

Investigating the Effects of Ellagic Acid on Thioacetamide-Induced Acute Liver Damage and Subsequent Encephalopathy in Rats

Afarin Joudaki nezhad¹,
Hamidreza Mohammadi²,
Mohsen Mohammadi³,
Farhad Momeni⁴,
Ahmad Adineh²

¹ Pharmacy Student, Student Research Committee, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

² Assistant Professor, Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Razi Herbal Medicine Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

³ Associate Professor, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

⁴ Pharmacist, Food and Drug Administration of Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

(Received February 26, 2023 ; Accepted September 3, 2023)

Abstract

Background and purpose: Ellagic acid is a natural polyphenol compound with potential antioxidant properties that is present in most fruits, seeds, and vegetables. Therefore, this study was designed to investigate the effects of ellagic acid administration on the liver damage model caused by thioacetamide in rats.

Materials and methods: In this experimental study, 60 male Wistar rats weighing approximately 200 grams were randomly divided into six groups (n=10). Liver damage was caused by a single dose (100 mg/kg) administration of thioacetamide for three consecutive days. Different doses of ellagic acid (10, 25 and 50 mg/kg) were administered to the sick mice as a single dose for three consecutive days. Finally, 24 hours after the last injection, biochemical factors (ALP, AST, ALT, LDH, bilirubin, total protein), oxidative stress markers (LPO, ROS, FRAP, GSH), ammonium ion concentration, and movement activity of the mice were examined. One-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were used for statistical analysis.

Results: Thioacetamide led to a significant increase in serum biochemical factors and oxidative stress markers in the studied groups (P<0.05). In addition, the amount of ammonium ion in the plasma, as a key effective factor in hepatic encephalopathy, was greatly increased in animals receiving thioacetamide (P<0.05). Administration of ellagic acid in different doses significantly reduced liver damage and plasma ammonium concentration (P<0.05).

Conclusion: The results of this study showed that ellagic acid reduced liver damage caused by thioacetamide through its antioxidant activities.

Keywords: thioacetamide, liver damage, plasma ammonium, ellagic acid, oxidative stress

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (226): 157-163 (Persian).

Corresponding Author: Hamidreza Mohammadi - Faculty of Pharmacy, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran. (E-mail: hamidrezamohammadi65@yahoo.com)

بررسی اثرات الازیک اسید بر آسیب حاد کبدی ناشی از تیواستامید و انسفالوپاتی متعاقب آن در موش‌های صحرایی

آفرین جودکی نژاد¹حمیدرضا محمدی²محسن محمدی³فرهاد مومنی⁴احمد آدینه²

چکیده

سابقه و هدف: الازیک اسید یک ترکیب پلی فنولی طبیعی با خاصیت آنتی اکسیدان بالقوه است که در بیش تر میوه‌ها، دانه‌ها و سبزیجات وجود دارد. در این مطالعه اثرات تجویز الازیک اسید در مدل آسیب کبدی ناشی از تیواستامید در موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: برای انجام این مطالعه تجربی تعداد 60 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی 200 گرم، به طور تصادفی به 6 گروه 10 تایی تقسیم شدند. آسیب کبدی با تجویز 100 mg/kg تیواستامید در سه روز متوالی به صورت تک دوز ایجاد شد. سپس دوزهای مختلف الازیک اسید (10، 25 و 50 میلی گرم بر کیلوگرم) به مدت سه روز متوالی به صورت تک دوز به موش‌های بیمار تجویز شد. در نهایت 24 ساعت پس از آخرین تزریق، فاکتورهای بیوشیمیایی (ALP)، LDH، AST، ALT، بیلی روبین و پروتئین تام)، مارکرهاسترس اکسیداتیو (GSH،FRAP، ROS،LPO)، غلظت یون آمونیم و فعالیت حرکتی موش‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد.

یافته‌ها: تیواستامید منجر به آسیب کبدی شد که خود را به صورت افزایش معنی دار فاکتورهای بیوشیمیایی سرم و مارکرهاسترس اکسیداتیو نشان داد ($P<0/05$). علاوه بر این میزان یون آمونیم در پلاسما، به عنوان فاکتور کلیدی مؤثر در انسفالوپاتی کبدی، در حیوانات دریافت کننده تیواستامید به میزان بسیار زیادی افزایش داشت ($P<0/05$). تجویز الازیک اسید در دوزهای مختلف به طور چشمگیری آسیب‌های کبدی و غلظت آمونیم پلاسما را کاهش داد ($P<0/05$).

استنتاج: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که الازیک اسید از طریق فعالیت‌های آنتی اکسیدانی موجب کاهش آسیب کبدی ناشی از تیواستامید می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تیواستامید، آسیب کبدی، آمونیم پلاسما، الازیک اسید، استرس اکسیداتیو

مقدمه

کبد، بزرگ‌ترین ارگان داخلی بدن می‌باشد که متابولیسم مواد و سم‌زدایی از بدن یکی از مهم‌ترین وظایف آن می‌باشد (1). تیواستامید از سمومی می‌باشد که موجب آسیب سلول‌های کبد می‌شود. مسمومیت مزمن

E-mail: hami.drezamohammadi65@yahoo.com

مؤلف مسئول: حمیدرضا محمدی - خرم آباد: دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده داروسازی

1. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

2. استادیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

3. دانشیار، گروه فارماکولوژی و بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

4. داروساز عمومی، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

تاریخ دریافت: 1401/12/7 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1402/4/1 تاریخ تصویب: 1402/6/12

با تیواستامید باعث تخریب سلول‌های کبدی می‌شود. هم‌چنین طبق نتایج حاصل از مطالعات آزمایشگاهی در این زمینه تیواستامید باعث مسمومیت سیتو توکسیک در مراحل اولیه تماس شده و در صورت استفاده و تماس مستمر با آن موجب کلستاز کبدی می‌شود (1,2). پلی‌فنول‌ها که جزو ترکیبات موجود در گیاهان می‌باشند، در طیف گسترده‌ای از مواد غذایی گیاهی مانند میوه‌ها، سبزیجات، غلات، حبوبات و نوشیدنی‌ها یافت می‌شوند. عملکرد اصلی اسید فنولیک در گیاهان تولید رنگدانه، رشد، تولید مثل و مقاومت به بیماری‌هاست (3). الازیک اسید یک ترکیب پلی‌فنولی و یک آنتی‌اکسیدان گیاهی طبیعی و بالقوه است که در بیش‌تر میوه‌ها، دانه‌ها و سبزیجات شامل؛ چای سبز و دیگر منابع طبیعی از جمله انار، توت فرنگی، شاتوت، تمشک سیاه، گردو، انبه و پوست اکالیپتوس وجود دارد (4). فعالیت‌های بیولوژیک و خواص مفید متنوعی برای الازیک اسید در نظر گرفته شده است. شناخته شده‌ترین آن‌ها اثرات مستقیم آنتی‌اکسیدانی، ضد آلرژی، ضد التهابی، خواص ضد سرطانی، ضد میکروبی و ضد ویروسی، قدرت بالا در جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد، تنظیم چرخه سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و نیز القا سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بر روی مدل‌های حیوانی می‌باشد و مورد تایید است (5). با توجه به مجموعه فوق‌الذکر و با در نظر گرفتن خواص مستند آنتی‌اکسیدانی الازیک اسید فرض بر این است که الازیک اسید می‌تواند کبد را در برابر اثرات سمی اکسیداتیو داروی تیواستامید محافظت کند. بنابراین، مطالعه حاضر برای اولین بار برای ارزیابی اثرات محافظتی الازیک اسید بر سمیت کبدی تیواستامید در موش صحرایی طراحی و اجرا گردید.

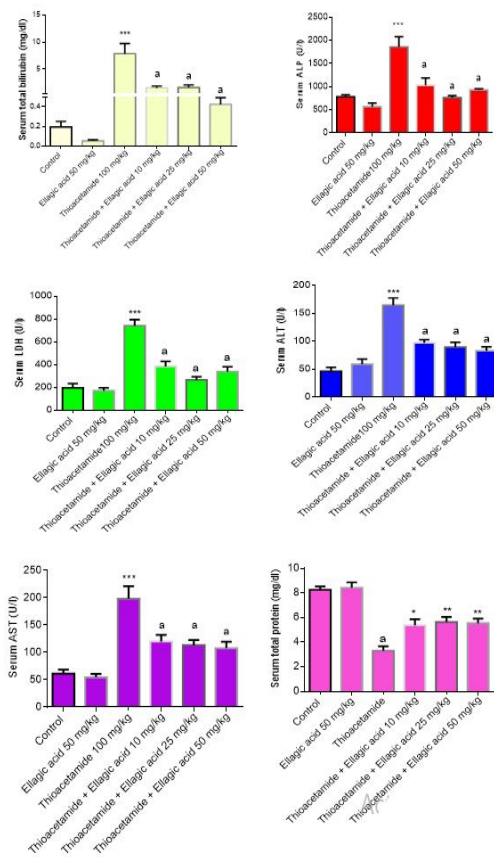
مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر، توسط کمیته نظارت بر حقوق حیوانات دانشگاه علوم پزشکی لرستان با کد اخلاق IR.LUMS.REC.1401.039 مورد تأیید قرار گرفت.

برای انجام این مطالعه تجربی، تعداد 60 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی 20 ± 200 گرم، به‌طور تصادفی به 6 گروه 10 تایی به شرح زیر تقسیم شدند. 1- گروه شاهد (فقط دریافت نرمال سالین)، 2- گروه دریافت کننده تیواستامید (100 mg/kg/day) در سه روز متوالی به صورت تک دوز، 3- گروه تیواستامید + الازیک اسید (10 mg/kg/day) در سه روز متوالی به صورت تک دوز، 4- گروه تیواستامید + الازیک اسید (25 mg/kg/day) در سه روز متوالی به صورت تک دوز، 5- گروه تیواستامید + الازیک اسید (50 mg/kg/day) در سه روز متوالی به صورت تک دوز، 6- گروه کنترل مثبت (50 mg/kg/day) به‌عنوان بالاترین دوز الازیک اسید برای 3 روز متوالی به صورت تک دوز. شرایط تغذیه و نگهداری برای تمام گروه‌ها یکسان و جیره غذایی و آب به‌طور آزاد در دسترس حیوان قرار گرفت. در پایان دوره آزمایش و 24 ساعت پس از آخرین تزریق، جهت اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی شامل: آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینو ترانسفراز (AST)، بیلی‌روبین تام و لاکتات دهیدروژناز (LDH) نمونه خون ناشتا از حیوان گرفته شد. برای تعیین وضعیت آنتی‌اکسیدانی کبد، همه موش‌ها پس از بیهوشی، با ایجاد در رفتگی در مهره گردن به راحتی کشته شدند. کبد موش‌ها سریعاً خارج و در نرمال سالین بسیار سرد شستشو داده شد. سپس هموژنات 10 درصد در 1/15 درصد (w/v) کلرید پتاسیم تهیه گردید. هموژنات در 7000 دور در دقیقه و به مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. براساس پروتکل‌های استاندارد از محلول رویی جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپید (LPO)، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی (FRAP) و میزان گلوتاتیون (GSH) استفاده گردید (6-8). اندازه‌گیری آمونیاک خون و مغز نیز براساس پروتکل‌های قبلی انجام گرفت (9,10).

یافته‌ها و بحث

کم‌تر بود. در گروه‌هایی که الازیک اسید را دریافت کرده بودند فعالیت حرکتی حیوانات بهبود یافت (نمودار شماره 2). یافته‌های به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که الازیک اسید خواص بالقوای درمان آسیب کبدی ناشی از تیواستامید دارد. خواص حفاظتی مشاهده شده از الازیک اسید در این مطالعه می‌تواند از طریق مکانیسم‌های گوناگونی شامل سرکوب تشکیل گونه‌های اکسیژن واکنشگر به وسیله مهار آنزیم‌های دخیل در تولید آن‌ها، حذف گونه‌های اکسیژن واکنشگر و تنظیم و محافظت کردن از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی باشد (15).



نمودار شماره 1: نتایج حاصل از بررسی بیومارکرهای بیوشیمیایی در پژوهش حاضر می‌باشد. داده‌ها به‌عنوان Mean±SEM برای 10 حیوان در هر گروه نمایش داده شده است. ***: نشان دهنده افزایش معنادار در مقایسه با گروه کنترل (Vehicle-treated) است ($P<0/05$). a: بیانگر کاهش معنادار در مقایسه با گروهی است که تنها تیواستامید را دریافت کرده‌اند ($P<0/05$).

آسیب کبدی ایجاد شده توسط تیواستامید به‌طور معمول به‌عنوان یک مدل مناسب برای مطالعه اثرات ضد سمیت کبدی و حفاظت‌کننده کبدی داروها و ترکیبات مختلف استفاده می‌شود (11,12). نتایج بررسی حاضر نشان داد که در موش‌های دریافت‌کننده تیواستامید، سطوح آمونیاک سرمی، بیومارکرهای بیوشیمیایی (ALT، AST، ALP و LDH) و استرس اکسیداتیو (ROS، LPO)، در مقایسه با گروه شاهد، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/05$). در حالی که درمان با الازیک اسید افزایش سطوح بیومارکرهای بیوشیمیایی و استرس اکسیداتیو ناشی از تیواستامید را به‌طور معنی‌دار کاهش داد ($P<0/05$)، (نمودار شماره 1-3 و جدول شماره 1). مشاهده شد که سطح GSH و میزان FRAP کبد در گروه در معرض تیواستامید به شدت کاهش یافت. استفاده از الازیک اسید باعث جلوگیری از تخلیه GSH در گروه‌های مختلف مورد مطالعه شد (نمودار شماره 3 و جدول شماره 1). در مطالعه حاضر افزایش میزان فعالیت آمینوترانسفرازها و بیلی روبین بر اثر تیمار با تیواستامید مشخص‌کننده آسیب سلول‌های کبدی توسط تیواستامید می‌باشد، که با مطالعه kaur و همکارانش همخوانی دارد (13). تیواستامید تحت متابولیسم سیستم سیتوکروم P450 موجب تولید ترکیب تیواستامید-S-اکسید (TSO) می‌شود، که به‌واسطه اتصال به ماکرومولکول‌های بافتی می‌تواند نکروز کبدی، افزایش آمونیاک خون و استرس اکسیداتیو ایجاد کند (14). از این رو موادی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌توانند از موارد درمانی بالقوه برای جلوگیری از آسیب کبدی در مدل تیواستامید باشند.

در مطالعه حاضر، تجویز الازیک اسید در دوزهای مختلف به‌طور چشمگیری آسیب کبدی و غلظت آمونیاک پلاسما را کاهش داد. هم‌چنین در مطالعه حاضر، تعداد حرکات (Total locomotion) حیوانات تحت تیمار با داروی تیواستامید نسبت به گروه کنترل

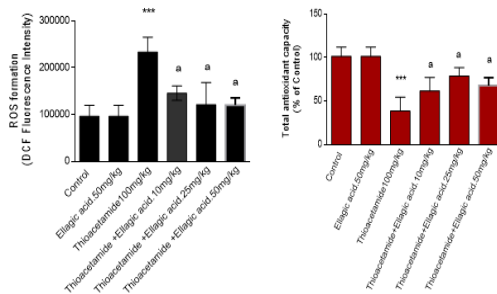
جدول شماره 1: بررسی میزان لیپید پراکسیداسیون و سطح گلو تاتیون بافت کبد در گروه‌های مختلف مورد مطالعه و بررسی تاثیر تجویز الاژیک اسید بر آن.

سطح گلو تاتیون ($\mu\text{mol/mg wet tissue}$)	لیپید پروکسیداسیون ($\text{nmol/mg wet tissue}$)	گروه های مورد مطالعه
$7045 \pm 7/19$	$106 \pm 0/03$	کنترل
$7839 \pm 4/12$	$109 \pm 0/18$	الاژیک اسید (50 mg/kg)
$16/12 \pm 5/18$	$*9/13 \pm 1/21$	تیواستامید
$\#31/53 \pm 5/18$	$\#4/19 \pm 0/01$	تیواستامید+الاژیک اسید (10 mg/kg)
$\#43/24 \pm 5/11$	$\#4/91 \pm 0/11$	تیواستامید+الاژیک اسید (25 mg/kg)
$\#47/32 \pm 6/33$	$\#3/98 \pm 0/96$	تیواستامید+الاژیک اسید (50 mg/kg)

- داده‌ها به عنوان Mean \pm SEM برای ده حیوان در هر گروه نمایش داده شده است.

*: نشان دهنده‌ی افزایش معنادار در مقایسه با گروه کنترل (Vehicle-treated) است ($P<0/05$).

#: بیانگر کاهش معنا دار در مقایسه با گروهی است که تنها تیواستامید را دریافت کرده‌اند ($P<0/05$).



نمودار شماره 3: نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در پژوهش حاضر می‌باشد. داده‌ها به عنوان Mean \pm SEM برای 10 حیوان در هر گروه نمایش داده شده است.

***: نشان دهنده افزایش معنادار در مقایسه با گروه کنترل (Vehicle-treated) است ($P<0/05$).

a: بیانگر کاهش معنادار در مقایسه با گروهی است که تنها تیواستامید را دریافت کرده‌اند ($P<0/05$).

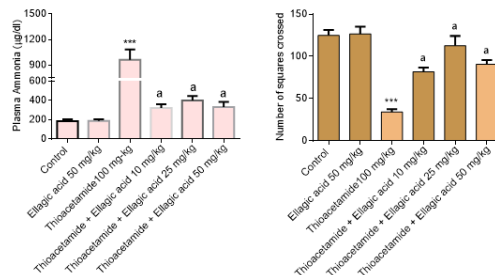
سپاسگزاری

این مطالعه با مساعدت مدیریت آموزش و پژوهش دانشگاه علوم پزشکی لرستان انجام شد، لذا از ایشان کمال قدردانی و تشکر می‌شود.

ترکیبات پلی فنلی و به‌ویژه فلاونوئیدها در مرحله نخست بر روی سیستم سیتوکروم P450 اثر مهاری داشته و از متابولیسم بیش تر تیواستامید جلوگیری می‌کنند و در نتیجه تولید رادیکال‌های آزاد کاهش می‌یابد. این ترکیبات هم‌چنین بواسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی قادر هستند رادیکال‌های آزاد موجود در محیط را خنثی کرده و از اثرات مخرب آن‌ها جلوگیری به عمل آورند (16).

ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدها هم‌چنین می‌توانند سلول را در برابر تخلیه GSH، با افزایش ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (گلو تاتیون احیاء، گلو تاتیون ردوکتاز، گلو تاتیون پراکسید و کاتالاز) محافظت نمایند (17).

در مجموع، نتایج به‌دست آمده نقش محافظتی الاژیک اسید بر سمیت کبدی تیواستامید را تصدیق می‌کند. بنابراین می‌توان بعد از انجام کارآزمایی‌های بالینی تصادفی، الاژیک اسید را در انسان‌هایی که داروی تیواستامید را مصرف می‌کنند، جهت پیشگیری از آسیب‌های جبران ناپذیر کبد مورد استفاده قرار داد. اما شناخت دقیق ماده با مواد موثر اصلی این ترکیب، تعیین دقیق مکان و مکانیسم یا مکانیسم‌های مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن در این مورد نیاز به مطالعات آتی دارد.



نمودار شماره 2: نتایج حاصل از بررسی آمونیاک و فعالیت حرکتی موش‌ها در پژوهش حاضر می‌باشد. داده‌ها به عنوان Mean \pm SEM برای 10 حیوان در هر گروه نمایش داده شده است.

***: نشان دهنده افزایش معنادار در مقایسه با گروه کنترل (Vehicle-treated) است ($P<0/05$).

a: بیانگر کاهش معنادار در مقایسه با گروهی است که تنها تیواستامید را دریافت کرده‌اند ($P<0/05$).

References

1. Zamani N, Naghsh N, Fathpoor H. Investigation effect of hydroalcoholic extraction of campher on activity of liver enzyme and tissue liver of syrian male mice poisoned with thioacetamid. *J Mazandaran Uni Med Sci* 2012; 21(1): 116-123 (Persian).
2. Wang T, Shankar K, Ronis MJ, Mehendale HM. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294(2): 473-479.
3. Abbas M, Saeed F, Anjum FM, Afzaal M, Tufail T, Bashir MS, et al. Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties* 2017; 20(8): 1689-1699.
4. BenSaad LA, Kim KH, Quah CC, Kim WR, Shahimi M. Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complement Altern Med* 2017; 17(1): 47.
5. Mohammadinejad A, Mohajeri T, Aleyaghoob G, Heidarian F, Kazemi Oskuee R. Ellagic acid as a potent anticancer drug: A comprehensive review on in vitro, in vivo, in silico, and drug delivery studies. *Biotechnol Appl Biochem* 2022; 69(6): 2323-2356.
6. Ommati MM, Mohammadi H, Mousavi K, Azarpira N, Farshad O, Dehghani R, et al. Metformin alleviates cholestasis-associated nephropathy through regulating oxidative stress and mitochondrial function. *Liver Research* 2021; 5(3): 171-180.
7. Ghaffarian-Bahraman A, Shahroozian I, Jafari A, Ghazi-Khansari M. Protective effect of magnesium and selenium on cadmium toxicity in the isolated perfused rat liver system. *Acta Medica Iranica* 2014; 52(12): 872-878.
8. Omid M, Ghafarian-Bahraman A, Mohammadi-Bardbori A. GSH/GSSG redox couple plays central role in aryl hydrocarbon receptor-dependent modulation of cytochrome P450 1A1. *J Biochem Mol Toxicol* 2018; 32(7): e22164.
9. Mohammadi H, Sayad A, Mohammadi M, Niknahad H, Heidari R. N-acetyl cysteine treatment preserves mitochondrial indices of functionality in the brain of hyperammonemic mice. *Clin Exp Hepatol* 2020; 6(2): 106-115.
10. Mohammadi H, Heidari R, Niknezhad SV, Jamshidzadeh A, Farjadian F. In vitro and in vivo evaluation of succinic acid-substituted mesoporous silica for ammonia adsorption: potential application in the management of hepatic encephalopathy. *Int J Nanomedicine* 2020; 15: 10085-10098.
11. Ahmad A, Pillai K, Najmi AK, Ahmad SJ, Pal S, Balani D. Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. *J Ethnopharmacol* 2002; 79(1): 35-41.
12. Mohammadi H, Heidari R, Niknezhad SV, Jamshidzadeh A, Farjadian F. In vitro and in vivo evaluation of succinic acid-substituted mesoporous silica for ammonia adsorption: potential application in the management of hepatic encephalopathy. *Int J Nanomedicine* 2020; 15: 10085-10098.
13. Kaur S, Sharma D, Singh AP, Kaur S. Amelioration of hepatic function, oxidative stress, and histopathologic damages by *Cassia fistula* L. fraction in thioacetamide-induced liver toxicity. *Environ Sci Pollut Res Int* 2019; 26(29): 29930-29945.
14. Ezhilarasan D. Molecular mechanisms in thioacetamide-induced acute and chronic liver injury models. *Environ Toxicol Pharmacol* 2023; 99: 104093.

15. Landete J. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International* 2011; 44(5): 1150-1160.
16. Sun F, Hayami S, Ogiri Y, Haruna S, Tanaka K, Yamada Y, et al. Evaluation of oxidative stress based on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apoptosis and necrosis caused by thioacetamide in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2000; 1500(2): 181-185.
17. du Toit R, Volsteedt Y, Apostolides Z. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology* 2001; 166(1-2): 63-69.