

تاثیر پیش درمانی با عصاره‌ی برگ زیتون بر آسیب کبدی متعاقب ایسکمی - پرفوزیون مجدد کلیوی در موش صحرایی نر

دکتر محمدرضا نصیرزاده^۱

نویسنده‌ی مسوول: گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز
mr.nasirzadeh@iaut.ac.ir

دریافت: ۹۴/۱/۳۰ پذیرش: ۹۴/۶/۴

چکیده

زمینه و هدف: آسیب ایسکمی، خون رسانی مجدد کلیوی (Ischaemia-Reperfusion) سطح فرآورده‌های پراکسیداسیون چربی در کبد را افزایش می‌دهد. درحالی که فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد کاهش می‌یابد. برگ‌های زیتون یک منبع قابل ملاحظه‌ی ترکیبات فنلی است که به لحاظ بیولوژیکی فعال هستند و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و قدرت پاک کنندگی رادیکالی بهتری دارند.

روش بررسی: در این مطالعه تعداد ۵۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن 250 ± 20 گرم به صورت تصادفی انتخاب و در پنج گروه تقسیم شدند: ۱) کنترل: موش‌های سالم دست نخورده، ۲) 1h I/R (3h I/R-OLE)، ۳) 1h I/R (24h I/R-OLE) و ۴) 24h I/R-OLE. موش‌های گروه‌های سه و پنج عصاره‌ی برگ زیتون را در ۰/۵ میلی‌لیتر آب آشامیدنی از طریق گاوژمعدی به مدت ۲۸ روز و قبل از ایجاد ایسکمی (۱ ساعت) دریافت کردند. بقیه‌ی موش‌ها ۰/۵ میلی‌لیتر سرم نرمال سالین از طریق گاوژ دریافت نمودند. در پایان دوره‌ی خون‌رسانی مجدد (به ترتیب ۱ و ۲۴ ساعت) غلظت سرمی آنزیم‌های کبدی، اوره و کراتینین و میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان SOD، MDA و GPX بافت کبد اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: میانگین میزان MDA در گروه‌های تیمار شده با عصاره‌ی برگ زیتون نسبت به گروه‌های ایسکمی خون‌رسانی مجدد کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$). همچنین مشخص گردید که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان SOD و GPX در بافت کبد حیوانات گروه ایسکمیک در مقایسه با گروه تیمار شده با عصاره‌ی برگ زیتون به طور معنی‌داری پایین‌تر است ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد عصاره‌ی برگ زیتون در بافت کبد در برابر آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد کلیوی محافظت کننده است. وازگان کلیدی: آسیب ایسکمیک خون رسانی مجدد کلیوی، عصاره‌ی برگ زیتون، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کبد، موش صحرایی نر

مقدمه

حاد کلیوی، ایسکمی - خون‌رسانی مجدد کلیوی است. بیماری‌های کبدی و اختلالات نورولوژیکی مرتبط با آسیب کلیوی یک مشکل بالینی معمول است (۳ و ۲). کوزیرادکی در سال ۲۰۰۸ نشان داد که در روند انتقال کلیه، ایسکمی یک پدیده‌ی غیر قابل اجتناب است و مرحله‌ی نهایی آسیب در طی دوره خون‌رسانی مجدد اتفاق می‌افتد (۴). اگرچه برای

کبد و کلیه هر دو در اعمال هوموستاتیک، متابولیسم و دفع داروها و فراورده‌های سمی بدن شرکت دارند (۱). ایسکمی - خون‌رسانی مجدد کلیوی در برخی از بافت‌ها از جمله قلب، ریه و کبد آسیب بافتی ایجاد می‌کند. مکانیسم‌های فیزیوپاتولوژی که به آسیب حاد کلیوی منجر می‌شوند به طور کامل شناخته نشده‌اند. اما یکی از علل اصلی نارسایی

۱- دکترای تخصصی فیزیولوژی، استادیار گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز

بقای بافت کلیوی ایسکمیک، خونرسانی مجدد ضروری است اما رادیکال‌های آزاد موجب آسیب شدید اکسیداتیو در بافت‌ها می‌شود (۵). تصور می‌شود اختلال در عملکرد اعضای دور دست در نارسایی حاد کلیوی به میانجی‌های سلولی و یا عوامل هومورال موجود در گردش خون مربوط باشد. سایتوکاین‌هایی که در طی دوره‌ی ایسکمی - خونرسانی مجدد آزاد می‌شوند ممکن است در پاتوژنز آسیب بافتی نقش مهمی داشته باشند. فاکتور نکروزدهنده‌ی توموری که به وسیله‌ی سلول‌های اپیتلیال توبولی و نیز لکوسیت‌های فعال شده تولید می‌شود بیان مولکول‌های چسباننده را در سلول‌های آندوتلیال القا می‌نماید این فاکتور می‌تواند با القای سایتوکاین‌های پیش التهابی یا ضد التهابی دیگر از قبیل اینترلوکین-۶، اینترلوکین-۸ و اینترلوکین-۱۰ اعضای عمومی دیگری را تحت تاثیر قرار دهد (۶). به‌خوبی شناخته شده است که در طی دوره‌ی ایسکمی، سلول‌ها و بافت‌ها تغییرات سریعی را متحمل می‌شوند که منجر به اختلال در مسیرهای انتقال پیام سلولی و بیان مولکول‌های سطحی می‌گردد (۷). آسیب ایسکمی - خونرسانی مجدد کلیوی سطح فرآورده‌های پراکسیداسیون چربی در کبد را افزایش می‌دهد. درحالی که فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد کاهش می‌یابد (۱۲و۱). حکیم اوغلو و همکاران نشان دادند که ایسکمی - خونرسانی مجدد کلیوی سطح مالون دی آلدئید بافت کبد را افزایش و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن را کاهش می‌دهد (۱). یکی از شاخص‌های معتبر در تشخیص بیماری‌های کبدی سنجش میزان آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارات آمینو ترانسفراز می‌باشد (۸). ایسکمی - خونرسانی مجدد خارج کبدی موجب کاهش متابولیسم کبدی داروها می‌شود (۲). در مطالعاتی که اثرات آسیب ایسکمی - خونرسانی مجدد کلیوی بر روی اعضای دور دست بررسی شده است آسیب ایسکمی - خونرسانی مجدد کلیوی باعث اثرات التهابی در بافت‌های دوردست از قبیل ریه و قلب

می‌شود. همچنین بسیاری از مطالعات ارتباط بین کلیه‌ها و کبد را پیشنهاد می‌کنند (۹). مطالعه‌ی صورت گرفته توسط پانس و همکاران در سال ۲۰۱۳ که اثرات هیدروکسی تیروزول (ترکیب فنلی موجود در روغن زیتون) بر آسیب ایسکمی - خونرسانی مجدد کبد در موش سوری را بررسی کرده است، نشان می‌دهد هیدروکسی تیروزول اثرات محافظتی در برابر آسیب اکسیداتیو دارد (۱۰). در مطالعه‌ی دیگری گوان و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثرات ماده‌ی موثره دیگر موجود در زیتون به نام مازلینیک اسید را بر ایسکمی مغزی بررسی نموده و اثرات مفید آن را بر آسیب ایسکمی مغزی نشان داده‌اند (۱۱). برگ زیتون یک منبع قابل ملاحظه‌ی ترکیبات فنلی است که به لحاظ بیولوژیکی فعال هستند و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و قدرت پاک کنندگی رادیکالی بهتری دارند (۱۲و۱۳). همچنین، ترکیبات فنلی مشتق از برگ زیتون با داشتن مقادیر قابل توجهی اولئوروپین از اکسیداسیون لیپوپروتئینی جلوگیری می‌کنند (۱۴). اولئوروپین ترکیب اصلی برگ زیتون است که تصور می‌شود مسوول فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن باشد. بیشتر مطالعات بر روی ترکیبات فنلی برگ زیتون متمرکز شده‌اند. در حالی که به دلیل وجود سینرژیسیم اثر بین ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و اولئوروپنوزیدها خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره تام برگ زیتون بیشتر است، چنانچه نشان داده شده است که قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی تام برگ زیتون از ویتامین C و E بیشتر است (۱۴و۱۲). از سویی دیگر برگ درخت زیتون در رژیم غذایی به‌صورت چای قابل مصرف است. با توجه به این که تاکنون تاثیر تجویز خوراکی عصاره‌ی برگ زیتون بر محافظت کبدی به دنبال آسیب ایسکمی - خونرسانی مجدد کلیوی ارزیابی نشده است. لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات آنتی اکسیدان عصاره‌ی برگ زیتون بر محافظت کبدی به دنبال آسیب ایسکمی - خونرسانی مجدد کلیوی در موش صحرایی نر می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی تجربی - مداخله‌ای تعداد ۵۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن 20 ± 250 گرم به صورت تصادفی انتخاب و در پنج گروه تقسیم شدند. موش‌های صحرایی هر ۵ گروه از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه آزاد تبریز تهیه و در آن مرکز در شرایط یکسان با دسترسی آزاد به آب و غذا و در سطحی با دمای $22 \pm 2^\circ$ درجه‌ی سانتی‌گراد و چرخه‌ی نوری ۱۲/۱۲ روشنایی - تاریکی نگهداری شد. حیوانات در ۵ گروه به شرح زیر تقسیم شدند:

Control: گروه کنترل حیوانات سالم دست نخورده

I/R 1h-1: گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد به مدت ۶۰ دقیقه

I/R-OLE 1h-2: گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد به مدت ۶۰ دقیقه + دریافت عصاره‌ی برگ زیتون

I/R 24h-3: گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد به مدت ۲۴ ساعت

I/R-OLE 24h-4: گروه ایسکمی - خونرسانی مجدد به مدت ۲۴ ساعت + دریافت عصاره‌ی برگ زیتون (۹ و ۳)

عصاره‌گیری: جهت تهیه عصاره‌ی برگ زیتون ۲۰۰ گرم برگ زیتون تازه تهیه و پس از خشک شدن آسیاب شده و به صورت پودر درآمد. سپس با استفاده از اتانول ۸۰ درصد عصاره‌گیری انجام گرفت. پس از تبخیر حلال با استفاده از دستگاه روتاری اوپراتور باقیمانده به عنوان عصاره از راه خوراکی تجویز شد (۱۵). در گروه‌های I/R-OLE 1h, I/R-OLE 24h موش‌ها عصاره‌ی برگ زیتون را به مدت ۳۰ روز قبل از ایسکمی و به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم از راه خوراکی واز طریق گاواژ دریافت کردند (۱۶). حیوانات گروه‌های دیگر هم حجم عصاره (۰/۵ میلی‌لیتر) سرم فیزیولوژی از طریق گاواژ دریافت کردند. در پایان دوره‌ی تجویز عصاره، موش‌های گروه‌های مورد مطالعه تحت جراحی (برش در خط

وسط شکم و دسترسی به کلیه‌ها پس از کنار زدن چربی‌های دور کلیه) قرار گرفته و پس از دسترسی به عروق کلیوی ایسکمی دوطرفه با استفاده از کلمپ رگی غیر تروماتیک در نزدیکی ناف کلیه ایجاد و پس از یک ساعت ایسکمی کلیوی، دوره‌ی خونرسانی مجدد آغاز گردید (۱۷ و ۹).

به ترتیب در گروه‌های یک و دو به دنبال یک ساعت ایسکمی، یک ساعت خونرسانی مجدد انجام گرفت. در گروه‌های سه و چهار به دنبال یک ساعت ایسکمی، بیست و چهار ساعت خونرسانی مجدد صورت گرفت (۱۸ و ۳). پس از پایان دوره‌ی خونرسانی مجدد تحت بیهوشی، نمونه‌ی خون از سینوس پشت کروی چشم اخذ و جهت اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی، اوره و کراتینین سرم استفاده گردید. سپس با برش در خط وسط شکم و دسترسی به کبد، نمونه‌های بافت کبد برداشته شد و تا زمان اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در دمای 70° - درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند (۹).

جهت ایجاد بیهوشی از داروی کتامین به میزان ۴۰ میلی‌گرم و داروی زایلازین به میزان ۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی استفاده گردید (۱۴).

اندازه‌گیری فاکتورها: فاکتورهای بیوشیمیایی اوره و کراتینین، آلانین آمینوترانسفراز و آسپاراتات ترانسفراز سرم با استفاده از کیت‌های استاندارد شرکت زیست شیمی ایران اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری سوپراکسید دسموتاز (SOD): در این روش از گزانتین و گزانتین اکسیداز جهت تولید رادیکال‌های سوپر اکسید استفاده می‌شود. این رادیکال‌ها با I.N.T یا 2-(Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenol)-5-Phenyltetrazolium Chloride واکنش می‌دهند و رنگ قرمز فورمازون تولید می‌کنند که در طول موج ۵۰۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود (۱۹).

اندازه‌گیری گلوتاتیون پراکسیداز: GPX آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز واکنش اکسیداسیون گلوتاتیون (GSH) را توسط کومن هیدروپراکسید (Cumene Hydroperoxide)

کاتالیز می‌نماید. در حضور آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز و NADPH، گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) مجدداً به گلوتاتیون احیا تبدیل می‌شود که این احیا با اکسیداسیون همزمان NADPH به NADP^+ همراه است. در این واکنش کاهش جذب نوری در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود (۱۹).

اندازه‌گیری مالون دی آلدئید: MDA این روش بر پایه واکنش با تیو باربیتوریک اسید (TBARS)، اندازه‌گیری جذب با روش اسپکتروفتومتری و مقایسه با منحنی استاندارد می‌باشد (۱۹).

اندازه‌گیری پروتئین بافتی: غلظت پروتئین تام به روش برد فورد اندازه‌گیری شده است (۲۰).

تجزیه و تحلیل آماری: در این مطالعه داده‌های به‌دست آمده با استفاده از روش آماری آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست Post Hoc و Duncan تجزیه و تحلیل گردید و سطح معنی‌دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مقایسه‌ی آماری میانگین غلظت سرمی اوره حیوانات

مورد مطالعه نشان داد که بین گروه 1h I/R با گروه 1hI/R-OLE اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P < 0.05$) (جدول ۱). همچنین مشخص گردید میانگین غلظت سرمی کراتینین در گروه کنترل در مقایسه با سایر گروه‌های مورد مطالعه به‌طور معنی‌داری پایین‌تر است ($P < 0.05$).

مقایسه‌ی میانگین غلظت سرمی آنزیم‌های کبدی موش صحرایی نشان داد که میانگین مقادیر آنزیم‌های ALT و AST در موش‌های گروه‌های ایسکمی - خونرسانی مجدد در مقایسه با موش‌های گروه‌های تیمار شده با عصاره‌ی برگ زیتون به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0.05$) (جدول ۱). همچنین میانگین مقادیر آنزیم AST در موش‌های گروه کنترل و گروه 1hI/R-OLE نسبت به سایر گروه‌های مطالعه شده به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود ($P < 0.05$).

نتایج نشان داد که میانگین مقادیر MDA در موش‌های گروه کنترل در مقایسه با سایر گروه‌های مطالعه شده به‌طور معنی‌داری پایین‌تر است ($P < 0.05$). میانگین میزان MDA در گروه‌های تیمار شده با عصاره برگ زیتون نسبت به گروه‌های ایسکمی - خونرسانی مجدد کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) (جدول ۲).

جدول ۱: میانگین سطح اوره، کراتینین و آنزیم‌های کبدی سرم موش‌های صحرایی در در گروه‌های مختلف مورد مطالعه ($\text{Mean} \pm \text{SE}$).

گروه					فاکتور
24h I/R-OLE	24h I/R	1h I/R-OLE	1h I/R	کنترل	
۱۱۸±۲/۰۵ab	۱۲۲±۲/۰۸a	۱۱۳±۱/۴۲b	۱۲۶±۲/۷۱a	۴۲±۰/۲۵c	اوره (mg/dl)
۲/۵±۰/۷۹b	۲/۷۵±۰/۸۶ab	۲/۵۲±۰/۷۹ab	۲/۸۵±۰/۹a	۱/۰۷±۰/۰۳c	کراتینین (mg/dl)
۹۳/۷۵±۱/۲۲b	۱۱۰/۷۵±۱/۷۷a	۸۱/۵±۰/۷۲c	۹۰/۵±۱/۱b	۷۰/۲۵±۰/۸۳d	آلانین آمینوترانسفراز (u/l)
۹۷/۷۵±۱/۱b	۱۲۳/۷۵±۱/۰۴a	۸۵/۵±۱/۷۳c	۹۸/۷۵±۲/۱۵b	۷۸/۵±۱/۷۳c	آسپاراتات آمینوترانسفراز (u/l)

میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه در هر ردیف اختلاف معنی‌دار دارند. سطح معنی‌دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

جدول ۲: میانگین مقادیر مالون دی آلدئید و آنزیم‌های آنتی اکسیدان بافت کبد موش‌های صحرایی نر در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (Mean $\pm$ SE).

گروه	کنترل	1h I/R	1h I/R-OLE	24h I/R	24h I/R-OLE
مالون دی آلدئید (nmol/mg protein)	۲/۶۷ $\pm$ ۰/۱۱c	۵/۴۴ $\pm$ ۰/۰۸a	۴/۱۳ $\pm$ ۰/۰۹b	۵/۰۵ $\pm$ ۰/۰۵a	۴/۲۸ $\pm$ ۰/۰۸b
سوپراکسید سمولتاز (u/mg protein)	۴/۵ $\pm$ ۰/۰۶a	۳/۰۵ $\pm$ ۰/۰۸c	۳/۶۴ $\pm$ ۰/۰۵b	۲/۹۶ $\pm$ ۰/۰۱۳c	۳/۱۵ $\pm$ ۰/۰۹bc
گلوکاتیون پراکسیداز (u/mg protein)	۶۳/۷۲ $\pm$ ۱/۰۶a	۵۲/۷۵ $\pm$ ۱/۲۶b	۵۸/۷۲ $\pm$ ۲/۱ab	۵۱/۴۵ $\pm$ ۱/۰۶b	۵۴/۸۹ $\pm$ ۱/۷۱b

میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه در هر ردیف اختلاف معنی‌دار دارند.
سطح معنی‌دار $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شده است.

بررسی داده‌های مربوط به میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان SOD مشخص نمود که میزان فعالیت این آنزیم در بافت کبد حیوانات گروه 1h I/R در مقایسه با بافت کبد حیوانات گروه 1h I/R-OLE به‌طور معنی‌داری پایین‌تر است ($P < ۰/۰۵$). همچنین مشخص گردید بین گروه‌های تیمار شده با عصاره اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$). بین دو گروه 24h I/R و 24h I/R-OLE نیز تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($P > ۰/۰۵$) (جدول ۲).

مقایسه‌ی میانگین مقادیر آنزیم آنتی اکسیدان GPX در حیوانات گروه‌های مختلف نشان داد که بین گروه کنترل با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P < ۰/۰۵$). اما بین گروه کنترل با گروه 1h I/R-OLE اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$). همچنین نتایج مشخص کرد که بین گروه‌های ایسکمی - خونرسانی مجدد با گروه‌های تیمار شده تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$) (جدول ۲).

بحث

نارسایی حاد کلیوی تقریباً در ۵ درصد بیماران بیمارستانی و در بیش از ۳۰ درصد بیماران بخش مراقبت‌های ویژه دیده

می‌شود. آسیب ایسکمی کلیوی حاد در بسیاری از حالات بالینی از قبیل جراحی مجاری ادراری، شوک سپتیک، انتقال عضو و تروما دیده می‌شود. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که آسیب ایسکمی، اعضا دیگر از جمله کبد را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱). بسته به زمان و شدت ایسکمی فراورده‌های سمی در داخل سلول‌ها تجمع یافته و منجر به آپوپتوزیس و نکروز می‌گردند که حاصل آن از بین رفتن عملکرد طبیعی عضو است. در طی دوره‌ی خونرسانی مجدد متابولیت‌های سمی تجمع یافته به درون گردش خون عمومی وارد می‌شوند و می‌توانند سایر اعضا و نیز ترمیم اندام ایسکمیک را تحت تاثیر قرار دهند (۸). آنتی‌اکسیدان‌ها در حیات انسان نقش مهم و اساسی ایفا می‌کنند، به‌طوری که مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش خطر بیماری‌های قلبی، دیابت و دیگر بیماری‌های مرتبط با پیری از قبیل سرطان همراه است (۲۲ و ۲۱). در این مطالعه، ما پتانسیل بالقوه عصاره‌ی برگ زیتون را بر آسیب کبدی به دنبال ایسکمی - خونرسانی مجدد بررسی کردیم. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که غلظت سرمی اوره و کراتینین در گروه‌هایی که ایسکمی - خونرسانی مجدد را تحمل کرده‌اند به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل می‌باشد

($P < 0/05$)، افزایش قابل ملاحظه‌ی اوره و کراتینین حاکی از آسیب عملکرد کلیوی در اثر ایسکمی - خونرسانی مجدد می‌باشد. این نتایج با یافته‌های مطالعات قبلی مطابقت دارد (۲۳ و ۱۴) پراکسیداسیون چربی یک روند خودبخودی است که می‌تواند موجب تخریب اکسیداتیو غشاهای سلولی و شکسته شدن آن‌ها و در نتیجه تولید فراورده‌های واکنشی سمی و مرگ سلول گردد (۱). چنین تصور می‌شود که آسیب بافتی ایجاد شده به دنبال ایسکمی - خونرسانی مجدد ارتباط تنگاتنگی با پراکسیداسیون چربی دارد و مالون دی آلدئید یک فاکتور مهم استرس اکسیداتیو و یک شاخص خوب پراکسیداسیون چربی می‌باشد (۱). در مطالعه‌ی حاضر در گروه‌های ایسکمی - خونرسانی مجدد سطح مالون دی آلدئید در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$). در حالی که میانگین سطح مالون دی آلدئید در گروه‌های تیمار شده با عصاره‌ی برگ زیتون نسبت به گروه‌های ایسکمی - خونرسانی مجدد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/05$). این یافته نشان می‌دهد که پراکسیداسیون چربی ایجاد شده توسط ایسکمی - خونرسانی مجدد کلیوی در بافت کبد موش صحرایی، با تجویز خوراکی عصاره‌ی برگ زیتون بهبود یافته است. این نتایج با یافته‌های مطالعه‌ی پان و همکاران در سال ۲۰۱۳ که اثرات محافظتی هیدروکسی تیروزول را بر آسیب ناشی از ایسکمی - خونرسانی مجدد کبدی در موش سوری بررسی کرده‌اند، مطابقت دارد. چنانچه تجویز هیدروکسی تیروزول باعث کاهش میزان مالون دی آلدئید و افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز در بافت کبد موش سوری شده است (۱۰). مقایسه‌ی نتایج مطالعه‌ی حاضر با این یافته‌ها حاکی از اثرات ایسکمی - خونرسانی مجدد کلیوی بر بافت کبد است. آسیب ایسکمی - خونرسانی مجدد موجب پاسخ‌های التهابی و در نتیجه تشکیل گونه‌های واکنشی اکسیژن می‌شود که نه تنها در بافت ایسکمی بلکه اعضای دور

از ناحیه ایسکمی را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهند. با توجه به‌اینکه بافت کبد یکی از بسترهای عروقی است که رادیکال‌های آزاد به آن می‌رسند، لذا احتمال دارد اثرات سمی این مولکول‌ها در آن ظاهر شود (۲۳). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که میزان آنزیم‌های سرمی کبد موش صحرایی در گروه‌های ایسکمی - خونرسانی مجدد نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P < 0/05$). این یافته‌ها با نتایج مطالعه صورت گرفته توسط عبدال توابع در سال ۲۰۱۲ مطابقت دارد (۲۴). آنزیم‌های ALT و AST به مقدار فراوان در کبد وجود دارند و با آسیب سلول‌های کبدی، میزان این آنزیم‌ها در خون بالا می‌رود. آنزیم‌های کبدی در ارزیابی اختلالات کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرند. افزایش در فعالیت این آنزیم‌ها، منعکس کننده‌ی آسیب کبدی است و با هر اختلال التهابی در سلول‌های کبدی، این ترانس آمینازها افزایش می‌یابد (۲۵). همچنین مشخص گردید که تجویز عصاره‌ی برگ زیتون در موش صحرایی توانسته است میزان آنزیم‌های کبدی سرم را در گروه‌های تیمار به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های ایسکمی کاهش دهد ($P < 0/05$). این نتایج به همراه کاهش معنی‌دار سطح مالون دی آلدئید در گروه‌هایی که با عصاره‌ی برگ زیتون پیش درمانی شده‌اند، نشان می‌دهد که برگ زیتون قادر است استرس اکسیداتیو و روند التهاب را در کبد موش صحرایی کاهش دهد. دو علت اصلی آسیب‌های ایسکمی به خوبی شناخته شده‌اند که یکی فعالیت کمپلمان و دیگری تحریک نوتروفیلی می‌باشند. در شرایط ایسکمی با کاهش اکسیژن رسانی چسبیدن نوتروفیل‌ها به سلول‌های آندوتلیال افزایش می‌یابد، زیرا در این شرایط بیان مولکول‌های چسباننده در سطح سلول‌های آندوتلیال بیشتر می‌شود. این روند، سرانجام موجب دیپدز نوتروفیل‌ها، انفجار اکسیداتیو آن‌ها و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌گردد (۷). همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز در گروه کنترل به‌طور

گروه‌های مورد مطالعه تغییر معنی‌داری ندارد. آن‌ها در مطالعه‌ی خود به دنبال ۳۰ دقیقه ایسکمی ۲ ساعت دوره پرفوزیون داشته‌اند (۲۶ و ۷). از این رو، می‌توان نتیجه گرفت که دوره ایسکمی - خونرسانی مجدد یک فاکتور مهم در تعیین میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدان است (۷).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ایسکمی - خونرسانی مجدد کلیوی در موش صحرایی نه موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و آنزیم‌های ALT و AST بافت کبد می‌شود. در حالی که تجویز خوراکی عصاره‌ی برگ زیتون توانست از افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و آنزیم‌های ALT و AST کبد جلوگیری نموده و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان SOD و GPX آن را افزایش دهد. بدین ترتیب می‌توان گفت عصاره‌ی برگ زیتون، با داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی قادر است بافت کبد موش صحرایی را در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از روند ایسکمی - خونرسانی مجدد کلیوی محافظت نماید.

References

- 1- Hekimoglu AT, Toprak G, Akkoc H, Evliyaoglu O, Ozekinci S, Kelle I. Oxytocin ameliorates remote liver injury induced by renal ischemia reperfusion in rats. *Korean J Physiol Pharmacol* 2013; 17: 169-73.
- 2- Wang B, Bai M, Bai Y, Li Q. Liver injury following renal ischemia reperfusion in rats. *Transplantation Proceedings* 2010; 42: 3422-26.
- 3- Kurcer, Elif O, Hatice O, Fusun B, et al. Melatonin protects from ischemia/reperfusion-

معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌های مورد مطالعه است. این نتایج با یافته‌های سان و همکاران در سال ۲۰۰۴ و امره و همکاران در سال ۲۰۰۶ مطابقت دارد (۲۶ و ۷). همچنین، نتایج این پژوهش مشخص نمود که تجویز خوراکی عصاره‌ی برگ زیتون می‌تواند موجب افزایش فعالیت این آنزیم در بافت کبد موش صحرایی در گروه‌های تیمار گردد. چنانچه بین گروه 1hI/R با گروه 1hI/R-OLE به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود دارد. هر چند این افزایش در گروه 24hI/R-OLE معنی‌دار نیست. از سوی دیگر، بررسی داده‌های مربوط به فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز نشان می‌دهد که فعالیت این فاکتور در گروه کنترل به‌طور معنی‌داری از گروه‌های دیگر بالاتر است اما بین گروه کنترل با گروه 1hI/R-OLE اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. همچنین بین گروه 24hI/R با گروه 24hI/R-OLE اختلاف معنی‌داری دیده نمی‌شود. این نتایج با یافته‌های سان و همکاران سازگاری دارد در حالی که مطابق نتایج امره و همکاران نمی‌باشد. امره و همکاران نشان دادند که میزان مالون دی آلدئید و گلوکوتاتیون پراکسیداز در گروه کنترل نسبت به سایر

induced renal injury in rats: this effect is not mediated by proinflammatory cytokines. *J Pineal Res.* 2007; 43: 172-78.

4- Kosieradzki M. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplantation Proceedings.* 2008; 40: 3279-88.

5- Dun X, Lucien T, Rosa CM, Juan MS, Josefa CM, Russell J. Physiological ischemia/reperfusion phenomena and their relation to endogenous melatonin production. *Endocrine.* 2005; 27: 149-57.

- 6- Golab F, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, Hedayati M, Arab H, Schuster R. Ischemic and non-ischemic acute kidney injury cause hepatic damage. *Kidney International*. 2009; 75: 783-92.
- 7- Emre MH, Erdogan H, Fadillioglu E. Effect of BQ-123 and nitric oxide inhibition on liver in rats after renal ischemia-reperfusion injury. *gen. Physiol Biophys*. 2006; 25: 195-206.
- 8- Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. *CMAJ* 2005; 127: 367-79.
- 9- Nahed S, Hanan AM. Effects of renal ischemia reperfusion on brain, liver & kidney tissues in adult male rats. *Life Sci J*. 2011; 8: 204-12.
- 10- Pan S, Liu L, Pan H, et al. Protective effects of hydroxytyrosol on liver ischemia/reperfusion injury in mice. *Mol Nutr Food Res*. 2013; 57: 1218-27.
- 11- Guan T, Qian Y, Tang X, et al. Maslinic acid, a natural inhibitor of glycogen phosphorylase, reduces cerebral ischemic injury in hyperglycemic rats by GLT-1 up-regulation. *J Neurosci Res*. 2011; 89: 1829-39.
- 12- Lee OH, Lee BY, Lee J, et al. Assessment of phenolic-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresour Technol*. 2009; 100: 6107-13.
- 13- Syed HO. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm*. 2010; 30: 78: 133-54.
- 14- Syed HO. Cardio protective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm J*. 2010; 18: 111-21.
- 15- Tavafi M, Ahmadvand H, Toolabi P. Inhibitory effect of olive leaf extract on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iran J Kidney Dis*. 2012; 6: 25-32.
- 16- Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasoulzadeh B, Hashemi P, Pour MR. The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood-brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia. *Phytomedicine*. 2011; 18: 170-5.
- 17- Manuela A, Juan C, Raffaella M, et al. Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: Attenuation by dehydroepiandrosterone. *Kidney Int*. 2003; 64: 836-43.
- 18- Ersoz N, Guven A, Cayci T, Uysal B, Turk E, Oztas E. Comparison of the efficacy of melatonin and 1400W on renal ischemia/reperfusion injury: a role for inhibiting iNOS. *Ren Fail*. 2009; 31: 704-10.
- 19- Somi MH, Hajipour B, Asl NA, et al. Pioglitazone attenuates ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats. *Transplantation Proceedings*. 2009; 41: 4105-109.
- 20- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.
- 21- Özlem S, Aslan T, Tülay AC. Antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of extracts from medicinal plant *Euphorbia platyphyllos* L. *J Med Plants Res*. 2013; 7: 1293-1304.

- 22- Dekanski D, Ristic S, Radonjic NV, Petronigevic ND, Dekanski A, Itrovic DM. Olive leaf extract modulates cold restraint stress-induced oxidative changes in rat liver. *J Serb Chem Soc.* 2011; 76: 1207-18.
- 23- Rasoulia B, Jafari M, Noroozadeh A, et al. Effects of ischemia - reperfusion on rat renal tissue antioxidant system and lipid peroxidation. *Acta Medica Iranica.* 2008; 46: 353-60.
- 24- Hassan W, Abdel-Twaab N, Abdel-Twaab N. Effect of experimentally-induced renal ischemia/reperfusion injury on rat liver function: role of angiotensine II. *El Minia Med Bule J.* 2012; 23: 200-10.
- 25- Herizchi L, Farokhi F. The effects of lamotrigine and hydroalcoholic extract of melissa on the levels of liver enzymes and histopathological changes in experimental epileptic rats induced by pentylenetetrazol. *Qom Univ Med Sci J.* 2014; 8: 48-56.
- 26- Sun K, Liu ZS, Sun Q. Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic Ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning. *World J. Gastroenterol.* 2004; 10: 1934-38.

Pretreatment with Olive Leaf Extract on Liver Injury Following Ischemia-Reperfusion in Male Rats

Nasirzadeh MR¹

¹Dept. of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University Tabriz Branch, Tabriz, Iran.

Corresponding Author: Nasirzadeh MR, Dept. of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University Tabriz Branch, Tabriz, Iran

E-mail: mr.nasirzadeh@iaut.ac.ir

Received: 19 Apr 2015 **Accepted:** 26 Aug 2015

Background and Objective: Whereas renal ischemic-reperfusion injury increases lipid peroxidation level in the liver tissues, it decreases the antioxidant activity and antioxidant enzymes. Olive leaves are considered as significant sources of bioactive phenolic compounds with superior antioxidant capacity, anti-inflammatory and radical scavenging.

Materials and Methods: In this study 50 male rats were allocated randomly to 5 groups: 1) control, 2) 1h I/R, 3) 1h I/R-OLE (Olive Leaf Extract), 4) 24h I/R and 5) 24h I/R-OLE. The animals received 100 mg/kg olive leaf extract in 0.5 ml drinking water using gavage for 28 days in 3 and 5 groups before induction of ischemia (1 hour). Other animals received 0.5 ml normal saline by gavages. At the end of the reperfusion period (1 and 24 hours respectively), the serum level of urea, creatinine and liver enzymes as well as antioxidant enzymes including MDA, SOD and GPX were determined in liver tissue.

Results: MDA level in OLE- treated groups decreased significantly compared to ischemic-reperfusion groups ($p < 0.05$). In the meantime, it was detected that activity level of SOD and GPX in liver tissue of ischemic groups was significantly lower in comparison to OLE treated groups ($p < 0.05$).

Conclusion: This study enlightened that OLE is a protective agent against renal ischemic-reperfusion injury in liver tissue.

Keywords: Renal Ischemic-Reperfusion Injury, Olive Leaf Extract, Liver Antioxidant Enzyme, Male Rat