ORIGINAL ARTICLE

Biochemical and Histological Evaluation of Protective Effect of Royal Jelly on Pancreas-Induced Oxidative Stress in Male Rat Pancreas

Tayebeh Amirshahi[1],
Vahid Nejati[2],
Gholamreza Najafi[3]

[1] MSc Student in Histology and Embryology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Histology and Embryology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

(Received Auguast 21, 2013 ; Accepted September 15, 2013)

Abstract

Background and purpose: Bleomycin is a chemotherapic antibiotic used for treatment of human cancers. Royal jelly is secreted from the hypopharyngeal glands of nurse bees and consists of 66% water, 15% sugars, 5% lipids and 13% proteins, essential amino acids and different vitamins. 10-Hydroxy-2-Decenoic Acid is a kind of special active substance which exists only in royal jelly in the nature. The aim of the present study was to evaluate the protective effect of Royal jelly on bleomycin-induced oxidative stress and damages in adult male rat pancreas.

Materials and methods: Forty adult male Wistar rats (220±20gr) were randomly divided into 4 groups (n=10). Control group (CG): received normal saline10 mg / kg twice a week with IP for 48 days. Royal Jelly group (RJG): received Royal jelly at dose of 100 mg/kg daily for 48 days orally. Bleomycin Group (BLG): the rats received BL at dose of 10 mg/kg twice a week with IP for 48 days. Royal Jelly+ Bleomycin Group (RJ+BLG): received Royal Jelly at dose of 100 mg/kg /day orally concomitant with BL administration. Finally, the performance of antioxidants in pancreas tissue homogenates was measured and pathological studies were applied to evaluate the different levels of pancreatic damage.

Results: In rats that received Bleomycin and Royal jelly, Royal jelly decreased lipid peroxidation and increased antioxidant levels significantly. Royal jelly improved tissue damage induced by Bleomycin.

Conclusion: The results indicate that Royal jelly, due to its antioxidant properties, protects rat pancreases against toxic effects of Bleomycin.

Keywords: Bleomycin, Royal jelly, pancreas, antioxidant levels, Rat

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(107): 107-115 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۰۷ آذر سال ۱۳۹۲ (۱۱۵-۱۰۷)

بررسی بیوشیمیایی و هیستولوژیک اثر حفاظتی ژل رویال بر استرس اکسیداتیو ناشی از بلئومایسین در پانکراس موش های صحرایی نر

طیبه امیرشاهی[۱]
وحید نجاتی[۲]
غلامرضا نجفی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: بلئومایسین (BL) یک آنتی‌بیوتیک کموتراپیک است که به طور معمول برای درمان سرطان‌های انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ژل رویال (RJ) از ۶۶ درصد آب، ۱۵ درصد شکر، ۵ درصد چربی، ۱۳ درصد پروتئین، اسیدهای آمینه ضروری و ویتامین‌های مختلف تشکیل شده است. از جمله اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در آن می‌توان به ۱۰ هیدروکسی ۲ دکونئیک اسید (10-HDA) اشاره نمود که در طبیعت، تنها در ژل رویال دیده می‌شود و خواص اعجاب‌انگیزی را در بر دارد. هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی اثر حافظتی ژل رویال براسترس اکسیداتیو و آسیب‌های بافتی ناشی از بلئومایسین در پانکراس موش‌های صحرای نر بالغ است.

مواد و روش‌ها: چهل سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (۲۰gr ±۲۰۰) به‌طور تصادفی به ۴ گروه (n: ۱۰) شامل ۱- شاهد سالم،۲ - شاهد مثبت، ۳- شاهد مسموم، ۴- تیمار با ژل رویال، توزیع گردیدند. بلئومایسین (۱۰mg/kg) ۲ بار در هفته به مدت ۴۸ روز به صورت داخل صفاقی به گروه ۳ و ۴ تزریق شد. هم‌زمان به گروه ۱ نرمال سالین (۱۰mg/kg) تزریق و به گروه ۲و ۴ ژل رویال (۱۰۰mg/kg) روزانه به مدت ۴۸ روز گاواژ گردید. در پایان، عملکرد آنتی‌اکسیدان‌ها در هموژنات بافت پانکراس موش‌ها مورد سنجش قرار گرفت و آسیب شناسی بافتی نیز جهت ارزیابی درجات مختلف آسیب پانکراس انجام شد.

یافته‌ها: در موش‌های دریافت کننده بلئومایسین و ژل رویال، ژل رویال به طور معنی‌داری میزان پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش و سطوح آنتی‌اکسیدان‌ها را افزایش بخشید. در آسیب شناسی بافتی، ژل رویال، آسیب پانکراس ناشی از بلئومایسین را بهبود بخشید.

استنتاج: نتایج به دست آمده حاکی از این امر است که احتمالاً ژل رویال با خواص آنتی اکسیدانی خود، پانکراس موش‌های صحرایی را در برابر اثرات توکسیک بلئومایسین محافظت می‌کند.

واژه های کلیدی: بلئومایسین، ژل رویال، پانکراس، سطح آنتی‌اکسیدان، موش صحرایی

مقدمه

در حال حاضر سرطان بیضه شایع‌ترین سرطان مؤثر بر مردان در سن باروری است، اما در صورت تشخیص زود هنگام، این بیماری قابل معالجه و درمان می‌باشد(۱). تجویز هم‌زمان بلئومایسین، اتوپوزید و سیس پلاتین (BEP)

مولف مسئول: طیبه امیرشاهی– ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم زیستی، بخش بافت شناسی و جنین شناسی E-mail: t.amirshahi@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. استادیار، گروه بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. استادیار، گروه آناتومی و جنین شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۵/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۶/۱۹ تاریخ تصویب :۱۳۹۲/۶/۲۴

عمر مبتلایان به این سرطان را تا ۵ سال افزایش می‌دهد(۲). بلئومایسین (N1-[3-(dimethylsulphonio) propyl] bleomycin-amide) یک آنتی‌بیوتیک کموتراپیک است که توسط باکتری Streptomyces verticillus تولید می‌گردد و در درمان سرطان بیضه، سلول‌های سنگفرشی سر و گردن، گلو، سرویکس، پوست و کلیه کاربرد دارد. این دارو هم‌چنین ممکن است در افوزیون‌های بدخیم پریتونال وپلورال و در درمان لنفوم هوچکینی وغیرهوچکینی مؤثر باشد. بلئومایسین آنتی‌بیوتیکی است که اثر خود را هم بر روی سلول‌های قابل تقسیم و هم سلول‌هایی که در حال رشد نیستند، اعمال می‌کند. مکانیسم احتمالی آن، تداخل در فاز G2 تقسیم سلولی و جلوگیری از رشد سلول سرطانی است(۳). عوارض استفاده از این دارو شامل خستگی، ریزش مو، حالت تهوع و استفراغ، آسیب به کلیه، آسیب به اعصاب، آسیب به عروق خونی قلب، افزایش احتمال بیماری قلبی عروقی، آسیب ریوی و بروز سرطان ثانویه در جایی جدید، مثل خون (لوکمی)، ریه، رودهٔ بزرگ، پانکراس، مثانه، معده یا سایر ارگان‌ها می‌باشد(۴). ژل رویال (Rj) توسط غدد آرواره‌ای و زیر حلقی زنبور کارگر ترشح می‌گردد. ملکه با مصرف این ژل می‌تواند تا ۵ یا ۶ سال زنده بماند در حالی‌که عمر زنبورهای کارگر بین ۷ تا ۸ هفته می‌باشد(۵). Rj متشکل از ۶۶ درصد آب، ۱۵ درصد شکر، ۵ درصد چربی، ۱۳ درصد پروتئین می‌باشد و غنی از مواد معدنی، هورمون‌های طبیعی، ویتامین B، اسید چرب، اسید مولیک همراه با اسید آسپارتیک است که برای ترمیم بافت و رشد، حائز اهمیت می باشد. Rj سبب کاهش فشار خون و افزایش نرخ رشد شده و با دارا بودن مواد ضدعفونی کننده و فعالیت‌های ضد توموری، خاصیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی دارد(۶،۵). از جمله اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در ژل رویال می‌توان به ۱۰ هیدروکسی ۲ دکونئیک اسید (10-HDA) اشاره نمود که تنها در طبیعت ژله رویال دیده شده و خواص اعجاب انگیزی را در بر دارد(۷). نشان داده شده است که عملکرد پروتئین‌های Rj فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشته و این پروتئین‌ها توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را دارند(۷،۵). افزایش سطح رادیکال‌های آزاد و کاهش مکانیسم تدافعی آنتی‌اکسیدانی، موجب آسیب ارگانل‌های سلولی می‌گردد. هم‌چنین اکسیژن فعال در کارکرد طبیعی پانکراس تأثیر گذار است(۹،۸). بلئومایسین قادر به تضغیف دفاع آنتی‌اکسیدانی داخلی بوده که در نتیجه این عمل، اکسیدان‌ها آسیب بافتی را شدت می‌بخشند(۱۰). ژل رویال بر روی لوزالمعده اثرگذار است به‌طوری‌که فعالیت سلول‌های بتا را زیاد می‌نماید که در نتیجه این عمل، انسولین بیش‌تری تولید شده و باعث کاهش قندخون می‌گردد. علاوه بر این، ژل رویال یک ماده آنتی‌اکسیدان می‌باشد که مقاومت بدن را در برابر اثرات جانبی و زیان‌آور شیمی درمانی و اشعه درمانی بالا می‌برد و در نتیجه باعث بازسازی سلول‌ها و افزایش قدرت سیستم ایمنی بدن می‌شود و حتی خاصیت ضدتوموری نیز دارد(۱۱). ژل رویال ممکن است موجب بهبود وضعیت بیمار (بهبود سطح آنتی اکسیدان‌ها و کاهش لیپیدهای خون) شود(۱۲). هدف ما از ین مطالعه بررسی تأثیر حفاظتی ژل رویال بر آسیب‌های ناشی از بلئومایسین در بافت پانکراس و تغییرات بیوشیمیایی مربوط به استرس اکسیداتیو می‌باشد.

حیوانات مورد مطالعه

در این تحقیق ۴۰ رت نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۰ ±۲۰۰ گرم از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده علوم زیستی دانشگاه ارومیه

جهت انجام آزمایشات تهیه گردید. این حیوانات تحت شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲± ۲۲ درجه سانتی‌گراد در قفس‌های مخصوص پرورش و نگهداری شده و به صورت آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. لازم به ذکر است در برخورد با حیوانات، کلیه موازین اخلاقی بر اساس راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) رعایت گردیده است.

گروه بندی حیوانات

۴۰ رت نر بالغ به طور تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند:

گروه کنترل (CO): این گروه نرمال سالین را با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن هفته‌ای دوبار، از طریق تزریق درون صفاقی به مدت ۴۸روز دریافت نمودند.

گروه ژل رویال (RJ): این گروه ژل رویال را با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن روزانه یک بار به صورت خوراکی از طریق گاواژ به مدت ۴۸ روز دریافت کردند.

گروه بلئومایسین (BL): این گروه دارو را با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۴۸ روز (۲ بار در هفته) به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند.

گروه بلئومایسین ژل رویال (BL+RJ): این گروه دارو را ۲ بار در هفته با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از طریق تزریق درون صفاقی و ژل رویال را با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن روزانه یک بار به صورت خوراکی از طریق گاواژ به مدت ۴۸ روز دریافت کردند. نمونه‌برداری در ۴۸ روز بعد از شروع تیمار صورت گرفت.

مطالعه بیوشیمیایی سنجش قدرت اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی

پس از ۴۸ روز رت‌ها آسان کشی شدند و پوست ناحیه شکمی با الکل اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شده و پانکراس برداشته شد. بخشی از پانکراس در دمای ۷۰- فریز شد تا از آن برای سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی استفاده شود و قسمتی دیگر از پانکراس جهت مطالعات بافت شناسی در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شد. یکی از محصولات ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها، هیدروپراکسیدها هستند که در اثر متابولیزه شدن در سیستم‌های بیولوژیکی به فرم آلدئید در می‌آیند(۱۳،۱۴). تشخیص و اندازه‌گیری این ترکیبات به عنوان یک شاخص پراکسیداسیون لیپیدها محسوب می‌شود یکی از فرم‌های آلدئیدی ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها مالون دی آلدئید (MDA) بوده که به عنوان یک مارکر ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدها اندازه‌گیری می‌شود در این آزمایش غلظت عامل واکنش‌گر تیوباربیتوریک اسید (TBA) در پانکراس معرف میزان استرس اکسیداتیو می‌باشد.

روش اندازه گیری مالون دی آلدئید

برای این منظور یک گرم از بافت پانکراس در بافر فسفات صفر درجه سانتی‌گراد ۰۵/۰۵ مولار با ph=۷/۴ و با غلظت ۱۰ درصد (w/v) هموژنیزه گردید و سپس محلول‌های حاصل با دور g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شده، مایع‌رویی جهت میزان تولید محصولات پراکسیداسیون لیپید مورد استفاده قرار گرفت. سطح پراکسیداسیون لیپیدها از روش cheeseman و esterbauer اندازه‌گیری شد(۱۵). درجه پراکسیداسیون لیپیدها بر مبنای میزان تشکیل مالون دی آلدیید (MDA) تعیین می‌گردد. مالون دی آلدئید محصول نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب است و با تیوباربیتوییک اسید (TBA) وارد واکنش شده و کمپلکس رنگی ایجاد می‌کند. اساس روش اندازه‌گیری اسپکتروفتومتریک رنگ ایجاد شده بر اثر واکنش TBA باMDA می‌باشد. بدین منظور ۳۰۰ میکرولیتر تری کلریک اسید ۱۰ درصد به ۱۵۰ میکرولیتراز محلول رویی نمونه سانترفوژ شده اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۰۰۰ در دمای ۴

درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به لوله آزمایش منتقل و با ۳۰۰ میکرولیتر از تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷ درصد در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۵ دقیقه انکوبه شد. ۵ دقیقه بعد از خنک شدن محلول، رنگ صورتی ناشی از واکنش TBA-MDA ظاهر و به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر ارزیابی گردید. غلظت MDA بصورت nmol/g wet tissue بیان شد(۱۶).

روش اندازه گیری قدرت آنتی اکسیدانی کل (FRAP)

قدرت آنتی‌اکسیدانی کل پانکراس با اندازه‌گیری قدرت احیاء کنندگی/ آنتی‌اکسیدانی فریک (FRAP:Ferric Antioxidant Power) محاسبه گردید. سنجش FRAP قدرت آنتی‌اکسیدانی هموژنه بافت را محاسبه می‌کند(۱۸،۱۷). به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول هموژنای بافت، ۳ ml معرف FRAP اضافه نموده و به مدت ۷-۱۰ دقیقه انکوبه گردید. جذب کمپلکس آبی رنگ در ۵۹۳ نانومتر قرائت گردید.

روش اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت کاتالاز بر اساس توانایی آن در تجزیه H_2O_2 در بافت هموژنیزه شده پانکراس به روش Aebi تعیین گردید(۱۹). تجزیه H_2O_2 با کاهش جذب در طیف جذبی ۲۴۰ نانومتر قابل بررسی می‌باشد. تفاوت در جذب در واحد زمان معادل مقدار فعالیت کاتالاز است. برای این منظور از پراکسید هیدروژن ۲۰ میلی مولار به عنوان سوبسترا و از بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با ph=۷/۴ به عنوان جایگزین سوبسترا در محلول بلانک استفاده شد. محلول سنجش محتوی ۲ میلی‌لیتر محلول هموژنای بافتی و ۱ میلی لیتر محلول پراکسید هیدروژن می‌باشد. واکنش با افزودن H_2O_2 شروع شد و کاهش در جذب به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه بررسی و در پایان مقادیر بر حسب U/g protein بیان گردید.

مطالعات هیستوپاتولوژیکی

قسمتی از بافت پانکراس در فرمالین ۱۰ درصد فیکس گردید. پس از فیکس شدن نمونه‌ها، مراحل آب‌گیری و شفاف‌سازی بافت ها و قالب‌گیری انجام گرفت. برش‌هایی با ضخامت ۵-۳ میکرومتر از بافت تهیه و با رنگ‌های هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند برش‌های آماده شده هم از لحاظ کمی (مورفومتریک) و هم از لحاظ کیفی (مورفولوژیک) مورد بررسی قرار گرفتند. در آنالیز کمی لام ها، فاکتورهای زیر بررسی گردید:

۱. میانگین تعداد جزایر لانگرهانس در ۱۰ فیلد میکروسکوپ نوری (عدسی × ۴۰) در هر لام تعیین شد و در مجموع ۲۰ فیلد برای هر گروه شمارش شد.

۲. قطر متوسط هر جزیره نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

قطر متوسط جزیره $= \sqrt{l \times b}$ × بزرگ‌نمایی جزیره می‌باشد. عرض برابر با b برابر با طول جزیره و ۱ فوق در معادله

محاسبات آماری

داده های حاصل از این آزمایش با آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) تجزیه و تحلیل شد و آزمون Tukey برای تعیین گروه‌های دارای اختلاف، استفاده شد ($p < ۰/۰۵$) به عنوان ملاک معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌های آزمایش در نظر گرفته شد و مقادیر به دست آمده به صورت (میانگین ± خطای استاندارد) گزارش شد.

یافته ها

تغییرات قدرت اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی

پس از پایان دوره تیمار غلظت مالون دی آلدئید، کاتالاز و هم‌چنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در بافت پانکراس مورد سنجش قرار گرفت. همان‌گونه که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود سطح پراکسیداسیون

چربی‌ها در گروه تحت تیمار با بلئومایسین به طور معنی‌داری (p <۰/۰۱) نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. در گروه ترکیبی، سطح MDA نسبت به گروه دارو به طور معنی‌دار کاهش یافته اما به سطح گروه کنترل و گروه ژل رویال نرسیده است. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در گروه دارو به طور معنی‌دار (p <۰/۰۱) نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است اما در گروه ترکیبی این میزان افزایش قابل توجهی داشته است.

جدول شماره ۱: تأثیر تیمار ژل رویال بر سطح مالون دی آلدئید، آنزیم کاتالاز و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در پانکراس رت های تحت درمان با بلئومایسین

FRAP (Mm/wet tissue)	MDA (nmol/g wet tissue)	CAT (U/g protein)	Group
۳/۸۳ ± ۰/۳۱	۱/۵۴ ±۰/۲۳	۱/۴۵ ±۰/۰۲	Control
۴/۵۸ ± ۰/۱۱	۱/۳۷ ±۰/۲۷	۱/۶۱ ±۰/۰۱	Royal jelly
۲/۴۲ ±۰/۰۳	۲/۳۰ ±۰/۳۶	۰/۵۵ ±۰/۰۲	Bleomycin
۳/۴۴ ±۰/۰۸	۲/۱۷ ±۰/۲۲	۱/۱۶ ±۰/۰۳	Royal jelly+Bleomycin

داده‌های حاضر به‌صورت میانگین± خطای استاندارد بیان شده‌اند (p<۰/۰۱).
a :اختلاف معنی دار با گروه کنترل (p <۰/۰۱).
b : اختلاف معنی دار با گروه ژل رویال (p <۰/۰۱).
c: اختلاف معنی دار با گروه داروی بلئومایسین (p <۰/۰۱).

مطالعه هیستومورفولوژیک پانکراس

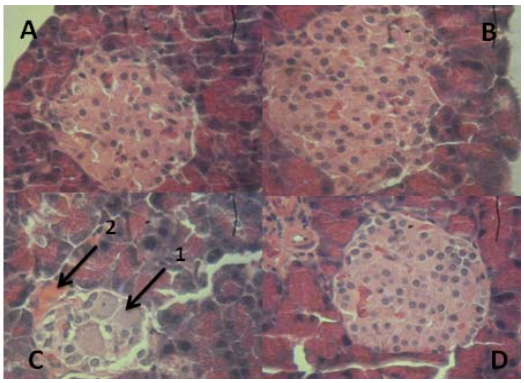
در آنالیز هیستومورفیک، تعداد جزایر لانگرهانس در گروه تحت تیمار با داروی ضد سرطان بلئومایسین (BL)، نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری (p <۰/۰۱) نشان داد. اگر چه شمار جزایر در گروه ترکیبی (BL+RJ) افزایش معنی‌دار نسبت به گروه BL یافته است اما با گروه‌های RJ و گروه کنترل اختلاف معنی‌دار (p <۰/۰۵) دارد.

قطر جزایر لانگرهانس در گروه (BL)، نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری (p <۰/۰۱) یافته است. در گروه ترکیبی (BL+RJ) افزایش معنی دار نسبت به گروه BL یافته است اما این اختلاف نسبت به گروه‌های RJ و گروه کنترل معنی‌دار نیست.

تغییرات هیستوپاتولوژیکی پانکراس

در گروه تحت تیمار با داروی بلئومایسین، همان‌گونه که در تصویر شماره ۱(C) دیده می‌شود کاریومگالی (بزرگی غیرطبیعی هسته یاخته) (فلش شماره ۱)، لیز شدن و قطعات باقی مانده سلول‌های تخریب شده (فلش شماره ۲) مشاهده می‌گردد.

در گروه تحت تیمار با ژل رویال آسیب‌های ناشی از بلئومایسین کاهش چشم‌گیری یافته‌اند (تصویر شماره ۱-D). به طوری‌که هسته‌ها حالت طبیعی‌تری داشته و ظاهری، نزدیک به بافت طبیعی دارند.



تصویر شماره ۱: تأثیر حفاظتی ژل رویال در پانکراس موش های تحت درمان با داروی بلئومایسین. رنگ آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی 400×
A: بافت پانکراس طبیعی (گروه کنترل)، B: گروه کنترل مثبت (ژل رویال)، C: گروه تحت درمان با داروی بلئومایسین، D: گروه ترکیبی (بلئومایسین+ ژل رویال)

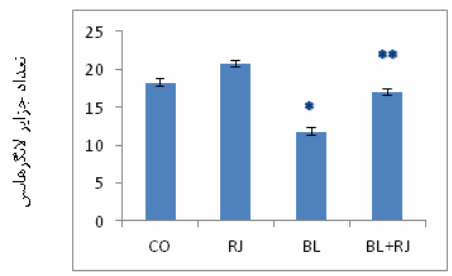
بحث

در طی ۵۰ سال اخیر، برای جلوگیری از بیماری‌هایی هم‌چون سرطان بیضه از تکنیک‌های شیمی درمانی بهره گرفته می‌شود. در این روش، داروهای شیمیایی خاصی تجویز می‌گردد که گرچه مصرف این داروها عمر بیمار را افزایش می‌دهد، اما با عوارض جانبی جدی همراه می‌باشند که این عوارض، عملکرد طبیعی بدن را دستخوش تغییرات ناخوشایندی می‌نماید(۲۰). بلئومایسین آنتی بیوتیکی ضد تومور است که همراه با داروهای سیس پلاتین و اتوپوزید در درمان سرطان بیضه

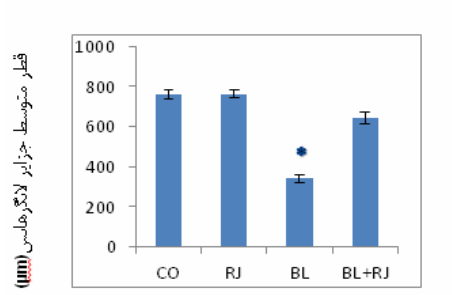
مورد استفاده قرار می‌گیرد(۲۱). داروهای شیمی درمانی می‌توانند به طور غیرمستقیم، از طریق تولید رادیکال‌های آزاد یا از طریق همانندسازی DNA الگوی آسیب دیده، مهار سنتز DNA و یا مهار توپوایزومراز ۲ سبب ایجاد آسیب در بافت‌های بدن گردند(۲۲). بیان ژن و فعالیت تعدادی ازآنزیم‌های کلیدی و آنتی‌اکسیدانی‌پانکراس، مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در مقایسه با بافت‌هایی مانند کبد کم می‌شود که این امر، به نوعی موجب افزایش آسیب‌پذیری سلول‌های بتا در برابر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و افزایش صدمات ناشی از رادیکال‌های آزاد و در نهایت مرگ سلول‌های بتا خواهد شد(۲۳، ۲۴).

تحقیقات Onuma و همکاران در سال ۱۹۷۴ نشان داد که اتصال بلئومایسین به DNA سبب تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد(۲۵). ROS سبب شکسته شدن رشته‌های DNA می‌شود که در نهایت این عوامل موجبات مرگ سلول را فراهم می‌نماید. سیستم دفاعی بدن ما، مولکول‌هایی متشکل از آنتی‌اکسیدان ها را در اختیار دارد که وظیفه آن‌ها از بین بردن رادیکال‌های آزاد موجود در بدن است. فقدان یا کمبود آنتی‌اکسیدان‌ها، اختلال‌های زیان آوری برای بدن در پی خواهد داشت. مقدار آنزیم‌های کلیدی مؤثر در زدودن گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در جزایر پانکراس نسبت به سایر بافت‌ها کم‌تر است که این امر موجب افزایش احتمال آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو در این سلول‌ها می‌شود(۲۶، ۲۷). در مطالعه حاضر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در گروه تحت درمان با داروی بلئومایسین به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است (جدول شماره ۱).

تحقیقات Tobwala همکاران در سال۲۰۱۳ نشان داد که بلئومایسین با ایجاد اختلال در سلول‌های میتوکندری سبب افزایش سطح MDA در سلول‌های اپی‌تلیال ریه می‌گردد(۲۸). مطابق جدول شماره ۱ شاخص میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه تحت درمان با داروی بلئومایسین افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) نسبت به گروه کنترل نشان داده است. Nagai و همکاران در سال ۲۰۰۴ بیان کردند، عملکرد پروتئین‌های Rj فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشته و این پروتئین‌ها توانایی مهار رادیکال های آزاد مانند آنیون سوپر اکساید رادیکال DpHH (دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازین) و هیدروکسی رادیکال ۸ را دارد(۵). مطالعه حاضر نشان داد که ژل رویال باعث افزایش قدرت آنتی اکسیدانی کل، فعالیت آنزیم کاتالاز و کاهش سطح پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) شده است (جدول شماره ۱). افزایش سطح رادیکال‌های آزاد و کاهش مکانیسم تدافعی آنتی اکسیدانی موجب آسیب ارگانل‌های سلولی، آنزیم‌ها، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش مقاومت انسولین می‌شود. در مطالعه حاضر کاهش تعداد و قطر جزایر لانگرهانس درگروه درمان با بلئومایسین مشاهده گردید (نمودارهای شماره ۱و ۲). آسیب به سلول‌های بتا باعث اختلال در عملکرد پانکراس می‌گردد.



نمودار شماره ۱: تأیر ژل رویال بر تعداد جزایر لانگرهانس در موش های تحت درمان با بلئومایسین. هر ستون نمایانگر میانگین ± خطای استاندارد است.* اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) با گروه CO، RJ و BL+RJ و ** اختلاف معنی دار ($p<۰/۰۵$) با گروه RJ



نمودار شماره ۲: تاثیر ژل رویال بر متوسط قطر جزایر لانگرهانس، در موش های تحت درمان با بلئومایسین.هر ستون نمایانگر میانگین ± خطای استاندارد است.* اختلاف معنی دار ($p<۰/۰۱$) با گروه CO، RJ و BL+RJ

Bărnuțiu و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان کردند که ژل رویال توانایی مهار هایپوگلایسمی، قند خون و فعالیت بهبود زخم، سیستم ایمنی و فعالیت استروژن را داراست به طوری که علایم یائسگی را بهبود می‌بخشد(۷). در مطالعه حاضر، نیز ژل رویال توانسته آسیب‌های ناشی از بلئومایسین را بهبود ببخشد. همان‌گونه که در نمودارهای شماره ۱و ۲ دیده می‌شود میانگین تعداد و قطر جزایر لانگرهانس در گروه ترکیبی (RJ+BL)، نسبت به گروهی که تنها داروی بلئومایسین را دریافت نموده بودند، افزایش معنی‌داری نشان داد. Silici و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثرات حفاظتی ژل رویال را بر آسیب‌های ناشی از سیس پلاتین در بافت بیضه را مورد بررسی قرار دادند. وی بیان کرد که سیسپلاتین باعث افزایش سطح MDA در بافت بیضه و کاهش قدرت باروری در موش‌های تحت درمان با این دارو می‌شود اما مصرف توأم ژل رویال با داروی سیسپلاتین سطح MDA را به طور معنی‌داری کاهش و شاخصه‌های باروری موش ها را بهبود بخشید(۱۲). همان‌گونه که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود ژل رویال سطح MDA را در گروه ترکیبی به طور معنی‌داری نسبت به گروه دارو کاهش داده است.

در پایان می‌توان نتیجه گیری کرد که نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که بلئومایسین باعث کاهش تعداد و قطر جزایر پانکراس می‌گردد و به بافت پانکراس آسیب‌هایی از قبیل کاریو مگالی وارد می‌کند. تنش (Stress) اکسیداتیو به وجود آمده، ناشی از BL می‌تواند با ایجاد رادیکال‌های آزاد در سلول‌های آسینار، منجر به التهاب بافت پانکراس گردد. استفاده از ژل رویال آسیب‌های ناشی از مصرف بلئومایسین را به طور چشم‌گیری کاهش بخشید. بنابراین استفاده از ژل رویال می‌تواند تا حدودی از اثرات تخریبی بلئومایسین جلوگیری نماید، لذا افرادی که تحت درمان با داروی ضد سرطان بیضه می‌باشند، می‌توانند با مصرف ژل رویال آثار تخریبی این دارو را به حداقل برسانند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس خود را نسبت به معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه و هم‌چنین سرکار خانم فرناد، مسئول آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه ارومیه ابراز می‌دارند.

References

1. Bray F, Richiardi L, Ekbom A, Pukkala E, Cuninkova M, Moller H. Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries: continuing increases in incidence and declines in mortality. Int J Cancer 2006; 118(12): 3099-3111.
2. Robinson D, Moller H, Horwich A. Mortality and incidence of second cancers following treatment for testicular cancer. Br J Cancer 2007; 96(3): 529 533.
3. Du L, Sánchez C, Chen M, Edwards DJ, Shen B. The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from Streptomyces verticillus ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. Chem Biol 2000; 7(8): 623-42.
4. Amato RJ, Ro JY, Ayala AG, Swanson DA. Risk-adapted treatment for patients with clinical stage I nonseminomatous germ cell tumor of the testis. Urology 2004; 63(1): 144-148.
5. Nagai T, Inoue R. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. Food Chem 2004; 84(2): 181–186.
6. Morita H, Ikeda T, Kajita K, Fujioka K, Mori I, Okada H, et al. Effect of royal jelly

ingestion for six months on healthy volunteers. Nutrition 2012; 10(77): 1186-1475.

7. Bărnuțiu LI, Mărghitaş LA, Dezmirean DS, Mihai CM, Bobiş O. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Royal Jelly-Review. Animal Science and Biotechnologies 2011; 44(2).
8. Sver L, Orsolic N, Tadic Z, Njari B, Valpotić I, Basić I. Royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1996; 19(1): 31-38.
9. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 2001; 414(6865): 813-820.
10. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol 2003; 17(1): 24-38.
11. Atzori L, Chua F, Dunsmore SE, Willis D, Barbarisi M, McAnulty RJ, et al. Attenuation of bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice using the heme oxygenase inhibitor Zn-deuteroporphyrin IX-2,4-bisethylene glycol. Thorax 2004; 59(3): 217-223.
12. Inoue S, Koya-Miyata S, Ushio S, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Royal jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: correlation with reduced DNA damage. Exp Gerontol 2003; 38(9): 965-969.
13. Silici S, Ekmekcioglu O, Kanbur M, Deniz K. The protective effect of royal jelly against cisplatin-induced renal oxidative stress in rats World J Urol 2010; 29(1): 127-132.
14. Oranje WA, Roundas C, Swennen GN, Wolffenbuttel BH. Lipid peroxidation in type2 diabetes: Relationship with macrovascular disease? Neth J Med 1999; 53(2): 61-68.
15. Yagi K. Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. Free Radic Antiox Protoc. Methods in Molecular Biology 1998; 108: 101-106.
16. Esterbauer H, Chesseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation product: malonaldhyde and 4- hydroxynonenal. Metod Enzymol 1990; 186: 407-421.
17. Hosseinzade H, Sadeghnia RH. Safranal, aconstituent of corcus sativus (saffron), attenuated cerebral ischemia induced oxidative damage in rat hippocampus. J Pharm Pharm Sci 2005; 3(8): 394-399.
18. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem 1996; 239(1): 70-76.
19. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing/ antioxidant power: Direct measured of the total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simulations measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Medthods Enzymol 1999; 299: 15-27.
20. Havir EA, Mellate NA. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. Plant Physiol 1987; 84(2): 450-455.
21. Maselli J, Hales B, Chan P, Robaire B. Exposure to Bleomycin, Etoposide, and Cis-Platinum Alters Rat Sperm Chromatin Integrity and Sperm Head Protein Profile 12, 3,5,6. Biol Reprod 2012; 86(5): 166.
22. De Mas P, Daudin M, Vincent M, Bourrouillou G. Increased aneuploidy in spermatozoa from testicular tumour patients after chemotherapy with cisplatin, etoposide and bleomycin. Hum Reprod 2001; 16(6): 1204-1208.

23. Guillem V, Tormo M. Influence of DNA damage and repair upon the risk of treatment related leukemia. Leukemia & Lymphoma 2008; 49(2): 204-217.
24. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzymegene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. Free Radic Biol Med 1996; 20(3): 463-466.
25. Ho E, Bray TM. Antioxidants NFk B activation and diabetogenesis. Proc Soc Exp Biol Med 1999; 222(3): 205-213.
26. Onuma T, Holland JF, Masuda H, Waligunda JA, Goldberg GA. Microbiological assay of bleomycin: Inactivation, tissue distribution, and clearance. Cancer 1974; 33(5): 1230-1238.
27. Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocininduced diabetes. Clin Sci 1998; 94(6): 623-632.
28. Grankvist K, Marklund SL, TaljedalI B. Cu Znsuperoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathionr peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. Biochem J 1981; 199(2): 393-398.
29. Tobwala S, Fan W, Stoeger T, Ercal N. N-acetylcysteine amide, a thiol antioxidant, prevents bleomycin-induced toxicity in human alveolar basal epithelial cells (A549). Free Radic Res 2013; 47(9): 740-749.