

## *Protective Effect of Curcumin on the Superoxide Dismutase and Catalase Activity in Kidney of Acetaminophen-exposed Rats*

Mehryar Zargari<sup>1</sup>,  
Saiedeh Ahmadi<sup>2</sup>,  
Samaneh Shabani<sup>3</sup>,  
Abdolkarim Mahrooz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> MSc Student in Biochemistry, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

(Received September 14, 2012 ; Accepted November 12, 2012)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Acetaminophen is one of the most popular analgesic and antipyretic drugs and its overdose can cause severe damage to liver and kidneys in human and animals. Renal dysfunction and acute renal injury can occur without damage in the liver. Unlike liver damage, mechanisms of kidney damage are poorly understood. The aim of present study was to investigate the protective effect of curcumin, derived from *Curcuma longa*, on acetaminophen-induced kidney damage.

**Materials and methods:** This study was performed in rats that were divided into five groups. Group I as control, group II was i.p. injected with curcumin (200 mg/kg b.w). Group III received DMSO as vehicle control. Group IV was treated with a single dose of acetaminophen (1000 mg/kg b.w, i.p.), and group V that received acetaminophen+Curcumin. After 24 hours, all rats were sacrificed with mild anesthesia. Urea, creatinine and total antioxidant capacity (TAC) in the plasma, lipid peroxidation (TBARS) and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in the kidney homogenate were measured. Data analysis was done using SPSS and the differences between the groups were analyzed applying t-test and Mann Whitney tests at the significance level of 0.05.

**Results:** Administration of acetaminophen caused elevated level of urea and creatinine in plasma and TBARS in kidney. While the activities of SOD and CAT decreased in kidney tissue. Curcumin with acetaminophen decreased the urea, creatinine and TBARS levels significantly increased TAC and activity of SOD, CAT.

**Conclusion:** Our results showed curcumin as the potent protective agent against acetaminophen (acute dose) induced biochemical alterations and oxidative damage in rats. However, further studies are necessary to identify the curcumin's mechanism of biochemical reaction before clinical application.

**Keywords:** Acetaminophen, curcumin, superoxide dismutase, catalase

# بررسی اثر محافظتی کورکومین بر فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در کلیه موش صحرایی مواجهه شده با استامینوفن

مهریار زرگری<sup>۱</sup>  
سعیده احمدی<sup>۲</sup>  
سمانه شعبانی<sup>۳</sup>  
عبدالکریم مهرروز<sup>۱</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** استامینوفن (پاراستامول) یک داروی متداول ضد درد و ضد تب است که به طور وسیع در سراسر دنیا مورد استفاده قرار می گیرد این دارو در دوزهای بالا منجر به نکرور کبدی و کلیوی در انسان و حیوان می گردد هر چند آسیب کلیوی و اختلالات حاد کلیوی می تواند بدون آسیب کبدی نیز ایجاد شود مکانیسم آسیب کلیوی برخلاف آسیب کبدی به خوبی شناخته نشده است و یکی از دلایل شایع مراجعه به اورژانس می باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر محافظتی کورکومین (Curcumin)، مشتق شده از گیاه زردچوبه استامینوفن در آسیب کلیوی ایجاد شده توسط استامینوفن می باشد.

**مواد و روش ها:** این مطالعه روی موش های صحرایی نر نژاد ویستار انجام شد. استامینوفن در محلول ۵ درصد دی متیل سولفواکساید (DMSO) حل و به صورت داخل صفاقی به میزان ۱۰۰۰ mg/Kg وزن حیوان تزریق شد. کورکومین به میزان ۲۰۰ mg/kg محلول در دی متیل سولفواکساید نیز به صورت داخل صفاقی در گروه های مربوطه تزریق گردید. حیوانات به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند. (I) گروه کنترل نرمال (II) گروه تیمار تحت تزریق با استامینوفن (III) گروه تیمار تحت تزریق با کورکومین و بعد از ۳۰ دقیقه از تزریق استامینوفن (IV) گروه تحت تزریق فقط با کورکومین (V) گروه Vehicle تحت تزریق با DMSO. بعد از طی دوره زمانی ۲۴ ساعته از تزریق حیوانات، خون گیری انجام و سطح اوره و کراتینین در پلاسما اندازه گیری شد. میزان پراکسیداسیون لیپیدها و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در کلیه و ظرفیت کل آنتی اکسیدانی پلاسما سنجش شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزارهای آماری انجام شد.

**یافته ها:** تجویز استامینوفن باعث افزایش سطح مارکرهای بیوشیمیایی اوره و کراتینین در پلاسما و پراکسیداسیون لیپیدها در کلیه به طور معنی داری شد، میزان فعالیت آنتی اکسیدان های آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در بافت کلیوی کاهش یافت. استفاده از کورکومین در گروه های مواجهه یافته با استامینوفن به میزان قابل توجهی کاهش غلظت اوره، کراتینین و لیپید پراکسیداسیون را باعث گردید اما به طور قابل توجهی افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز و سوپراکسید و به ویژه ظرفیت کل آنتی اکسیدانی پلاسما را به همراه داشت.

**استنتاج:** نتایج ما نشان می دهد که کورکومین می تواند عامل حفاظتی قدرتمندی در برابر تغییرات بیوشیمیایی و آسیب اکسیداتیو ناشی از مواجهه با دوز حاد استامینوفن در موش صحرایی شود. اما مطالعات بیشتری برای تأیید این موضوع به ویژه از نظر مکانیسم بیوشیمیایی آن، قبل از کاربرد بالینی لازم است.

**واژه های کلیدی:** کورکومین، استامینوفن، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز

## مقدمه

مؤثر به طور گسترده ای در سراسر دنیا مورد استفاده قرار می گیرد. امروزه مشخص شده است که مصرف دوزهای

استامینوفن (N-acetyl-p-aminophenol; APAP) یا پاراستامول به عنوان یک داروی ضد درد و تب مفید و

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۹۰-۹۰ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تأمین شده است.

E-mail: zargari.mehryar@gmail.com

مؤلف مسئول: مهریار زرگری - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

۱. گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۹۱/۷/۲۲ تاریخ تصویب: ۹۱/۸/۲۲

و کاهش فیلتراسیون گلو مریولی مشخص می گردد (۱۱،۶). مکانیسم آسیب های کبدی حاصل از مصرف حاد استامینوفن به خوبی شناخته شده است ولی چگونگی آسیب کبدی به درستی مشخص نمی باشد. فرایند استرس اکسیداتیو می تواند یک دلیل عمده این موضوع باشد که تجویز دوزهای زیاد استامینوفن با افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش میزان گلو تاتیون داخل سلولی در بافت کبدی همراه می گردد (۱۲،۱۳).

امروزه از N-استیل سیستین (پیش ساز گلو تاتیون) به عنوان یک داروی شناخته شده در درمان مسمومیت با استامینوفن استفاده می شود و دارای اثرات حفاظتی بر روی آسیب کبدی می باشد ولی سودمندی آن به منظور ممانعت از آسیب های کبدی مورد شک قرار دارد (۱۴). با توجه به اثرات آسیب زنده استامینوفن بر روی بافت کبدی، استفاده از داروهای جدید یا ترکیبات محافظت کننده به ویژه آنتی اکسیدان های طبیعی حاصل از گیاهان از اهمیت خاصی برخوردار می باشد. در چندین مطالعه ترکیبات مختلفی مانند ویتامین E و C، ملاتونین به منظور جلوگیری از ایجاد آسیب های کبدی و کبدی توسط استامینوفن مورد بررسی قرار گرفته اند (۱۷-۱۵). ترکیب کورکومین که یکی از مواد مؤثره گیاه زرد چوبه است. این گیاه یکی از اعضاء خانواده زنجبیل (Zingiberaceae) بوده که اثرات حفاظتی آن بر روی کبد مشخص گردیده است (۱۸). در مطالعات قبلی *in vitro* نشان داده شده که دارای ویژگی کاهش مقدار رادیکال سوپر اکسید (۱۹)، رادیکال هیدروکسیل (۲۰) و اکسیژن تکی (۲۱) می باشد. کورکومین علاوه بر خاصیت آنتی اکسیداتیو دارای خواص ضد التهابی (۲۲) می باشد. لذا به نظر می رسد که این ماده می تواند تأثیر بهتری نسبت به سایر آنتی اکسیدانت ها در برابر استامینوفن داشته باشد.

هدف از این مطالعه بررسی اثرات حفاظتی کورکومین بر شدت آسیب کبدی حاصل از تجویز حاد استامینوفن با سنجش مقادیر اوره و کراتینین پلاسمایی به عنوان مارکرهای عملکردی کبدی، TBARS

زیاد از استامینوفن می تواند باعث آسیب شدید کبدی و کلیوی، نارسایی حاد کلیوی و یا حتی مرگ و میر در افراد و حیوانات آزمایشگاهی شود (۲۰،۱). شروع سمیت APAP حاصل متابولیسم دارو در کبد و بافت های خارج کبدی می باشد (۳). گونه های فعال اکسیژن (ROS) شامل هیدروژن پراکساید، سوپراکساید و رادیکال های هیدروکسیل می توانند در سلول ها توسط چندین مکانیسم تولید شوند که یکی از آنها متابولیسم دارو است. آسیب کبدی و کلیوی القاء شده توسط استامینوفن احتمالاً توسط رادیکال های آزاد انجام می شوند (۴،۵). مطالعات انجام یافته متعددی تأکید بر القاء آسیب های اکسیداتیو توسط استامینوفن داشته که با وقایعی مانند پراکسیداسیون لیپیدهای بافتی، غیر فعال سازی آنزیم ها و تغییرات سیستم های دفاعی آنتی اکسیدانتی آنزیمی و غیر آنزیمی داخل سلولی و وضعیت گلو تاتیون همراه می شود (۶،۷). در دوزهای درمانی APAP توسط فرایند گلو کورنیداسیون و سولفوناسیون در کبد متابولیزه شده، باعث ایجاد متابولیت های محلول در آب می گردد که از طریق کلیه ها دفع می شوند. نتیجه تبدیل متابولیک APAP توسط سیستم آنزیمی میکروزومی P-450، ایجاد حد واسط بسیار فعال به نام N-استیل پارا بنزوکینون ایمین (NAPQI) است. این متابولیت الکتروفیل سپس توسط گلو تاتیون احیاء و به فرم مرکاپتوریک اسید دفع می شود (۸). در زمان بیش از حد استامینوفن ذخایر سولفات و گلو تاتیون کاهش می یابند و سبب هدایت آن به سوی سیستم میکروزومی P-450 و تولید مقادیر متناسبی از NAPQI به فرم غیر باند شده با گلو تاتیون می گردد و امکان اتصال به ماکرومولکول های پروتئینی سلول می یابند (۸) و با به هم خوردن هموستاز سلولی و ایجاد آپوپتوزیز (مرگ برنامه ریزی شده سلولی)، نکروز سلولی و در نهایت اختلال عملکرد ارگان را سبب می شوند (۹،۱۰) و با نارسایی کلیوی ناشی از مصرف حاد استامینوفن همراه با نکروز توبول های کلیوی می باشد که با افزایش مقادیر کراتینین پلاسمایی

شاخص محصولات پراکسیداسیون لیپیدها همراه با آنزیم های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و ظرفیت آنتی اکسیدانی پلاسما به عنوان عوامل ارزیابی کننده استرس اکسیداتیو در مدل تجربی حیوانی می باشد.

## مواد و روش ها

این مطالعه روی موش های صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی  $20 \pm 200$  گرم و سن ۸ هفته که از انستیتو پاستور خریداری شده بود، انجام شد. حیوانات در مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی در دانشکده پزشکی ساری تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، غذا و آب قرار گرفتند. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی، هنگام کار با حیوانات رعایت شد. مواد شیمیایی مورد استفاده، شامل استامینوفن که از شرکت سیگما تهیه شد و در محلول ۵ درصد دی متیل سولفواکساید (DMSO) حل و به صورت داخل صفاقی به میزان  $1000 \text{ mg/Kg}$  وزن حیوان تزریق شد. کورکومین تهیه شده از شرکت سیگما به میزان  $200 \text{ mg/kg}$  محلول در دی متیل سولفواکساید نیز به صورت داخل صفاقی در گروه های مربوطه تزریق گردید. انتخاب دوز استامینوفن و کورکومین بر اساس مطالعات قبلی انجام شد (۱۷، ۱۵). دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز با خلوص بالا از شرکت مرک یا سیگما خریداری شد. از دستگاه های اسپکتروفتومتری Shimadzu دو شعاعی مدل ۱۸۰۰ ساخت کشور ژاپن برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، ظرفیت آنتی اکسیدانی پلاسما و میزان محصولات پراکسیداسیون لیپیدها (TBARS) جهت قرائت جذب ها در طول موج های مربوطه استفاده شد. حیوانات به طور تصادفی به ۵ گروه (در هر گروه ۵ سر) تقسیم شدند. (I) گروه کنترل نرمال (II) گروه تیمار تحت تزریق با استامینوفن (III) گروه تیمار تحت تزریق با کورکومین و بعد از ۳۰ دقیقه از تزریق استامینوفن (IV) گروه تحت تزریق فقط با کورکومین (V) گروه vehicle تحت تزریق با DMSO.

بعد از طی دوره زمانی ۲۴ ساعته از تزریق حیوانات با بیهوشی ملایم به کمک اتر از ورید اجوف تحتانی خون گیری با سرنگ هپارینه انجام و به لوله آزمایش انتقال یافت. نمونه ها در  $3500$  دور به مدت ۱۰ دقیقه در  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفیوژ شد و پلاسما آن جدا و به فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$  انتقال داده شد. کلیه ها بلافاصله پس از جراحی حیوان با محلول نرمال سالین  $0/9$  درصد سرد و یخی موجود در پتريدش شستشو داده شد. بعد از قطعه قطعه کردن روی کاغذ صافی قرار داده تا خشک شود، سپس در میکروتیوب Label شده خالی قرار گرفته، بعد از توزین مجدد در زمان آزمایش مربوطه با استفاده از افتراق این دو عدد، وزن خالص بافت را برای هموزن کردن به دست می آوریم.

### سنجش محصولات پراکسید/سیون لیپیدها

$0/4 \text{ Ml}$  بافت هموزن شده به نسبت  $1:4$  بافر فسفات  $0/1$  مولار با  $\text{pH} = 7$  را برداشته، به آن  $0/2 \text{ ml}$  سدیم دو سیل سولفات  $8/1$  درصد،  $1/5 \text{ ml}$  اسید استیک  $20$  درصد ( $\text{PH} = 3.5$ )،  $1/5 \text{ ml}$  تیوباربتوریک اسید  $0/8$  درصد اضافه کرده، در نهایت این مخلوط را با  $1 \text{ ml}$  آب مقطر رقیق کرده، به مدت یک ساعت در دمای  $95^{\circ}\text{C}$  در بن ماری گذاشته، سپس جذب لایه رویی را بعد از سانتریفیوژ در طول موج  $532 \text{ nm}$  می خوانیم. مقدار TBARS با استفاده از ضریب خاموشی مولی مالون دی آلدهید  $1.56 \times 10^5 \text{ mmol/cm}$  به دست آمد.

### فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بر اساس روش Mccord & Fridovich سنجش شد (۲۳). ابتدا برای اندازه گیری فعالیت، مقدار کافی آنزیم زانتین اکسیداز (بدون حضور هموزنیت حاوی آنزیم SOD) در داخل کووت حاوی Reaction mixture، شامل زانتین ( $0/005 \text{ mM}$  Xanthine) فری سیتوکروم سی ( $0/01 \text{ mM}$  Ferricytochrome c) ریخته فعالیت آنزیم به مدت ۲ دقیقه در طول موج  $550 \text{ nm}$  و

محلول استاندارد بر حسب  $\mu\text{M/l}$  به دست می آید.

#### اندازه گیری میزان پروتئین

سنجش پروتئین در هموژنیت بافتی با استفاده از معرف برادفورد و سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد انجام شد (۲۶). اساس روش برادفورد اتصال کواماسی بریلینت بلو G250 به گروه آمین پروتونه در ریشه اسید آمینه زنجیره پلی پپتیدی و تغییر جذب نوری از ۴۶۵ به ۵۹۵ نانومتر می باشد. بعد از تهیه محلول های پروتئینی با غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر با استفاده از BSA و افزایش ۲/۵ ml معرف برادفورد ۰/۰۱ درصد در اتانول ۵ درصد و اسید فسفریک ۱۰ درصد در لوله های آزمایشی حاوی ۱۰۰  $\mu\text{l}$  BSA و مخلوط نمودن آن ها، جذب بعد از ۲۰ دقیقه در ۵۹۵ nm قرائت شد. به کمک منحنی استاندارد ترسیم شد، و مقایسه جذب هموژنیت های بافتی، غلظت پروتئین ها در آن ها محاسبه گردید. مقادیر اوره و کراتینین پلاسمایی توسط کیت تشخیصی شرکت زیست شیمی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج متغیرهای کمی به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SD}$  آمد بعد از تست نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov (KS) test و یکنواخت بودن واریانس به کمک Levene test، با توجه به تعداد نمونه ها جهت مقایسه گروه های آزمایشی با گروه های کنترل و مقایسه میانگین ها مربوط به تأثیر کورکومین از آزمون های Student's t-test و ناپارامتری Mann-Whitney U-test، به شکل مناسب استفاده شد و برای بررسی ارتباط ضریب همبستگی اسپیرمن را به کار بردیم. تمام تست ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد ( $p < 0.05$ ).

#### یافته ها

در این مطالعه اثر حفاظتی کورکومین بر شدت آسیب کلیوی ایجاد شده حاصل از مواجهه با استامینوفن از طریق ارزیابی مقادیر اوره و کراتینین به عنوان

محدوده جذب ۰ تا ۰/۱ بعد از تنظیم اندازه گیری شده تا مقدار آنزیم زانتین اکسیداز لازم برای ایجاد  $\Delta\text{OD}=25 \text{ mAbs/min}$  به دست آید (محلول زانتین اکسیداز باید به مقدار کافی استفاده شود تا آنیون سوپر اکسید تولید شده از زانتین قدرت احیاء (III) cyt c را تا حد  $\Delta\text{OD}$  بالا دارا باشد). یک واحد آنزیم SOD، مقدار آنزیمی است که  $\Delta\text{OD}$  محلول زانتین اکسیداز را ۵۰ درصد کاهش دهد. پس از محاسبه واحد موجود در هر نمونه بر اساس تعریف با تقسیم آن بر مقدار پروتئین موجود در  $50 \mu\text{l}$  هموژنیت فعالیت مخصوص SOD بر حسب  $\text{U/mgr pro}$  محاسبه گردید.

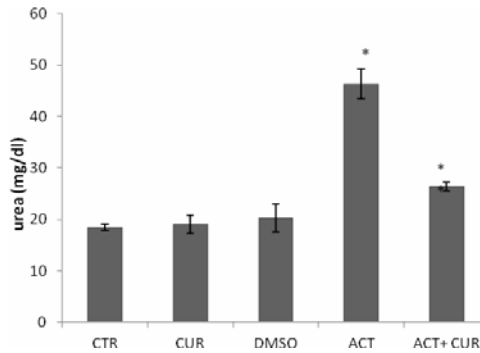
#### فعالیت آنزیم کاتالاز

در هموژنیت به دست آمده تخریب  $\text{H}_2\text{O}_2$  و کاهش جذب به مدت ۱۵ ثانیه در ۲۴۰ nm توسط آنزیم کاتالاز در مخلوطی شامل بافر فسفات ۵۰ mM با  $\text{pH}=7$  و پراکسید هیدروژن 10 mM را می توان به طور مستقیم طبق متد (۱۹۸۴) Abei اندازه گیری نمود (۲۴). در این تحقیق از نسبت ثابت سرعت به مقدار وزن بافتی (K/gr tissue) به عنوان فعالیت مخصوص آنزیم کاتالاز استفاده شده است.

$$\begin{aligned} K &= (2.3/\Delta t) (\text{Log} A_1/A_2) \\ &= (2.3/15) (\text{Log} A_1/A_2) \\ &= 0.153 (\text{Log} A_1/A_2) \end{aligned}$$

#### اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی پلاسما

ظرفیت آنتی اکسیدانی پلاسما به روش FRAP با استفاده از معرف TPTZ سنجش گردید (۲۵). این روش توانایی آنتی اکسیدان های موجود در پلاسما برای احیاء کمپلکس (ferric-tripiridyltriazine)  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ به یون فرو ( $\text{Fe}^{2+}$ ) و جذب نور در طول موج ۵۹۳ nm را ارزیابی می کند. در این واکنش  $\text{Fe}^{3+}$  با اتصال به معرف TPTZ و سپس در حضور فاکتورهای آنتی اکسیدانی پلاسما به  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ تبدیل می شود. میزان FRAP از طریق ترسیم منحنی استاندارد جذب در مقابل غلظت یون فرو

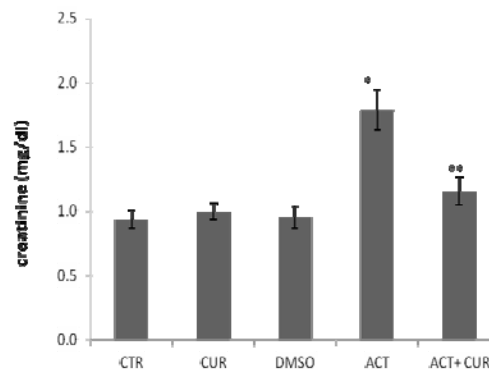


نمودار شماره ۱: غلظت اوره پلاسمایی در گروه‌های مختلف آزمایشی

\* مقایسه با گروه کنترل و DMSO با  $p < 0.0001$

\*\* مقایسه با گروه استامینوفن و  $p < 0.0001$

ACT= کورکومین، CTR= استامینوفن

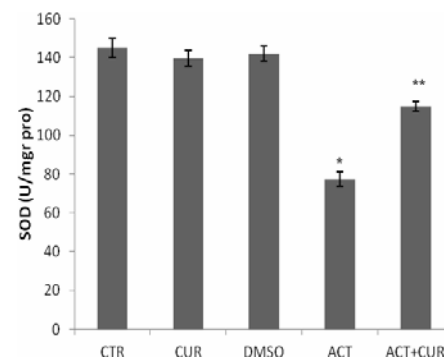


نمودار شماره ۲: غلظت کراتینین پلاسمایی در گروه‌های مختلف آزمایشی

\* مقایسه با گروه کنترل و DMSO با  $p < 0.0001$

\*\* مقایسه با گروه استامینوفن و  $p < 0.0001$

ACT= کورکومین، CTR= استامینوفن



نمودار شماره ۳: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بافت کلیوی

در گروه‌های مختلف آزمایشی

\* مقایسه با گروه کنترل و DMSO با  $p < 0.0001$

\*\* مقایسه با گروه استامینوفن و  $p < 0.0001$

ACT= کورکومین، CTR= استامینوفن

فاکتورهای نشان‌دهنده عملکرد کلیوی و برخی از مارکرهای استرس اکسیداتیو انجام شد.

#### اثر کورکومین بر اوره و کراتینین پلاسمایی

تزریق درون صفاقی حاد استامینوفن منجر به بالا رفتن اوره و کراتینین پلاسمایی در مقایسه با گروه کنترل می‌شود ( $p < 0.0001$ ) که با تزریق کورکومین بعد از ۳۰ دقیقه از تزریق استامینوفن و نمونه‌برداری بعد از ۲۴ ساعت به علت اثرات حفاظتی آنتی‌اکسیدانی این ترکیب میزان اوره (۴۳ درصد) و کراتینین پلاسمایی (۳۵ درصد) کاهش یافته است ( $p < 0.0001$ ). (نمودارهای شماره ۱ و ۲).

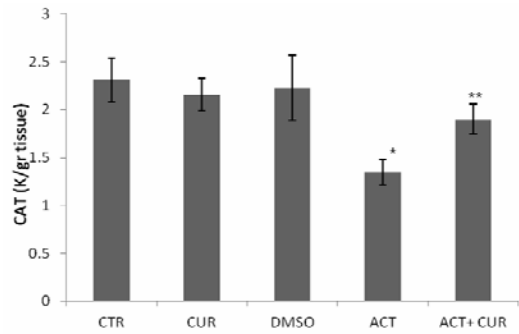
#### اثر کورکومین بر تغییرات فعالیت آنزیم‌های

#### آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدها در بافت کلیوی

نمودارهای شماره ۳ و ۴ نشان می‌دهد که تزریق استامینوفن باعث کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در بافت کلیوی در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد ( $p < 0.0001$ ) و استفاده از کورکومین می‌تواند میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (۴۹ درصد) و آنزیم کاتالاز را تا (۴۱ درصد) در بافت کلیوی احیاء نماید. نتایج حاصل از سنجش میزان FRAP پلاسمایی نشان داد که استفاده از کورکومین باعث افزایش میزان این فاکتور از  $25/94 \pm 333/05$  در گروه تحت مواجهه با استامینوفن (گروه III)، به  $703/25 \pm 27/26$  در گروه تیمار تحت تزریق با کورکومین و بعد از ۳۰ دقیقه از تزریق استامینوفن (IV) می‌شود ( $p < 0.0001$ ) (نمودار شماره ۵). شدت پراکسیداسیون لیپیدها به هنگام مواجهه حیوان با استامینوفن بعد از ۲۴ ساعت در بافت کلیوی در مقایسه با گروه کنترل به شکل معنی‌داری افزایش می‌یابد ( $p < 0.0009$ ) و تجویز کورکومین بعد از ۳۰ دقیقه از تزریق استامینوفن می‌تواند شدت پراکسیداسیون لیپید سنجش شده بعد از ۲۴ ساعت (نمودار شماره ۶) را در بافت کلیوی تا میزان (۴۳ درصد) کاهش دهد ( $p < 0.0008$ ).

## بحث

مسمومیت حاصل از مصرف حاد استامینوفن یکی از شناخته شده ترین دلایل ایجاد آسیب کبدی و کلیوی می باشد و متابولیک های سمی تولید شده در کبد و سایر ارگان ها به عنوان مکانیسم اصلی این سمیت شناخته می شود (۳). همان طور که در یافته ها اشاره شد به منظور بررسی چگونگی اثرات حفاظتی کورکومین بر نفروتوکسیسیته حاصل از تجویز حاد استامینوفن به سنجش اوره و کراتینین به عنوان مارکرهای عملکردی کلیوی پرداختیم. نمودارهای شماره ۱ و ۲ نشان دهنده افزایش معنی دار این دو مارکر در حیوانات آزمایشی بعد از تجویز حاد استامینوفن می باشد که این موضوع نشان دهنده اختلال عملکرد کلیوی و بهبود این وضعیت بعد از تزریق کورکومین در بیماری های کلیوی تجمع اوره ناشی از کاهش پاک سازی نسبت به تولید آن در پلاسما اتفاق می افتد در حالی که افزایش کراتینین پلاسمایی در زمان آسیب به نفرون ها ایجاد می شود (۲۷). در مطالعات انجام یافته توسط Trumper و همکاران (۱۹۹۸) و Prescott و همکاران (۱۹۸۹) مشخص شده که استفاده از استامینوفن در دوزهای درمانی باعث کاهش جریان خون کلیوی، سرعت فیلتراسیون گلومرولی، ترشح سدیم و پروستاگلاندین E2 در انسان و رت می گردد (۲۸، ۲۹) در حالی که تجویز حاد استامینوفن (۱۵-۱۰ گرم) و ایجاد سمیت حاد با نکرور و آسیب لوله های پروکسیمال همراه است (۱۲). کورکومین به دلیل دارا بودن خواص آنتی اکسیدانی از طریق جمع آوری، خنثی سازی رادیکال های آزاد و از دسترس خارج نمودن آنها برای واکنش های اکسیداتیو، مهار آنزیم های اکسیداتیو مانند سیتوکروم p-450، تعامل با آبشارهای اکسیداتیو و ممانعت از به نتیجه رسیدن این واکنش ها، شلاته کردن یون های فلزی مانند آهن و ممانعت از بروز خواص اکسیداتیو آنها عمل می کند (۳۰، ۳۱). گزارشاتی مبنی بر مهار تولید آنیون سوپر اکسید و رادیکال هیدروکسیل توسط کورکومین از طریق اکسیداسیون

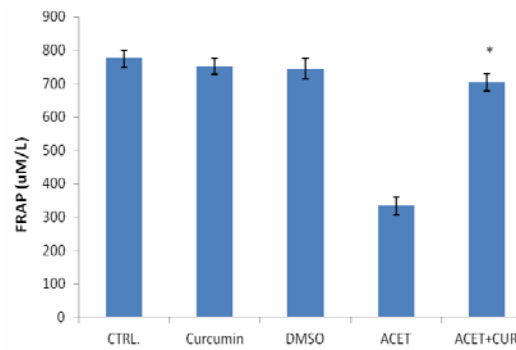


نمودار شماره ۴: فعالیت آنزیم کاتالاز بافت کلیوی در گروه های مختلف آزمایشی

\* مقایسه با گروه کنترل و DMSO با  $p < 0.0001$

\*\* مقایسه با گروه استامینوفن و  $p < 0.0001$

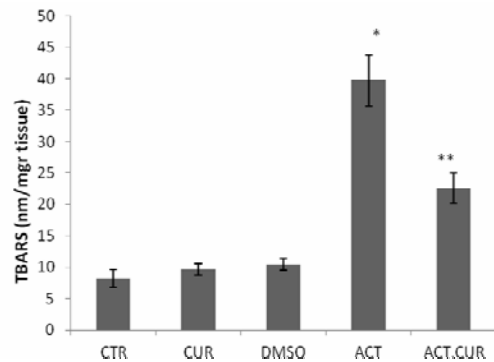
استامینوفن = CTR، کورکومین = CUR



نمودار شماره ۵: میزان FRAP پلاسمایی در گروه های مختلف آزمایشی

\* تفاوت بین گروه استامینوفن + کورکومین با گروه استامینوفن

معنی دار است ( $p < 0.0001$ )



نمودار شماره ۶: میزان TBARS بافت کلیوی در گروه های مختلف

آزمایشی

\* مقایسه با گروه کنترل و DMSO با  $p < 0.0009$

\*\* مقایسه با گروه استامینوفن و  $p < 0.0008$

استامینوفن = CTR، کورکومین = CUR

$Fe^{2+}$  در واکنش فتون وجود دارد (۳۲). به نظر می‌رسد خواص آنتی‌اکسیدانتهی کورکومین توسط ناحیه بتا-دی کتونی آن و تشکیل رادیکال‌های نسبتاً پایدار به دلیل ساختاری بندهای دوگانه مزدوج آن انجام می‌شود (۳۳). نقش رادیکال‌های هیدروکسیل در شروع و پیشرفت نفروتوکسیسیتهی اثبات شده است (۳۴) از آن جایی که  $H_2O_2$  و آنیون سوپراکسید در فعال‌سازی متابولیک استامینوفن توسط سیستم Cyt P-450 (۳۵) یا سم زدایی میتوکندریایی حاصل و این وقایع باعث کاهش گلوتاتیون و متعاقباً آسیب سلولی و افزایش محصولات این واکنش‌گرها با ماکرومولکول‌های سلولی مانند DNA، پروتئین‌ها و به ویژه لیپیدها می‌گردد (۳۶). همان‌گونه که در بخش یافته‌های مطالعه نشان داده شد (نمودار شماره ۵)، TBARS در مواجهه حاد رت با استامینوفن در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار و به هنگام استفاده از کورکومین به میزان قابل توجهی کاهش یافت. افزایش میزان TBARS به عنوان یک اندیکاتور پراکسیداسیون لیپیدها، نشان دهنده شدت آسیب بافتی ناشی از تجویز حاد استامینوفن می‌باشد. گزارشات متعددی مبنی بر افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، پراکسیدهای لیپیدی همراه با کاهش گلوتاتیون احیاء شده، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتهی از قبیل سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و نقش فرایند استرس اکسیداتیو و نیتروزیاتسو و اهمیت ترکیبات پراکسی‌نتریت حاصل از یون سوپر اکسید و اختلال عملکرد کلیوی در زمان مصرف ترکیباتی از قبیل سدیم فلوراید (۳۷)، Vancomycin و استامینوفن تعدیل این عوارض در زمان مصرف آنتی‌اکسیدانتهی‌هایی مانند کورکومین، N-استیل سیستین (۳۸)، quercetin (۳۹)، *Indicus Cajanus* (۴۰) وجود دارد. و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که مصرف استامینوفن در رت، فعالیت آنزیم SOD که وظیفه جمع‌آوری یون سوپراکسید و تبدیل آن به پراکسید هیدروژن را به عهده دارد، کاهش می‌یابد و همزمان فعالیت آنزیم کاتالاز که در حذف

پراکسید هیدروژن شرکت می‌نماید نیز با کاهش همراه می‌شود (۴۱). نتایج حاصل از مطالعات Yousef و همکاران (۲۰۱۰) و Ahmida (۲۰۱۲) نیز مشابه نتایج ما تأکیدی بر ایجاد استرس اکسیداتیو و کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در زمان تجویز استامینوفن به شکل حاد دارد (۴۲، ۳۹). (نمودارهای شماره ۳ و ۴). اما نتایج مطالعه خرد پژوه و همکاران (۱۳۸۹) نشان داد که علی‌رغم افزایش میزان مالون دی‌آلدئید به عنوان مارکر پراکسیداسیون لیپیدی در هموزنیت بافت کلیوی، فعالیت کاتالاز با افزایش و آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز کاهش نشان می‌دهد و با استفاده از آنتی‌اکسیدانتهی کورکومین فعالیت کاتالاز کاهش و فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز افزایش می‌یابد (۳۸). از آن جایی که عوامل مولد یا مقابله‌کننده در ایجاد استرس اکسیداتیو با یکدیگر در حال تعامل هستند سنجش جداگانه آن‌ها در بعضی موارد نتایج متناقضی را به دست می‌دهد که توجیه این تفاوت‌ها در الگوی تغییرات با مشکل همراه می‌شود. از این رو می‌توان با سنجش کل آنتی‌اکسیدانتهی در پلاسما به کمک روش‌هایی مانند FRAP وضعیت کلی این شرایط را مشاهده و بررسی نمود. نتایج FRAP حاصله در این مطالعه نشان‌دهنده تغییرات کلی مثبت و تقویت برابری عوامل سیستم آنتی‌اکسیدانتهی مؤثر پلاسمایی از قبیل عواملی مانند توتال پروتئین، بیلی روبین، اسید اوریک و ... بوده که می‌توان با بررسی آن‌ها در مطالعات آینده اطلاعات ارزشمندی راجع به مکانیسم مقابله با این سمیت به دست آورد. از سوی دیگر این نتایج متناقض در بررسی‌های انجام یافته، نشان دهنده پیچیدگی مسیرهای متابولیسمی ایجاد سمیت از نظر نحوه، زمان و دوز تجویز دارو و آنتی‌اکسیدانتهی به کار گرفته از نظر درصد خلوص و نوع حلال، نوع مدل حیوانی است و لذا پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی دیگر در جهت دستیابی به شناخت هر چه بهتر این موارد صورت پذیرد.

از سوی دیگر کورکومین علاوه بر خاصیت



## سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد بیوشیمی خانم سعیده احمدی می باشد. از تمام کسانی که ما را در انجام این پروژه یاری کردند کمال تقدیر و تشکر را داریم.

آنتی اکسیدانی دارای خواص ضد التهابی می باشد، لذا به نظر می رسد که این ماده می تواند تأثیر بهتری نسبت به سایر آنتی اکسیدان ها در برابر استامینوفن داشته باشد که البته این موضوع به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

## References

1. Zhao C, Sheryl D, Zhou YX. Effects of combined use of diallyl disulfide and Nacetyl-cysteine on acetaminophen hepatotoxicity in beta-naphthoflavone pretreated mice. *World J Gastroenterol* 1998; 4(2): 112-116.
2. Proudfoot AT, Wright N. Acute paracetamol poisoning. *Br Med J* 1970; 3(5722): 557-558.
3. Gu J, Cui H, Behr M, Zhang L, Zhang QY, Yang W, et al. In vivo mechanisms of tissue-selective drug toxicity: effects of liver-specific knockout of the NADPH-cytochrome P-450 reductase gene on acetaminophen toxicity in kidney, lung, and nasal mucosa. *Mol Pharmacol* 2005; 67(3): 623-630.
4. Zaher H, Buters JT, Ward JM, Bruno MK, Lucas AM, Stern ST, et al. Protection against acetaminophen toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 double-null mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 152(1): 193-199.
5. Matthews AM, Roberts DW, Hinson JA, Pumford NR, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. Analysis of total covalent binding vs. specific binding to cysteine. *Drug Metab Dispos* 1996; 24(11): 1192-1196.
6. Blakely P, McDonald BR. Acute renal failure due to acetaminophen ingestion: a case report and review of the literature. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6(1): 48-53.
7. Kapiotis S, Sengoelge G, Hermann M, Held I, Seelos C, Gmeiner BM. Paracetamol catalyzes myeloperoxidase-initiated lipid oxidation in LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(11): 2855-2860.
8. Bessems JG, Vermeulen NP. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit Rev Toxicol* 2001; 31(1): 55-138.
9. Khandkar MA, Parmar DV, Das M, Katyare SS. Is activation of lysosomal enzymes responsible for paracetamol-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity? *J Pharm Pharmacol* 1996; 48(4): 437-440.
10. Lorz C, Justo P, Sanz AB, Egido J, Ortíz A. Role of Bcl-xL in paracetamol-induced tubular epithelial cell death. *Kidney Int* 2005; 67(2): 592-601.
11. Cobden I, Record CO, Ward MK, Kerr DN. Paracetamol-induced acute renal failure in the absence of fulminant liver damage. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982; 284(6308): 21-22.
12. Balantz RC. Acetaminophen: acute and chronic effects on renal function. *Am J Kidney Dis* 1996; 28(1 Suppl 1): S3-S6.
13. Li C, Liu J, Saavedra JE, Keefer LK, Waalkes MP. The nitric oxide donor, V-PYRRO/NO, protects against acetaminophen-induced nephrotoxicity in mice. *Toxicology* 2003; 189(3): 173-180.
14. Eguia L, Materson BJ. Acetaminophen-related acute renal failure without fulminant liver failure. *Pharmacotherapy* 1997; 17(2):

- 363-370.
15. Abraham P. Vitamin C may be beneficial in the prevention of paracetamol-induced renal damage. *Clini Exp Nephrol* 2005; 9(1): 24-30.
  16. Sener G, Satiroglu H, Kabasakal L, Arbak S, Oner S, Ercan F, et al. The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. *Fundam Clin Pharmacol* 2000; 14(6): 553-560.
  17. Sener G, Sehirlil AO, Ayanoglu-Dulger G. Protective effects of melatonin, vitamin E and N-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study. *J pineal Res* 2003; 35(1): 61-68.
  18. Corson TW, Crews CM. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials. *Cell* 2007; 130(5): 769-774.
  19. Reddy AC, Lokesh BR. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Mol Cell Biochem* 1994; 137(1): 1-8.
  20. Rao CV, Rivenson A, Simi B, Reddy BS. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Res* 1995; 55(2): 259-266.
  21. Chandra D, Gupta SS. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of volatile oil of *Curcuma longa* (Haldi). *Indian J Med Res* 1972; 60(1): 138-142.
  22. Kempaiah RK, Srinivasan K. Influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on the antioxidant status of red blood cells and the liver in high-fat-fed rats. *Ann Nutr Metab* 2004; 48(5): 314-320.
  23. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244(22): 6049-6055.
  24. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
  25. 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.
  26. 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: 248-254.
  27. Mayne PD. The kidneys: renal calculi. In: *Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment*. 6<sup>th</sup> ed. London: Edward Arnold Publication 1994. p. 2-24.
  28. Trumper L, Monasterolo LA, Elias MM. Probenecid protects against in vivo acetaminophen-induced nephrotoxicity in male Wistar rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284(2): 606-610.
  29. Prescott LF, Speirs GC, Critchley JA, Temple RM, Winney RJ. Paracetamol disposition and metabolite kinetics in patients with chronic renal failure. *Eur J Clin Pharmacol* 1989; 36(3): 291-297.
  30. Sreejayan, Rao MN. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46(12): 1013-1016.
  31. Unnikrishnan MK, Rao MN. Inhibition of nitrite induced oxidation of hemoglobin by curcuminoids. *Pharmazie* 1995; 50(7): 490-492.
  32. Reddy AC, Lokesh BR. Effect of dietary turmeric (*Curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. *Food Chem Toxicol* 1994; 32(3): 279-283.
  33. Sumanont Y, Murakami Y, Tohda M, Vajragupta O, Matsumoto K, Watanabe H. Evaluation of the Nitric Oxide Radical Scavenging Activity of Manganese Complexes

- of Curcumin and Its Derivative. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(2): 170-173.
34. Singh P, Srivastava MM, Khemani LD. Renoprotective effects of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees in rats. *Ups J Med Sci* 2009; 114(3): 136-139.
35. Dai Y, Cederbaum AI. Cytotoxicity of acetaminophen in human cytochrome P4502E1-transfected HepG2 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 273(3): 1497-1505.
36. Knight TR, Kurtz A, Bajt ML, Hinson JA, Jaeschke H. Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen toxicity: Role of mitochondrial oxidant stress. *Toxicol Sci* 2001; 62(2): 212-220.
37. Nabavi SF, Moghaddam AH, Eslami S, Nabavi SM. Protective Effects of Curcumin against Sodium Fluoride-Induced Toxicity in Rat Kidneys. *Biol Trace Elem Res* 2011; 145(3): 369-374.
38. Kheradpezhoh E, Panjehshahin MR, Miri R, Javidnia K, Noorafshan A, Monabati A, et al. Curcumin protects rats against acetaminophen-induced hepatorenal damages and shows synergistic activity with N-acetyl cysteine. *Eur J Pharmacol* 2010; 628(1-3): 274-281.
39. Yousef MI, Omar SA, El-Guendi MI, Abdelmegid LA. Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(11): 3246-3261.
40. Ghosh A, Sil PC. Anti-oxidative effect of a protein from *Cajanus indicus* L against acetaminophen-induced hepato-nephro toxicity. *J Biochem Mol Biol* 2007; 40(6): 1039-1049.
41. Cekmen M, Ilbey YO, Ozbek E, Simsek A, Somay A, Ersoz C. Curcumin prevents oxidative renal damage induced by acetaminophen in rats. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(7): 1480-1484.
42. Ahmida MH. Protective role of curcumin in nephrotoxic oxidative damage induced by vancomycin in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2012; 64(3): 149-153.