

## مطالعه اثرات محافظتی کروسین بر آسیب ایسکمی-بازخونسانی تجربی کبد در موش صحرایی

بهرام عمواغلی تبریزی<sup>۱\*</sup>، داریوش مهاجری<sup>۲</sup>

۱- دانشیار گروه آموزشی علوم درمانگاهی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استاد گروه آموزشی پاتوبیولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات: b\_tabrizi@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۴/۳/۱۴ پذیرش نهایی: ۹۴/۶/۲۸)

### چکیده

خونسانی مجدد پس از ایسکمی ممکن است باعث بروز آسیب‌های متابولیکی و ساختاری در کبد شود. هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر کروسین بر آسیب ایسکمی-بازخونسانی کبد در موش‌های صحرایی بود. بدین منظور ۴۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار به طور تصادفی به چهار گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند: ۱- گروه شاهد: موش‌های دستکاری نشده؛ ۲- گروه کنترل جراحی: موش‌هایی که تحت جراحی به جز ایسکمی-بازخونسانی قرار گرفته و نرمال سالی‌ن دریافت کردند؛ ۳- گروه ایسکمی-بازخونسانی: موش‌هایی که ۴۵ دقیقه تحت ایسکمی، سپس ۴۵ دقیقه دیگر در معرض خونسانی مجدد کبد قرار گرفتند؛ ۴- گروه ایسکمی-بازخونسانی و تیمار با کروسین: موش‌هایی که با کروسین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) مورد پیش‌درمانی قرار گرفتند. موش‌ها پس از اخذ نمونه‌های خون و بافت کبد آسان‌کشی شدند. آلانین آمینو ترانسفراز، آسپاراتات آمینو ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز سرم اندازه‌گیری شد. مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز در هموژنات بافت کبد اندازه‌گیری شد. همچنین، آسیب‌شناسی بافتی کبد توسط میکروسکوپ نوری انجام شد. در گروه ۴، کروسین به طور معنی‌داری ( $p < 0.001$ ) میزان افزایش یافته آنزیم‌های شاخص آسیب کبد را کاهش و به طور معنی‌داری ( $p < 0.001$ ) میزان پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش و سطوح کاهش یافته آنتی‌اکسیدان‌های کبد را افزایش داد. آسیب بافتی به طور معنی‌داری در کبد‌های تیمار شده با کروسین کاهش پیدا کرد. این نتایج نشان می‌دهد که کروسین با خواص آنتی‌اکسیدانی خود، دارای اثرات محافظتی در برابر آسیب ایسکمی-بازخونسانی کبد بوده و انتخاب مناسبی برای درمان آسیب‌های مرتبط با ایسکمی-بازخونسانی کبد می‌باشد.

کلید واژه‌ها: کروسین، ایسکمی-بازخونسانی، کبد، موش صحرایی.

**مقدمه**

تدافعی موثری در برابر بیماری‌های مختلف قلمداد می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که در صورت وجود در غذاها و بدن، حتی در مقادیر ناچیز، می‌توانند بدن را در مقابل انواع مختلف آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن محافظت کنند (Sanches-Moreno *et al.*, 1999).

کروسین (crocin) به عنوان یک کاروتنوئید گلیکوزیده دارای اثرات فارماکولوژیک متعدد از جمله محافظت از آسیب ناشی بیماری‌های قلبی-عروقی (Xiang *et al.*, 2006)، جلوگیری از پرولیفراسیون سلول‌های توموری (Magesh *et al.*, 2006)، محافظت از سیستم عصبی (Ahmad *et al.*, 2005) و محافظت از هیپاتوسیت‌ها (Tseng *et al.*, 2005) می‌باشد. در هر صورت، در بین مکانیسم‌های محافظتی مختلف، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کروسین مسئول اثرات فارماکولوژیک آن قلمداد شده است (Chen *et al.*, 2008).

بررسی‌های انجام شده توسط حسین‌زاده و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان داده است که کروسین قادر است بافت کلیه موش‌های صحرایی را در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از ایسکمی-بازخونسازی به طور کامل محافظت کند (Hosseinzadeh *et al.*, 2005). مطالعات انجام شده توسط زنگ و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داده است که کروسین آسیب اکسیداتیو-نیترا تیو ناشی از خونرسازی مجدد را در بافت مغز کاهش می‌دهد (Zheng *et al.*, 2007). حسین‌زاده و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که کروسین آسیب ناشی از ایسکمی-بازخونسازی را در

خونرسازی مجدد پس از ایسکمی کبد ممکن است به آسیب متابولیک و ساختاری آن منجر شود. آسیب ایسکمی-بازخونسازی کبد ممکن است به علت تروما، عفونت، پیوند کبد (Shin *et al.*, 2008) و یا بستن ساقه کبدی در طی اعمال جراحی کبد (van Gulik *et al.*, 2007) ایجاد شود. این آسیب به عنوان مشکلی جدی برای اعمال جراحی کبد مطرح می‌باشد که باعث ایجاد محدودیت در اعمال جراحی پیوند کبد می‌گردد (He *et al.*, 2005).

رادیکال‌های آزاد اکسیژن که در برقراری مجدد جریان خون تولید می‌شوند، نقش مهمی را در آسیب ناشی از ایسکمی-بازخونسازی بر عهده دارند (Hassan-Khabbar *et al.*, 2008). رادیکال‌های فعال اکسیژن منجر به یک پاسخ التهابی و آسیب بافتی با فعال کردن برخی از واسطه‌ها می‌شوند. این رادیکال‌ها همچنین می‌توانند به طور مستقیم به محتویات و اجزای سلولی آسیب برسانند (Montalvo-Jave *et al.*, 2008). تلاش‌های فراوانی برای کاهش آسیب ایسکمی-بازخونسازی انجام شده است. حفاظت در برابر آسیب خونرسازی مجدد را می‌توان با درمان‌های مناسب از جمله کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها و داروهای ضد التهابی اجرا نمود (Polat *et al.*, 2008; Pulitano *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2008).

شرایط پاتولوژیک نظیر سرطان‌ها، پیری، بیماری‌های قلبی-عروقی، ایسکمی و آماس در تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن دخیل هستند (Barber and Harris, 1994; Das and Maulik, 1994). بنابراین، از بین بردن گونه‌های رادیکال اکسیژن یک راهکار

شدند: ۱- گروه شاهد: در مورد موش‌های این گروه هیچ‌گونه مداخله جراحی و دستکاری کبد انجام نشد؛ ۲- گروه شاهد جراحی: موش‌های این گروه مشابه با گروه ایسکمی-بازخونرسانی تحت عمل جراحی قرار گرفته ولی متحمل ایسکمی-بازخونرسانی کبد نشدند. این موش‌ها به مدت برابر با گروه ایسکمی-بازخونرسانی (۴۵ دقیقه ایسکمی و ۴۵ دقیقه بازخونرسانی) تحت بیهوشی قرار گرفته و قبل از القا ایسکمی، نرمال سالین را به طور داخل صفاقی دریافت کردند؛ ۳- گروه ایسکمی-بازخونرسانی: موش‌های این گروه تحت عمل جراحی قرار گرفته و به مدت ۴۵ دقیقه تحت ایسکمی، سپس ۴۵ دقیقه دیگر تحت خونرسانی مجدد کبد قرار گرفتند؛ ۴- گروه ایسکمی-بازخونرسانی و تیمار با کروسین: موش‌های این گروه تحت عمل جراحی قرار گرفته و به مدت ۴۵ دقیقه تحت ایسکمی، سپس ۴۵ دقیقه دیگر تحت خونرسانی مجدد کبد قرار گرفتند. این موش‌ها کروسین (Fluka Chemicals, UK) را با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور داخل صفاقی ۱۵ دقیقه قبل از القا ایسکمی دریافت کردند. میزان و روش مصرف کروسین بر اساس مطالعات قبلی در مورد تاثیر کروسین بر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی کلیه در موش صحرایی انتخاب شد ( Hosseinzadeh *et al.*, 2005). مدت زمان القاء ایسکمی در بافت کبد نیز بر اساس مطالعه گدیک و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مورد تاثیر رزوراترول بر استرس اکسیداتیو و تغییرات بافتی ناشی از آسیب ایسکمی-بازخونرسانی کبد در موش صحرایی انتخاب شد ( Gedik *et al.*, 2008). در این مطالعه کلیه ملاحظات اخلاقی و

عضله اسکلتی موش صحرایی کاملاً بهبود می‌بخشد (Hosseinzadeh *et al.*, 2009).

با بررسی منابع مشخص شده است که تاکنون مطالعه‌ای در مورد تاثیر محافظتی کروسین در برابر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی کبد در موش صحرایی انجام نشده است. بنابراین، مطالعه حاضر برای اولین بار جهت ارزیابی اثرات محافظتی کبد در برابر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی کبد انجام می‌گردد.

با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی کروسین، این ماده احتمالاً توانایی آن را خواهد داشت که بتواند کبد را از آسیب‌های ناشی از تنش‌های اکسایشی در خونرسانی مجدد پس از ایسکمی محافظت کند.

با انجام این مطالعه خاصیت دارویی کروسین در محافظت از بافت کبد در شرایط ایسکمی-بازخونرسانی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد که در صورت تائید می‌تواند به عنوان یک منبع قابل دسترس با خاصیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی بود و در سال ۱۳۹۴ در محل مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز انجام شد. برای انجام این مطالعه، از ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی  $20 \pm 200$  گرم و در محدوده سنی ۹ هفته استفاده شد. شرایط تغذیه و نگهداری برای تمام گروه‌ها یکسان و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای  $21 \pm 2$  درجه سلسیوس بود. جیره غذایی یکسان و آب نیز به‌طور آزاد در دسترس قرار گرفته و پس از یک هفته عادت به شرایط جدید، آزمایش شروع شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به ۴ گروه مساوی تقسیم

توسط دستگاه هموژنایزر به مدت ۱/۵ دقیقه تحت عمل هموژناسیون قرار گرفت. هموژنات بافتی پس از صاف شدن با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شده و محلول شناور (supernatant) جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی (LPO) از طریق اندازه گیری مقدار مالون دی آلدئید (malondialdehyde; MDA) و همچنین برای اندازه گیری فعالیت آنزیم های آنتی-اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (superoxide SOD; dismutase; CAT)، کاتالاز (glutathione peroxidase; GPX) و گلوکوتاتیون ردوکتاز (glutathione reductase GR) مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم های آنتی-اکسیدانی مورد مطالعه و میزان MDA با استفاده از کیت های تجاری موجود (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China) و طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده کیت انجام شد. مقدار MDA بافتی به صورت نانومول مالون دی آلدئید (nmol) در میلی گرم پروتئین و فعالیت آنتی اکسیدانی به صورت واحدهای قراردادی در میلی گرم پروتئین عنوان گردید.

پراکسیداسیون چربی در بافت کبد با روش رنگ-سنجی (colorimetrically) به وسیله اندازه گیری TBARS (thiobarbituric acid reacting substances) طبق روش فراگا و همکاران در سال ۱۹۸۸ انجام شد (Fraga et al., 1988). به طور خلاصه: ۰/۱ میلی لیتر هموژنات بافتی با ۲ میلی لیتر معرف (Thiobarbituric acid; TBA-trichloroacetic acid, TCA-HCl) (۳۷٪ TBA، ۲۵/۰٪

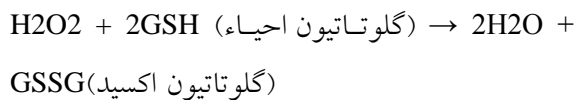
پروتکل های کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی بود.

برای انجام جراحی، موش ها با تزریق داخل صفاقی کتامین هیدرو کلراید ۱۰۰ mg/kg و زایلازین ۱۰۰ mg/kg ۲۰ بیهوش شدند. بعد از تراش موها و ضد عفونی پوست ناحیه شکم، برش خط وسط (midline incision) ایجاد شد. پس از آشکارسازی ناف کبد، سرخرگ مشترک کبدی (common hepatic artery) و سیاهرگ پورتال (portal vein) مشخص و به مدت ۴۵ دقیقه به وسیله گیره های نان تروماتیک عروقی مسدود شدند. پس از برداشتن گیره ها و رفع انسداد، خونرسانی مجدد به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد (Gedik et al., 2008).

جهت اندازه گیری برخی فاکتورهای بیوشیمیایی شامل آلانین آمینو ترانسفراز، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (Reitman and Frankel, 1957) و لاکتات دهیدروژناز (Martinek, 1972)، ۵ میلی لیتر خون از آئورت شکمی موش ها اخذ گردید.

برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی در بافت کبد، موش ها به آسانی با تزریق دز بالای پنتوباریتال سدیم (sodium pentobarbital) کشته شدند. کبد موش ها سریعاً خارج و به دو قسمت تقسیم شد. یک قسمت در سالین بسیار سرد شستشو و از آن هموژنات ۱۰٪ (یک حجم بافت در ۹ حجم بافر هموژناسیون) تهیه شد. به این صورت که، قطعات بافت کبد در ۱۵۰ میلی لیتر بافر هموژناسیون (۲۰ Tris-HCl میلی مول، pH=۷/۸ حاوی استات منیزیم و کلرید پتاسیم ۳۰ میلی مول و سوکروز ۰/۲۵ مول) ریخته شد، سپس

۲۴۰ nm اندازه‌گیری شد. در نهایت نتیجه به شکل "فعالیت کاتالاز در دقیقه" محاسبه گردید. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از روش روتراک و همکاران (Rotruck *et al.*, 1973) و بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت.



گلوتاتیون پراکسیداز، در هموژنات بافتی، گلوتاتیون را اکسیده کرده که به طور هم زمان پراکسید هیدروژن به آب احیاء می‌گردد. این واکنش پس از ۱۰ دقیقه توسط تری‌کلرواستیک اسید متوقف و گلوتاتیون باقیمانده توسط محلول دی‌تیوبیس نیتروبنزوئیک اسید (Dithiobis nitrobenzoic acid; DTNB) مجدداً فعال گردیده و منجر به تشکیل ترکیب رنگی می‌گردد که با اسپکتروفتومتر در ۴۲۰ nm اندازه‌گیری می‌شود. مخلوط واکنشگر متشکل از ۰/۲ میلی‌لیتر اتیلن دی‌آمین تترا-استیک اسید (ethylenediamine) ۰/۸ mM (tetra-acetic acid; EDTA)، ۰/۱ میلی‌لیتر آزید سدیم (sodium azide) ۱۰ mM، ۰/۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۲/۵ mM و ۰/۲ میلی‌لیتر هموژنات بود که در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد متوقف و لوله‌ها با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۳ میلی‌لیتر دی‌سدیم هیدروژن ۰/۸ mM و ۰/۱ میلی‌لیتر DTNB ۰/۰۴ درصد به محلول شناور افزوده شد و بلافاصله رنگ حاصله در ۴۲۰ nm اندازه‌گیری شد. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز به

مول HCL و ۱۵٪ TCA، به نسبت ۱:۱:۱) مخلوط و پس از ۱۵ دقیقه قرارگیری در بن ماری جوشان، خنک گردید و در ۳۵۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. شدت جذب محلول رویی شفاف در ۵۳۵ nm در مقابل بلانک اندازه‌گیری گردید. مقادیر به صورت نانومول بر ۱۰۰ گرم بافت بیان شدند.

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز توسط روش نیشیکیمی و همکاران تعیین گردید (Nishikimi *et al.*, 1972). در حدود ۵ میکروگرم از پروتئین‌های تام هر یک از هموژنات‌های کبد با بافر پیروفسفات سدیم، فنازین متوسولفات (phenazine PMT; methosulfate; Nitro-blue) و نیترو-بلو تترازولیوم (Tertazolium; NBT) مخلوط گردید. واکنش با افزودن نیکوتین آمید-آدنن دی‌نوکلئوتید (Nicotinamide-adenine dinucleotide; NADH) آغاز شد. مخلوط واکنش در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه انکوبه و با افزودن ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال متوقف گردید. شدت جذب مخلوط رنگزای تشکیل شده در ۵۶۰ nm اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به صورت غلظت آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از تولید رنگ تا ۵۰ درصد در ۱ دقیقه، تحت شرایط مطالعه، تعیین گردید.

فعالیت کاتالاز توسط روش کلابورن و بر اساس تجزیه پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ nm، مورد سنجش قرار گرفت (Claiborne, 1985). به‌طور خلاصه، مخلوط مورد سنجش متشکل از ۱/۹۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۰۵ M, pH= ۷)، ۱ میلی‌لیتر پرکسید هیدروژن (۰/۰۱۹ M) و ۰/۰۵ میلی‌لیتر PMS (۱۰٪) در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر بود. تغییرات در جذب، در

صورت میلی گرم پروتئین/دقیقه/میکرومول گلوتاتیون اکسید بیان گردید.

فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز با استفاده از روش مهنداس و همکاران (Mohandas *et al.*, 1984) بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت.



در حضور گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون اکسیده، احیاء گردیده و هم زمان، NADPH به NADP<sup>+</sup> اکسیده می شود. فعالیت آنزیم در دمای اتاق و با ناپدید شدن میزان NADPH در دقیقه با اندازه گیری اسپکتروفتومتری کاهش جذب نوری در ۳۴۰nm تعیین گردید.

برای آسیب شناسی بافتی، قسمت باقی مانده بافت کبد در فرمالین بافر ۱۰ درصد پایدار شد. از نمونه های فوق با استفاده از شیوه های رایج پاساژ بافت و تهیه مقاطع هیستوپاتولوژی، برش هایی با ضخامت ۵ میکرون و با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین تهیه شد (Lee and Luna, 1988). شدت آسیب کبد بر اساس یک مقیاس نیمه کمی (semiquantitative scale) و دوسو کور طبق روش ارائه شده توسط فری و همکاران در سال ۱۹۸۴ ارزیابی گردید. شدت آسیب، از صفر تا ۴ (صفر: عدم وجود آسیب، ۱: حداقل آسیب، ۲: آسیب ملایم، ۳: آسیب متوسط و ۴: آسیب شدید) رتبه بندی شد (Frei *et al.*, 1984). کلیه درجه بندی ها با بزرگنمایی ۱۰۰× و در ۵ میدان میکروسکوپی از هر برش، به طور تصادفی، با میکروسکوپ نوری مدل نیکون (ECLIPSE E200) ساخت کشور ژاپن انجام شد.

**تحلیل آماری داده ها:** داده های به دست آمده کمی، به صورت  $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$  ارائه و اختلاف معنی دار

بین گروه ها توسط آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) در سطح معنی داری  $p < 0.05$  توسط نرم افزار آماری SPSS 17 مورد واکاوی آماری قرار گرفت.

### یافته ها

در موش های صحرایی گروه ۲ (کنترل جراحی)، تغییر معنی داری در هیچ یک از پارامترهای مورد سنجش در مقایسه با گروه ۱ (شاهد) ایجاد نشد. در موش های صحرایی گروه ۳ (ایسکمی-بازخونسازی مجدد)، سطوح سرمی آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز در مقایسه با گروه ۱ (شاهد)، به طور معنی داری ( $p=0.000$ ) افزایش و آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز کبد به طور معنی داری ( $p=0.000$ ) کاهش و میزان مالون-دی آلدئید آن به طور معنی داری ( $p=0.000$ ) افزایش یافت. در گروه ۴ (ایسکمی-بازخونسازی مجدد به-علاوه تیمار با کروسین) تیمار با کروسین مانع از افزایش آنزیم های شاخص آسیب کبد در اثر آسیب ایسکمی-بازخونسازی مجدد شد به طوری که، تفاوت معنی داری بین این گروه و گروه شاهد سالم برآورد نگردید. همچنین کروسین مانع از افزایش مالون-دی آلدئید و همچنین مانع از کاهش فعالیت و آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در اثر آسیب ایسکمی-بازخونسازی شد به طوری که، تفاوت معنی داری بین این گروه و گروه ۱ (شاهد) برآورد نگردید (جدول ۱ و ۲).

نکروز در قسمت‌های مختلف لوبول‌های کبدی مشاهده می‌شد (شکل ۳). در گروه ۴ (ایسکمی-بازخونسازی مجدد به‌علاوه تیمار با کروسین، تیمار با کروسین، به‌طور قابل توجهی مانع از بروز تغییرات پاتولوژیک در بافت کبد موش‌های صحرایی شده بود و تنها آسیب قابل مشاهده، واکوئولاسیون سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها به‌خصوص در اطراف وریدچه مرکزی بود (شکل ۴). مشاهدات ریزینی بافت کبد موش‌های صحرایی گروه‌های تحت مطالعه به‌طور کمی در جدول ۳ نشان داده شده است.

در آسیب‌شناسی بافتی ساختار لوبولی و سلولی کبد در موش‌های صحرایی گروه ۱ (شاهد) سالم و طبیعی بود (شکل ۱). هیچگونه تغییر پاتولوژیکی خاصی نیز در بافت کبد موش‌های صحرایی گروه ۲ (کنترل جراحی)، مشاهده نشد به‌طوری‌که، ساختار بافتی کبد، کاملاً طبیعی به نظر می‌رسید (شکل ۲). در کبد موش-های صحرایی گروه ۳ (ایسکمی-بازخونسازی مجدد)، نکروز هپاتوسیت‌ها توام با ارتشاح متوسط سلول‌های آماسی در اطراف وریدچه مرکزی و آماس شدید در ناحیه پورتال همچنین کانون‌های پراکنده

جدول ۱- تاثیر کروسین بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم موش صحرایی در آسیب کبدی ناشی از ایسکمی-بازخونسازی

گروه	تیمار	فراسنجه‌های بیوشیمیایی		
		آلانین آمینوترانسفراز (U/L)	آسپاراتات آمینوترانسفراز (U/L)	لاکتات دهیدروژناز (U/L)
۱	شاهد	۸۰/۵۴±۲/۲۵ <sup>a</sup>	۱۵۹/۸۴±۵/۳۷ <sup>a</sup>	۶۸۵/۳۱±۲۳/۵۲ <sup>a</sup>
۲	کنترل جراحی	۸۲/۶۲±۲/۵۴ <sup>a</sup>	۱۶۳/۲۱±۴/۶۲ <sup>a</sup>	۶۹۷/۵۲±۲۱/۴۷ <sup>a</sup>
۳	ایسکمی-بازخونسازی	۱۸۱/۴۲±۳/۳۸ <sup>b</sup>	۲۳۵/۶۷±۷/۱۵ <sup>b</sup>	۱۱۲۵/۶۴±۲۶/۴۹ <sup>b</sup>
۴	ایسکمی-بازخونسازی به‌علاوه تیمار با کروسین	۸۳/۲۵±۲/۴۹ <sup>a</sup>	۱۶۸/۹۵±۴/۸۱ <sup>a</sup>	۷۱۵/۳۳±۲۴/۸۲ <sup>a</sup>

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد برای ۱۰ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است. a,b حروف غیرمشابه در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ).

جدول ۲- تاثیر کروسین بر فعالیت آنٹی اکسیدانی کبد موش صحرایی در آسیب کبدی ناشی از ایسکمی-بازخونسازی

فراسنجه‌های بیوشیمیایی						
گروه	تیمار	مالون‌دی‌آلدئید (nmol/g) (protein)	دیسموتاز (U/mg) (protein)	سوپراکسید کاتالاز (U/mg) (protein)	گلو‌تاتیون پراکسیداز (U/mg protein)	گلو‌تاتیون ردوکتاز (U/mg protein)
۱	شاهد	۴/۲۱±۰/۱۶ <sup>a</sup>	۱۷/۱۲±۱/۱۳ <sup>a</sup>	۷۲/۱۱±۴/۵۲ <sup>a</sup>	۱۵/۳۷±۰/۹۵ <sup>a</sup>	۱۲۳/۶۱±۳/۵۲ <sup>a</sup>
۲	کنترل جراحی	۴/۳۱±۰/۱۷ <sup>a</sup>	۱۶/۵۵±۰/۹۳ <sup>a</sup>	۶۷/۷۵±۳/۸۲ <sup>a</sup>	۱۴/۱۹±۰/۶۲ <sup>a</sup>	۱۱۷/۳۴±۳/۴۰ <sup>a</sup>
۳	ایسکمی-بازخونسازی	۵/۴۲±۰/۱۸ <sup>b</sup>	۹/۸۷±۰/۶۸ <sup>b</sup>	۴۲/۸۵±۳/۲۶ <sup>b</sup>	۷/۶۵±۰/۴۶ <sup>b</sup>	۷۵/۶۲±۱/۸۹ <sup>b</sup>
۴	ایسکمی-بازخونسازی به‌علاوه تیمار با کروسین	۴/۲۹±۰/۱۳ <sup>a</sup>	۱۵/۸۳±۰/۷۴ <sup>a</sup>	۶۵/۹۲±۲/۳۷ <sup>a</sup>	۱۳/۸۲±۰/۵۴ <sup>a</sup>	۱۲۰/۳۱±۲/۳۵ <sup>a</sup>

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد برای ۱۰ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است.

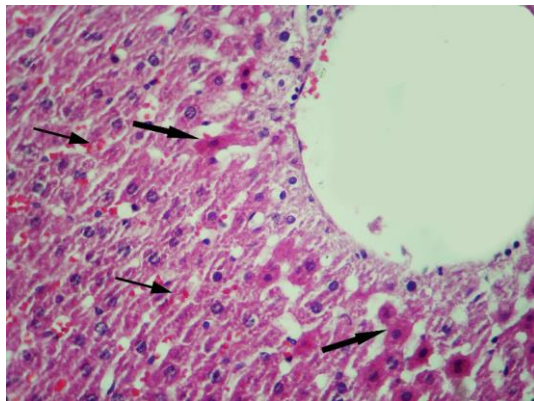
a, b: حروف غیرمشابه در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار است (p &lt; ۰/۰۵).

جدول ۳- تاثیر کروسین بر آسیب بافت کبد موش‌های صحرایی ناشی از ایسکمی-بازخونسازی

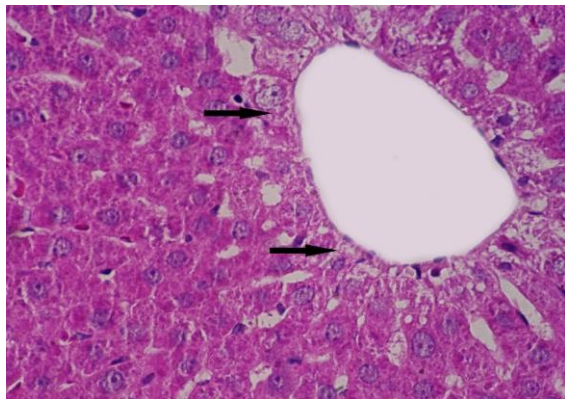
گروه‌ها	شاهد	کنترل جراحی	ایسکمی-بازخونسازی	ایسکمی-بازخونسازی به‌علاوه تیمار با کروسین
درجه بندی آسیب بافتی				
پر خونی و آماس در ناحیه پورتال				
درجه ۰	۱۰	۱۰	۰	۵
درجه ۱	۰	۰	۰	۴
درجه ۲	۰	۰	۰	۱
درجه ۳	۰	۰	۷	۰
درجه ۴	۰	۰	۳	۰
نکروز				
درجه ۰	۱۰	۱۰	۰	۸
درجه ۱	۰	۰	۰	۱
درجه ۲	۰	۰	۱	۱
درجه ۳	۰	۰	۷	۰
درجه ۴	۰	۰	۲	۰
ارتشاح بینابینی سلول‌های آماسی				
درجه ۰	۱۰	۹	۰	۷
درجه ۱	۰	۱	۰	۲
درجه ۲	۰	۰	۳	۱
درجه ۳	۰	۰	۶	۰
درجه ۴	۰	۰	۱	۰

صفر: عدم وجود آسیب، ۱: حداقل آسیب، ۲: آسیب ملایم، ۳: آسیب متوسط و ۴: آسیب شدید (۱۰ نمونه در هر گروه ارائه شده است).



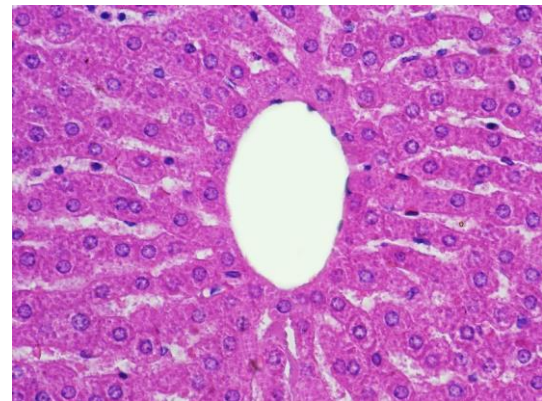


شکل ۳- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش‌های صحرایی از گروه ایسکمی-بازخونسانی که در آن تغییرات دژنراتیو و نکروز هپاتوسیت‌ها در اطراف وریدچه مرکزی (پیکان‌های ضخیم) و خونریزی‌های پراکنده (پیکان‌های باریک) در قسمت‌های مختلف لوبول‌های کبدی مشاهده می‌شود (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی  $\times 400$ ).

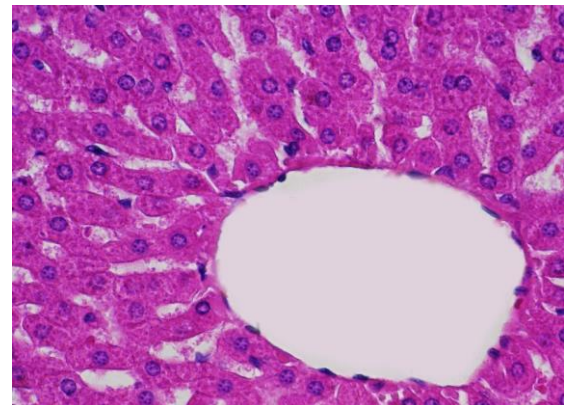


شکل ۴- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش‌های صحرایی از گروه ایسکمی-بازخونسانی به‌علاوه تیمار با کروسین که دژنراسانس هیدروپیک خفیفی (پیکان‌ها) را در اطراف وریدچه مرکزی نشان می‌دهد (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی  $\times 400$ ).

بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که استفاده از زداينده‌های رایکال‌های آزاد در کاهش شدت آسیب بافت کبد ناشی از ایسکمی-بازخونسانی مفید واقع می‌شود (Hassan-Khabbar et al., 2008; Polat et al., 2008).



شکل ۱- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش‌های صحرایی از گروه شاهد که کاملاً سالم و طبیعی می‌باشد (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی  $\times 400$ ).



شکل ۲- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش‌های صحرایی از گروه کنترل جراحی که سالم به‌نظر رسیده و تغییر پاتولوژیک خاصی ندارد (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی  $\times 400$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

تولید رایکال‌های آزاد اکسیژن به مقدار زیاد، در کبدی که دچار ایسکمی-بازخونسانی شده، منجر به آسیب می‌شود که روندی اجتناب‌ناپذیر در تروما، عفونت، پیوند کبد و یا بستن ساقه کبدی در طی اعمال جراحی می‌باشد (El-Abhar et al., 2003).

مشاهده گردید و اثری از نکروز دیده نشد که این خود اثرات محافظتی کروسین را در این میان نشان می‌دهد. اثرات مفید فوق را می‌توان به خواص آنتی-اکسیدانی کروسین و کاهش استرس‌های اکسیداتیو مربوط دانست. به این معنا که، عصاره با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی منجر به تثبیت غشاءهای سلولی شده و مانع از نشت آنزیم‌ها می‌گردد. استرس اکسیداتیو مکانیسم‌هایی را که به تولید سیتوکائین‌های پیش‌التهابی و مولکول‌های الصاق سلولی منجر می‌شوند، فعال می‌کند. بنابراین، استرس اکسیداتیو ممکن است به یک پاسخ آماسی ناشی از آندوتوکسمی، بعد از ایسکمی-بازخونسازی کبد منجر شود. یافته‌های ما در توافق با مطالعات پیشین (Yildiz *et al.*, 2008) تأیید می‌کند که ایسکمی-بازخونسازی کبد استرس اکسیداتیو را به عنوان تاثیری که نه فقط باعث آسیب مستقیم بافت می‌شود، بلکه تولید سیتوکائین‌های توکسیک را که منجر به آماس و ارتشاح لکوسیت‌ها می‌شود، افزایش می‌دهد.

در مطالعه ما افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید در کبد دچار ایسکمی-بازخونسازی، نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد، یکی از مکانیسم‌های محتمل در پاتوژنز آسیب ایسکمی-بازخونسازی می‌باشد. تحقیقات گدیک و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داده است که پراکسیداسیون لیپیدی متعاقب ایسکمی-بازخونسازی در بافت کبد موش‌های صحرائی اتفاق می‌افتد که این یافته با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد (Gedik *et al.*, 2008).

کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل در سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی

در برخی از مطالعات برای کاهش آسیب ایسکمی-بازخونسازی، عوامل آنتی‌اکسیدان فقط قبل از ایسکمی یا قبل از بازخونسازی تجویز شده است و در برخی دیگر، هم قبل از ایسکمی و هم قبل از بازخونسازی تجویز شده است (Sener *et al.*, 2003). کروسین که به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی شناخته شده است، به صورت یک زداینده رادیکال آزاد عمل می‌کند (Hosseinzadeh *et al.*, 2005). در مطالعه حاضر کروسین قبل از القاء ایسکمی تجویز شده است. در این مطالعه تیمار با کروسین به طور مشخصی فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینو ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز را که در ارتباط با آسیب پارانشیم کبد هستند، کاهش داد. افزایش فعالیت آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینو ترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز در گروه ایسکمی-بازخونسازی می‌تواند با پراکسیداسیون لیپیدی در اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده در مرحله بازخونسازی که منجر به سیتولیز می‌شود، توجیه گردد (Chouker *et al.*, 2005). کاهش فعالیت آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز در موش‌های صحرائی تیمار شده با کروسین در مقایسه با گروه ایسکمی-بازخونسازی، اثرات محافظتی محتمل کروسین را در کبدی که در معرض آسیب ایسکمی-بازخونسازی واقع شده، نشان می‌دهد. این اثر احتمالاً به دلیل محافظت غشاء سلول و ممانعت از نشت آنزیم‌های داخل آن حاصل می‌گردد (Thabrew *et al.*, 1987). متعاقب پیش‌درمانی موش‌های گروه ایسکمی-بازخونسازی با کروسین، فقط تغییرات خفیف دژنراتیو سلول‌های کبدی

است. همچنین، متعاقب ایسکمی-بازخوئرسیانی کاهش قابل توجهی در میزان گلووتاتیون پراکسیداز حاصل گردید که منجر به دسترسی گلووتاتیون ردوکتاز به سوبسترا شده و بدین ترتیب فعالیت گلووتاتیون ردوکتاز کاهش یافت. به نظر می‌رسد که پیش‌درمانی کروسین در آسیب ایسکمی-بازخوئرسیانی فعالیت گلووتاتیون ردوکتاز را مجدداً برقرار نموده که مصرف گلووتاتیون اکسید را جهت تشکیل گلووتاتیون احیاء و افزایش سم‌زدایی متابولیت‌های فعال توسط کونژوگاسیون با گلووتاتیون احیاء برقرار می‌کند. نتایج بررسی حاضر، گزارش سایر محققین را در خصوص اثرات آنتی‌اکسیدانی و زدایش رادیکال‌های آزاد توسط کروسین مورد تأیید قرار می‌دهد ( Hosseinzadeh et al., 2009).

تحقیقاتی که توسط حسین‌زاده و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در مورد اثرات محافظتی کروسین در برابر آسیب ایسکمی-بازخوئرسیانی کلیه انجام شده، نشان داده است که کروسین از طریق کاهش استرس‌های اکسیداتیو نقش حفاظتی خود را در برابر آسیب ایسکمی-بازخوئرسیانی اعمال می‌دارد به طوری‌که، میزان پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش و فعالیت آنزیم‌های سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد (Hosseinzadeh et al., 2005). مکانیسم عملکرد کروسین در مطالعه ایشان با نتایج بررسی حاضر همخوانی دارد. مطالعات انجام شده توسط حسین‌زاده و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان داده است که تیمار با کروسین از بروز آسیب در سلول‌های عضلانی واقع شده در معرض ایسکمی-بازخوئرسیانی نیز ممانعت می‌کند. طبق نظر ایشان اثر محافظتی

آنزیمی، شاخصی حساس برای آسیب سلول‌های کبدی است. سوپراکسید دیسموتاز آنیون سوپراکسید را از طریق تبدیل آن به پراکسید هیدروژن پاک‌سازی کرده و بدین ترتیب اثرات توکسیک آن را کاهش می‌دهد (Curtis et al., 1972). در بررسی حاضر، میزان سوپراکسید دیسموتاز در موش‌های صحرایی دچار ایسکمی-بازخوئرسیانی به دلیل تشکیل فراوان آنیون-های سوپراکسید، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که متعاقب آن فعالیت آنزیم‌های زداینده پراکسید هیدروژن یعنی کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز نیز در این موش‌های صحرایی به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. به نظر می‌رسد که غیرفعال شدن سوپراکسید دیسموتاز توسط آنیون‌های افزایش یافته سوپراکسید، منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌های کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز می‌شود. کاتالاز با تجزیه پراکسید هیدروژن بافت‌ها را در مقابل رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل محافظت می‌کند. بنابراین، کاهش فعالیت کاتالاز ممکن است به برخی اثرات مخرب ناشی از رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن منجر گردد (Chance et al., 1952). گلووتاتیون ردوکتاز به‌عنوان یک آنزیم سیتوزولی کبدی، در کاهش گلووتاتیون اکسید، به عنوان محصول نهایی فعالیت گلووتاتیون پراکسیداز روی گلووتاتیون احیاء دخالت دارد ( Naik and Panda, 2008).

در مطالعه ما، مصرف کروسین مانع از کاهش سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز در اثر ایسکمی-بازخوئرسیانی شد که این پدیده ممکن است در اثر زدایش رادیکال‌ها توسط کروسین اتفاق افتاده باشد که باعث حفظ و بقاء این آنزیم‌ها شده

چگونگی تاثیر دزهای مختلف کروسین، مکان و مکانیسم یا مکانیسم‌های مولکولی و سلولی مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن ناشناخته مانده و نیاز به مطالعات آتی و گسترده‌تری دارد.

### سپاسگزاری

این مقاله از طرح تحقیقاتی که با بودجه پژوهشی و حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به انجام رسیده است، استخراج شده است. بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز تشکر و قدردانی می‌گردد.

کروسین به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی آن بوده است (Hosseinzadeh *et al.*, 2009).

با توجه به مطالب مذکور، کروسین احتمالاً با خواص آنتی‌اکسیدانی خود، کبد موش‌های صحرایی را در برابر استرس اکسیداتیو ایسکمی-بازخونسازی محافظت می‌کند. بنابراین، پس از انجام کارآزمایی‌های بالینی و کسب نتایج مثبت، کروسین می‌تواند به‌عنوان یک داروی مؤثر جهت پیش‌گیری از آسیب‌های اکسیداتیو ایسکمی-بازخونسازی در موارد تروما، عفونت، پیوند کبد و یا بستن ساقه کبدی در طی اعمال جراحی کبد مورد استفاده قرار گیرد. لکن،

### منابع

- Ahmad, A.S., Ansari, M.A., Ahmad, M., Saleem, S., Yousuf, S., Hoda, M.N., *et al.* (2005). Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 81(4): 805-813.
- Barber, D.A. and Harris, S.R. (1994). Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Journal of American Pharmacists Association*, NS34: 26-35.
- Chance, B., Greenstein, D.S. and Roughton, R.J.W. (1952). The mechanism of catalase action. 1. Steady-state analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 37(2): 301-321.
- Chen, Y., Zhang, H., Tiana, X., Zhao, C., Cai, L., Liu, Y., *et al.* (2008). Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *Gardenia jasminoides* ELLIS and *Crocus sativus* L.: A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. *Food Chemistry*, 109(3):484-492.
- Chouker, A., Martignoni, A., Schauer, R.J., Dugas, M., Schachtner, T., Kaufmann, I., *et al.* (2005). Alpha-gluthathione S-transferase as an early marker of hepatic ischemia/reperfusion injury after liver resection. *World Journal of Surgery*, 29: 528-534.
- Claiborne, A. (1985). Catalase activity In: *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton, F.L. editor. Florida: CRC Press, Boca Raton, 99: 283-284.
- Curtis, S.J., Mortiz, M. and Sondgrass, P.J. (1972). Serum enzymes derived from liver cell fractions. I. The response to carbon tetrachloride intoxication in rats. *Gastroenterology*, 62(1): 84-92.
- Das, D.K. and Maulik, N. (1994). Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. *Methods in Enzymology*, 233: 601-610.
- El-Abhar, H.S., Abdallah, D.M. and Saleh S. (2003). Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymo-quinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 84: 251-258.

- Fraga, C.G., Leibovitz, B.E. and Tappel, A.L. (1988). Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radical Biology and Medicine*, 4(3): 155-161.
- Frei, A., Zimmermann, A. and Weigand, K. (1984). The N-terminal propeptide of collagen type III in serum reflects activity and degree of fibrosis in patients with chronic liver disease. *Hepatology*, 4(5): 830-834.
- Gedik, E., Girgin, S., Ozturk, H., Obay, B.D., Ozturk, H. and Buyukbayram, H. (2008). Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 14(46): 7101-7106.
- Hassan-Khabbar, S., Cottart, C.H., Wendum, D., Vibert, F., Clot, J.P., Savouret, J.F., *et al.* (2008). Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: a possible strategy in liver surgery. *Liver Transplantation*, 14:451-459.
- He, X.S., Ma, Y., Wu, L.W., Wu, J.L., Hu, R.D., Chen, G.H., *et al.* (2005). Dynamical changing patterns of glycogen and enzyme histochemical activities in rat liver graft undergoing warm ischemia injury. *World Journal of Gastroenterology*, 11: 2662-2665.
- Hosseinzadeh, H., Modaghegh, M.H. and Saffari, Z. (2009). Crocus Sativus L. (Saffron) Extract and its Active Constituents (Crocetin and Safranal) on Ischemia-Reperfusion in Rat Skeletal Muscle. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*, 6(3): 343-350 .
- Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H.R., Ziaee, T. and Danaee, A. (2005). Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocetin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences*, 8(3): 387-393.
- Lee, G. and Luna, H.T. (1988). Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3rd ed., The Blakiston Division Mc Graw. Hill Book Company, pp: 32-107.
- Magesh, V., Singh, J.P., Selvendiran, K., Ekambaram, G. and Sakthisekaran, D. (2006). Antitumor activity of crocetin in accordance to tumor incidence, antioxidant status, drug metabolizing enzymes and histopathological studies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 287(1-2): 127-135.
- Martinek, R.G. (1972). A rapid ultraviolet spectrophotometric lactic dehydrogenase assay. *Clinica Chimica Acta*, 40(1): 91-99.
- Mohandas, J., Marshal, J.J., Duggin, G.G., Horvath, J.S. and Tiller, D.G. (1984). Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. *Cancer Research*, 44(11): 5086-5091.
- Montalvo-Jave, E.E., Escalante-Tattersfield, T., Ortega-Salgado, J.A., Pina, E. and Geller, D.A. (2008). Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *Journal of Surgical Research*, 147: 153-159.
- Naik, S.R. and Panda, V.S. (2008). Hepatoprotective effect of Ginkgoselect Phytosome® in rifampicin induced liver injury in rats: Evidence of antioxidant activity. *Fitoterapia*, 79(6): 439-445.
- Nishikimi, M., Appaji, N. and Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2): 849-854.
- Polat, K.Y., Aydinli, B., Polat, O., Aydin, U., Yazici, P., Ozturk, G., *et al.* (2008). The protective effect of aprotinin and alpha-tocopherol on ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Transplantation Proceedings*, 40: 63-68.
- Pulitano, C. and Aldrighetti, L. (2008). The protective role of steroids in ischemia-reperfusion injury of the liver. *Current Pharmaceutical Design*, 14: 496-503.

- Reitman, S. and Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *American Journal of Clinical Pathology*, 28: 56-63.
- Rotruck, I.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. and Hoekstra. W.G. (1973). Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179: 588-590.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*, 32: 407-412.
- Sener, G., Tosun, O., Sehirlı, A.O., Kacmaz, A., Arbak, S., Ersoy, Y., *et al.* (2003). Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Science*, 72: 2707-2718.
- Shen, S.Q., Zhang, Y., Xiang, J.J. and Xiong, C.L. (2007). Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. *World Journal of Gastroenterology*, 13: 1953-1961.
- Shin, T., Kuboki, S., Huber, N., Eismann, T., Galloway, E., Schuster, R., *et al.* (2008). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma during hepatic ischemia is age-dependent. *Journal of Surgical Research*, 147: 200-205.
- Thabrew, M.I., Joice, P.D. and Rajatissa, W. (1987). A comparative study of the efficacy of *Pavetta indica* and *Osbeckia octanda* in the treatment of liver dysfunction. *Planta Medica*, 53(3):239-41.
- Tseng, T.H., Chu, C.Y., Huang, J.M., Shioh, S.J. and Wang, C.J. (1995). Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Cancer Letters*, 97(1): 61-67.
- van Gulik, T.M., de Graaf, W., Dinant, S., Busch, O.R. and Gouma, D.J. (2007). Vascular occlusion techniques during liver resection. *Digestive Surgery*, 2007, 24: 274-281.
- Xiang, M., Qian, Z.Y., Zhou, C.H., Liu, J. and Li, W.N. (2006). Crocetin inhibits leukocyte adherence to vascular endothelial cells induced by AGEs. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(1): 25-31.
- Yildiz, F., Coban, S., Terzi, A., Ates, M., Aksoy, N., Cakir, H., *et al.* (2008). *Nigella sativa* relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver. *World Journal of Gastroenterology*, 14(33): 5204-5209.
- Yildiz, F., Coban, S., Terzi, A., Ates, M., Aksoy, N., Cakir, H., *et al.* (2008). *Nigella sativa* relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver. *World Journal of Gastroenterology*, 14(33): 5204-5209.
- Zheng, Y.Q., Liu, J.X., Wang, J.N. and Xu, L. (2007). Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. *Brain Research*, 1138: 86-94.

## **Protective effects of Crocin on experimental hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat**

**Amouoghli Tabrizi, B.<sup>1\*</sup>, Mohajeri, D.<sup>2</sup>**

1- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

2- Professor, Department of Pathobiology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

\*Corresponding author email: b\_tabrizi@iaut.ac.ir

(Received: 2015/6/4 Accepted: 2015/9/19)

### **Abstract**

Ischemia followed by reperfusion (I/R) may cause metabolic and structural hepatic damage. The aim of this study was to investigate the effects of crocin on liver ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats. For this purpose a total of 40 male Wistar rats were randomized into four groups of ten: (1) controls: including unmanipulated rats; (2) sham group: rats subjected to the surgical procedure, except for liver I/R, and given saline; (3) I/R group: rats underwent liver ischemia for 45 minutes followed by reperfusion for 45 minutes; (4) I-R/Crocin group: rats pretreated with crocin (200 mg/kg, ip). Blood samples and liver tissues were harvested from the rats, and then the rats were sacrificed. Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and lactate dehydrogenase (LDH) levels were determined. Malondialdehyde (MDA) and activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) were assayed in liver homogenates. Also liver tissue histopathology was evaluated by light microscopy. In group 4, crocin significantly ( $p<0.001$ ) decreased the elevated levels of serum biomarkers of hepatic injury and significantly ( $p<0.001$ ) decreased the lipid peroxidation and elevated the decreased values of hepatic antioxidants. Histopathological changes were significantly attenuated in crocin-treated livers. These results suggest that crocin because of its anti-oxidant potential, has protective effects against hepatic I/R injury, and is a potential therapeutic drug for ischemia reperfusion-related liver injury.

**Key words:** Crocin, Ischemia-reperfusion, Liver, Rat.