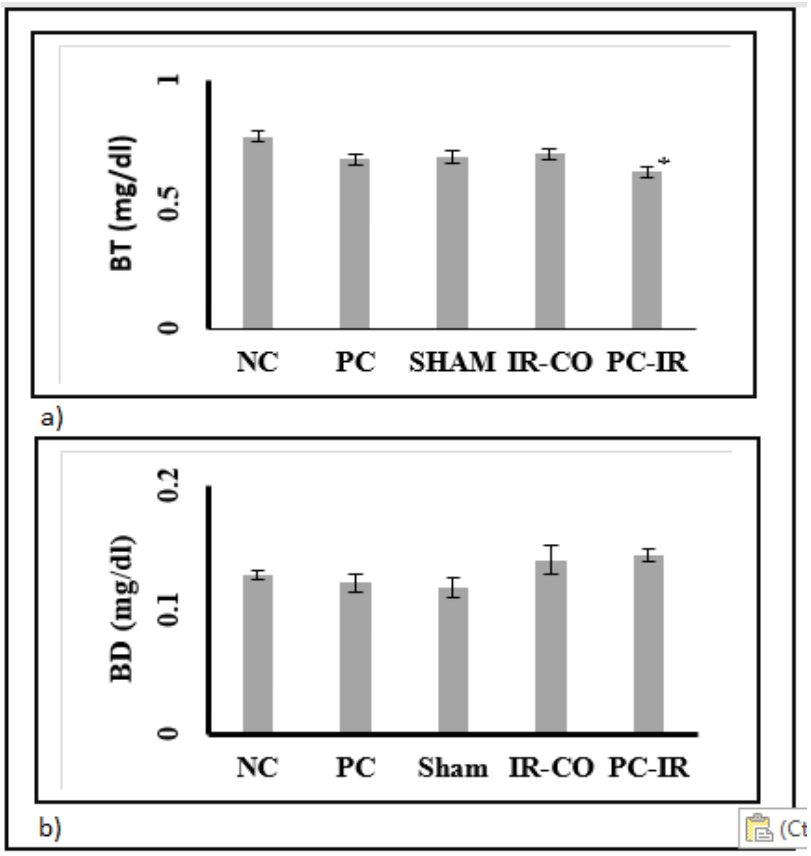
۱۱-۱۰۰ میکرولیتر H2SO4 به عنوان عامل متوقف کننده Stop Reagent به همه چاهک ها اضافه شد.

۱۲- با دستگاه (microplate Eliza Reader ELISA/reader ELx800, Biotek,America) با طول موج ٤٥٠ نانومتر خوانش انجام شد.

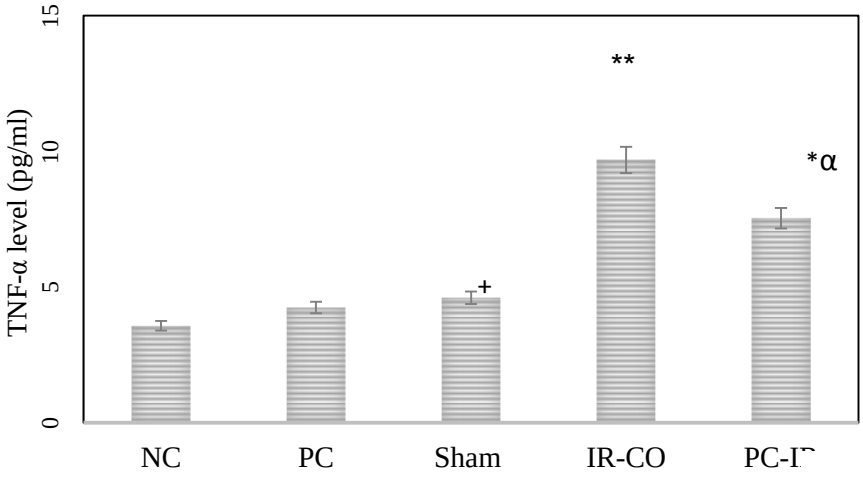
نتایج به صورت میانگین ± میانگین خطای استاندارد و با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه (آنوا) و توکی با کمک نرم‌افزار SPSS23 و در سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ مورد تحلیل قرار گرفت.

نتایج

در نمودار ۱ اثر پیکوماریک اسید بر میزان بیلی روبین توتال و بیلی‌روبین مستقیم در سرم نشان داده شده است. همانگونه که نمودار a-1 نشان می‌دهد، تیمار با پیکوماریک اسید (PC-IR) توانسته میزان بیلی‌روبین توتال (BT BT) را در مقایسه با گروهIR-CO به طور معنی داری کاهش دهد ($p < ۰/۰۵$ *). اگرچه سطح بیلی‌روبین در گروه IR-CO در مقایسه با دو گروه NC و شم اختلاف معناداری ندارد اما پس از تیمار با پیکوماریک اسید (PC-IR) میزان بیلی‌روبین توتال (BT) بطور معنی‌داری کاهش یافته است ($p < ۰/۰۵$ *). پیش درمان با پیکوماریک اسید (PC) نیز نتوانست به طور معنی‌دار سطح بیلی‌روبین توتال را کاهش دهد. نتایج نمودار (b-1) نیز حاکی از آن بود که سطح بیلی روبین مستقیم در گروه IR-CO در مقایسه با شم و NC افزایش معنی‌داری پیدا نکرده است و تیمار با پیکوماریک اسید در گروه‌های PC و PC-IR تغییر معناداری در میزان بیلی‌روبین مستقیم (BD) ایجاد نکرده است. نمودار ۲، نشان‌دهنده اثر پیکوماریک اسید بر میزان TNF-α در اثر ضایعات ناشی از آسیب ایسکمی-رپرفیوژن بود. نمودار ۲، نشان داد که سطح TNF-α در گروه IR-CO بطور معناداری در مقایسه با گروه شم و NC افزایش یافته ($p < ۰/۰۰۱$ ***).تجویز پیکوماریک اسید در گروه PC-IR توانسته به میزان معناداری مقادیر TNF-α را نسبت به گروه IR-CO کاهش دهد ($p < ۰/۰۱$ α). اگرچه درمان با پیکوماریک اسید در گروه PC-IR سطوح TNF-α را کاهش داده اما همچنان نتوانسته آن را سطح طبیعی در مقایسه با گروه‌های شم و NC بازگرداند ($p < ۰/۰۵$ *). گروه شم نیز در مقایسه با گروه NC دچار افزایش معنی‌دار سطح TNF-α گردیده ($p < ۰/۰۵$ +) که شاید بتوان دلیل این اتفاق را طولانی‌تر بودن زمان لاپاراتومی گروه شم (معادل زمان ایسکمی رپرفیوژن) دانست، چرا که حیوان مدت طولانی‌تری تحت استرس جراحی قرار گرفته است.



نمودار ۱- اثر پیکوماریک اسید بر میزان بیلی روبین توتال (BT) و بیلی روبین مستقیم (BD) در سرم



نمودار ۲- اثر درمانی پیکوماریک اسید برسطح TNF-α

گروه IR-CO در مقایسه با گروه شم و NC که به اختصار با علامت ***روی نمودار مشخص شده ($p < ۰/۰۰۱$)

گروه PC-IR در مقایسه با گروه IR-CO که به اختصار با علامت α روی نمودار مشخص شده ($p < ۰/۰۱$)

گروه PC-IR در مقایسه با گروه شم و NC که به اختصار با علامت *روی نمودار مشخص شده ($p < ۰/۰۵$)

گروه شم در مقایسه با گروه NC که به اختصار با علامت +روی نمودار مشخص شده ($p < ۰/۰۵$)

بحث

IR کبدی معمولا به دنبال جراحی‌های پیوند کبد، برداشتن بافت کبد، هیپوکسی بعلت خونریزی، سپسیس، نارسایی احتقانی قلب، تروما و نارسایی تنفسی ایجاد می‌شود. آسیب IR کبدی یک فرآیند پیچیده است که آسیب سلولی در هر دو مرحله ایسکمیک و خونرسانی مجدد اتفاق می‌افتد. نتیجه نهایی مرگ سلولی از طریق ترکیبی از آپوپتوز و نکروز است. آسیب ایسکمیک گرم هنگامی ایجاد می شود که خون رسانی به کبد در دمای طبیعی بدن قطع شود، همانطور که در عمل برداشتن کبد اتفاق می‌افتد (۱۱). آسیب ایسکمیک سرد در حین پرفیوژن و ذخیره سازی کبد در پیوند ایجاد می‌شود. در طول ایسکمی–رپرفیوژن سلول‌های کوپفر که در تولید اولیه ROS نیز نقش کلیدی بر عهده دارند، موجب آزادسازی TNF-α و interleukin-1 می‌شود که جز اولین سایتوکاین‌هایی هستند که در دقایق ابتدایی پس از برقراری رپرفیوژن آزاد می‌شوند. این دو سایتوکاین همچنین موجب افزایش کموکاین‌ها و مولکول‌های چسبنده جاذب نوتروفیل به کبد نیز می‌باشند که مسئول آسیب‌های فاز تاخیری ناشی از ایسکمی–رپرفیوژن هستند (۱۰). در مطالعه خیری و همکاران (۲۰۱۹) نتایج نشان داد که افزایش قابل توجهی در پراکسیداسیون لیپیدها (پارامترهای سیتوکین TNF-α) در بافت قلب موش‌های صحرایی که دچار آسیب حاد ریوی شده‌اند، اتفاق افتاده است. پیکوماریک اسید این پارامتر را بهبود بخشیده و آن را در سطح قلب کنترل می‌کند (۱۰). ایسکمی– رپرفیوژن منجر به فعال شدن آبشاری از سیتوکین‌ها مانند TNF-α می‌شود که در شروع پاسخ التهابی سیستمیک نقش کلیدی ایفا می‌کند. سیتوکین‌های التهابی از جمله TNF-α پروتئین ترشحی کوچکی می باشند که نقش واسطه در کنترل التهاب دارند. طبق پژوهش مظفری گودرزی و همکاران پیکوماریک اسید سبب کاهش مقدار TNF-α در بافت کلیه شد (۱۳). این نتایج با مطالعه حاضر در مورد اثر پیکوماریک اسید بر TNF-α همخوانی دارد.

اورفالیگو و همکاران (۲۰۱۷) در کبد موش‌های تحت درمان با پیکوماریک اسید، سطح TNF-α به طور قابل توجهی کاهش یافت. در نتیجه پیکوماریک اسید و الاژیک اسید دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی بوده و در ترکیب باهم قوی‌تر عمل می‌کنند (۲۰). نتیجه این مطالعه با مطالعه حاضر همسو بود.

سابیتا و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای نشان دادند که پیکوماریک اسید با مهار تولید سیتوکین‌های التهابی مثل TNF-α در آسیب کلیوی ناشی از مصرف اتانول موثر است (۱۷). نتیجه این مطالعه نیز با یافته‌های پژوهش حال حاضر همخوانی دارد.

در مطالعه پراگاسام و همکاران (۲۰۱۳) افزایش پاسخ‌های ایمنی با واسطه سلولی و شاخص فاگوسیتیک ماکروفاژ در موشهای شاهد پس از درمان با پیکوماریک اسید حاکی از خاصیت سرکوب کنندگی سیستم ایمنی داشت، در حالی‌که سطح ایمونوگلوبولین سرم به واسطه تجویز پیکوماریک اسید افزایش یافت (۱۵).

پیکوماریک اسید شواهد محکمی از خاصیت ضد التهابی نشان داد که مکانیسم احتمالی آن مهار سیگنالینگ آزادسازی و کاهش بیان مدیاتورهای التهابی مانند TNF-α و کمپلکس‌های ایمنی در گردش می‌باشد. در نتیجه پیکوماریک اسید به عنوان یک عامل سرکوب کننده سیستم ایمنی در درمان بیماری‌های التهابی خود ایمنی موثر می‌باشد. همچنین پس از اعمال جراحی پیوند اعضا به منظور سرکوب سیستم ایمنی می‌تواند کمک کننده باشد.

لی و همکاران (۲۰۰۸) مطالعه‌ای تحت عنوان اثر حفاظتی Sasa و پیکوماریک اسید بر سمیت کبدی

ناشی از مصرف اتانول انجام دادند. در این مطالعه موش‌ها تحت تزریق درون صفاقی اتانول به صورت دوره‌های ۱۲ ساعته (۳ مرتبه) قرار گرفتند. ۳ ساعت پس از آخرین تزریق، سمیت کبدی بر اساس فعالیت های سرمی AST، ALT، تیوباربیتوریک و گلوتاتیون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پیکوماریک اسید به طور موثر می‌تواند موجب جلوگیری از سمیت کبدی ناشی از مصرف اتانول شود و در نتیجه می‌تواند برای پیشگیری از بیماری-های کبدی ناشی از سوء مصرف اتانول مفید باشد (۱۲). این نتایج با یافته‌های مطالعه فوق هم‌خوانی دارد.

با توجه به مطالعات گذشته و حاضر می‌توان چنین استنباط کرد که پیکوماریک اسید با حفظ تمامیت غشا و وجود یون OH در ساختار شیمیایی خود احتمالا باعث کاهش رهایی بیلی‌روبین و تعدیل سطح این آنزیم در سرم می‌شود.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که پیکوماریک اسید سبب بهبود سطح بیلی‌روبین و کاهش فاکتور التهابی TNF-α می‌شود. پیکوماریک اسید با خاصیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی یک عامل بسیار قوی در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از ایسکمی-رپرفیوژن در بافت کبد می‌باشد.

منابع

1. Abe Y., Hines I.N., Zibari G., Pavlick K., Gray L., Kitagawa Y. 2009. Mouse model of liver ischemia and reperfusion injury: method for studying reactive oxygen and nitrogen metabolites in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(1):1-7.

2. Ali M.S., Neisi N., Darbor M., Hassanpour M., Makvandi M., Solgi G. 2012. β-carotene protects the gastric mucosa against ischemia-reperfusion injury in rats. *European Cytokine Network*, 23(4):173-178.

3. Arda-Pirincci P., Bolkent S., Yanardag R. 2006. The role of zinc sulfate and metallothionein in protection against ethanol-induced gastric damage in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 51(12): 2353-2360.

4. Benkoel L., Dodero F., Hardwigsen J., Mas E., Benoliel A.M., Botta-Fridlund D., 2004. Effect of Ischemia—Reperfusion on Na+, K+-ATPase Expression in Human Liver Tissue Allograft: Image Analysis by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Digestive Diseases and Sciences*, 49(9):1387-1393.

5. Bilzer M., Gerbes A.L. 2000. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *Journal of Hepatology*, 32(3):508-15.

6. Drake R, Vogl AW, Mitchell AW. 2009. Gray's Anatomy for Students E-Book: Elsevier Health Sciences.

7. El-Bahy A.A., Kassem L.A., Heikal O.A., Mahran L.G. 2011. Antiapoptotic effect of DDB against hepatic ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Toxicological Sciences*, 36(2):145-154.

8. Isenberg J.S., Maxhimer J.B., Powers P., Tsokos M., Frazier W.A., Roberts D.D. 2008. Treatment of liver ischemia–reperfusion injury by limiting thrombospondin-1/CD47 signaling. *Surgery*, 144(5):752-761.

9. Johnson I. 2002. Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. Food and chemical toxicology, 40(8):1171-1178.

10. Kheiry M., Dianat M., Badavi M., Mard S.A., Bayati V. 2019. p-Coumaric acid protects cardiac function against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by attenuation of oxidative stress. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(8):949.

11. Klune J.R., Tsung A. 2010. Molecular biology of liver ischemia/reperfusion injury: established mechanisms and recent advancements. *Surgical Clinics*, 90(4):665-677

12. Lee S.I., An S.M., Mun G.I., Lee S.J., Park K.M., Park S.H. 2008. Protective effect of Sasa quelpaertensis and p-coumaric acid on ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 51(4):148-154.

13. Mozaffari Godarzi S., Valizade Gorji A., Gholizadeh B., Mard S.A., Mansouri E. 2020. Antioxidant effect of p-coumaric acid on interleukin 1-β and tumor necrosis factor-α in rats with renal ischemic reperfusion. *Nefrología*, 40(3):311-319.

14. Nieuwenhuijs V.B., de Bruijn M.T., Schiesser M., Morphett A., Padbury R.T., Barritt G.J. 2007. Ischemic preconditioning and intermittent ischemia preserve bile flow in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Digestive Ddiseases and Sciences*, 52(5):1159-1167.

15. Pragasam S.J., Venkatesan V., Rasool M. 2013. Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. *Inflammation*, 36(1):169-176.

16. Ruoquan Y., Wanpin N., Qiangsheng X., Guodong T., Feizhou H. 2014. Correlation between plasma miR-122 expression and liver injury induced by hepatectomy. *Journal of International Medical Research*, 42(1):77-84.

17. Sabitha R., Nishi K., Gunasekaran V.P., Annamalai G., Agilan B., Ganeshan M. 2019. p-Coumaric acid ameliorates ethanol–induced kidney injury by inhibiting inflammatory cytokine production and NF–κB signaling in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 9(5):188.

18. Teoh N.C. 2011. Hepatic ischemia reperfusion injury: contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection—the good, bad and deadly. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26:180-187.

19. Tian Y., Jochum W., Georgiev P., Moritz W., Graf R., Clavien P.A. 2006. Kupffer cell-dependent TNF-α signaling mediates injury in the arterialized small-for-size liver transplantation in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12):4598-4603.

20. Urfalioğlu A., Yazar F.M., Bilal B., Tolun F.İ., Öksüz H., Boran Ö.F. 2017. The effect of p-coumaric acid and ellagic acid on the liver and lungs in a rat model of sepsis. *Asian Biomedicine*, 11(3):217.

21.Yang C.S., Landau J.M., Huang M.T., Newmark H.L. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21(1):381-406.

22. Zang L.Y., Cosma G., Gardner H., Shi X., Castranova V., Vallyathan V. 2000. Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279(4):C954-C960.

Evaluation of the Protective Effect of P-Coumaric Acid on the Level of TNF-α and Bilirubin due to Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

Farkhondeh Parvizi [1], Seyed Ali Mard[2*], Parichehreh Yaghmaei[1], Seyed Ali Haeri Rohani[1]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Alimentary Tract Research Center, Physiology Research Center, Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Abstract

Liver ischemia-reperfusion injury is a major complication in many clinical problems such as liver resection, liver transplantation, and trauma. p-coumaric acid from the polyphenol group obtained from cinnamic acid derivatives can reduce oxidative stress, infarction and nerve damage in the brain after ischemia-reperfusion. The present study was conducted with the aim of evaluating the protective effect of p-coumaric acid on the level of TNF-α and bilirubin due to lesions caused by liver ischemia-reperfusion injury in rats. In this study, out of 40 rats in 5 groups of 8 (sham group, control group (NC), induction of ischemia-reperfusion (IR-CO), pretreatment group with p-coumaric acid (PC) and group of p-coumaric acid with induction of ischemia-reperfusion. (PC-IR) was used. The sham and ischemia-reperfusion induction groups received 7% DMSO (2 ml/kg), the control group received 2 ml/kg of normal saline, and the pretreatment group with p-coumaric acid. and p-coumaric acid by inducing ischemia-reperfusion, they received p-coumaric acid (100 mg/kg) intraperitoneally for 7 consecutive days. Then sham, NC and PC groups underwent laparotomy. PC-IR and IR-CO groups in addition to laparotomy They were subjected to 45 minutes of ischemia and 60 minutes of reperfusion. Blood samples were taken for the biochemical analysis of liver enzymes, bilirubin and TNF-α. The results showed that ischemia-reperfusion injury causes liver function disorders by increasing the level of bilirubin and TNF-α. Also, p-coumaric acid has decreased the serum level of bilirubin and TNF-α in the liver tissue. Picoumaric acid has decreased the level of bilirubin and inflammatory factor TNF-α. p-coumaric acid with anti-inflammatory properties is a very strong agent against oxidative damage caused by ischemia-reperfusion in liver tissue.

Keywords: P-Coumaric Acid, Ischemia-Reperfusion, Liver, Bilirubin, TNF-α.