

بررسی اثرات کورکومین بر روی نارسایی کبدی القا شده با اتانول در موش‌های صحرایی نر

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۶/۱۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: مصرف الکل می‌تواند موجب هپاتیت و در دراز مدت باعث سیروز کبد شود. کورکومین دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات حفاظتی کورکومین در جلوگیری و درمان آسیب‌های کبدی ناشی از استفاده بیش از حد اتانول است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۳۰ سر موش‌های صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار به ۶ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل روزانه فقط آب و مواد غذایی معمولی دریافت کردند. گروه شش روزانه فقط روغن زیتون با دوز ۲ cc دریافت کردند. گروه تجربی ۱ روزانه فقط کورکومین دوز ۱۰۰ mg/kg دریافت کردند. گروه تجربی ۲ روزانه ۲ cc اتانول ۳۰٪ دریافت کردند. گروه تجربی ۳ روزانه ۲ cc اتانول ۳۰٪ و ۵۰ mg/kg کورکومین دریافت کردند. گروه تجربی ۴ روزانه ۲ cc اتانول ۳۰٪ و کورکومین ۱۰۰ mg/kg دریافت کردند. حیوانات در مدت ۲۸ روز، روزانه آب، اتانول، کورکومین و مواد غذایی را به صورت دهانی دریافت کردند. در پایان دوره آزمایش خونگیری از قلب حیوانات به عمل آمد. سطح فعالیت آنزیم‌های سرمی AST، ALT، ALP، GGT و آرژیناز و همچنین سطح سرمی آلبومین، پروتئین تام و نیتروژن اوره خون اندازه‌گیری شد. بافت کبد حیوانات در گروه‌های مختلف برداشته شد. جهت بررسی بافت کبد از روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین استفاده شد.

یافته‌ها: تیمار با اتانول سطح فعالیت آنزیم‌های سرمی ALT، AST، ALP، GGT، آرژیناز یک و نیتروژن اوره خون را بصورت معناداری نسبت به گروه کنترل، شش و تجربی ۱ افزایش داد ($p < 0.05$) در حالیکه سطح آلبومین و پروتئین تام را کاهش داد ($p < 0.05$). علاوه بر این، تیمار با اتانول موجب تجمع قطرات چربی، پرخونی، نکروز، آپوپتوزیس و اتوزینوفیلی شدن سیتوپلاسم در هپاتوسیت‌ها گردید. با این حال تجویز همزمان اتانول و کورکومین سطح ALT، AST، ALP، GGT، آرژیناز یک و نیتروژن اوره خون را بصورت معناداری نسبت به گروه اتانول کاهش داد ($p < 0.05$). در حالیکه سطح آلبومین و پروتئین تام را افزایش داد ($p < 0.05$). از لحاظ هیستوپاتولوژیک نیز کاهش در تغییرات ساختاری بافت کبد و آپوپتوزیس و در نتیجه بهبود بافت کبدی مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: تجویز کورکومین با دوز بالا آسیب‌های کبدی ناشی از مصرف اتانول را در موش‌های صحرایی کاهش می‌دهد و سطح سرمی پارامترهای کبدی و خونی را بهبود می‌دهد.

کلمات کلیدی: کورکومین، اتانول، کبد، موش صحرایی

اعظم لطافت فراشبدی^۱، مهرداد شریعتی^{۲*}، مختار مختاری^۳، آمنه خوشوقتی^۴

^۱دانشجوی دکتری فیزیولوژی جانوری، گروه زیست، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

^۲دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

^۳استاد، گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

^۴دانشیار، گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

۰۹۱۷۳۱۳۳۲۲۱

E-mail: mehrdadshariati@hotmail.com

مقدمه

نارسایی حاد کبد در اثر عوامل متعددی از جمله هپاتیت های ویروسی، آسیب های توکسیک ناشی از سموم و داروها و همچنین ایسکمی ایجاد می شود.^۱ کبد به عنوان سد دفاعی بدن، به صورت مداوم در معرض انواع مختلف سموم داخلی و خارجی با غلظت بالا قرار دارد. در آسیب های توکسیک کبد، استرس اکسیداتیو نقشی اساسی بر عهده دارد.^۲ با توجه به اینکه در بیشتر کشورهای جهان الکل بعنوان یک نوشیدنی مصرف می گردد با این حال می تواند موجب آسیب به کبد شود به گونه ای که مصرف بیش از حد آن هم سلامت جسمی و هم سلامت ذهنی را مورد آسیب قرار می دهد.^۳ کبد محل اصلی متابولیسم اتانول است و هم چنین ارگان اصلی مورد هدف برای آسیب های ناشی از مصرف اتانول می باشد.^۴ مصرف بیش از حد اتانول می تواند آغازگر پیشرفت بیماری کبد الکلی باشد که طیف گسترده ای از فیروز تا سیروز کبدی را شامل می گردد. استرس اکسیداتیو نقش اصلی را در پاتوژنز حاصل از آسیب کبد الکلی، ایفا می نماید. مصرف اتانول موجب افزایش گونه های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش سطح گلوکاتایون و سوپراکساید دیسموتاز (SOD) و در نتیجه کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی در بافتهای هدف می گردد.^۵ مطالعات اخیر نشان داده اند که درمان آنتی اکسیدانی از آسیب کبد در اثر مصرف اتانول پیشگیری می نماید بنابراین، انتظار می رود حفظ ظرفیت آنتی اکسیدانی، موجب کاهش آسیب به کبد در اثر مصرف اتانول گردد.^۶

مطالعات بالینی و حیوانی نشان داده اند که سیتوکین های التهابی مانند $TNF-\alpha$ و $IL-6$ واسطه های اصلی آسیب به کبد در اثر مصرف اتانول هستند. همچنین براساس یافته های محققان، مسیر کاتپسین B، میانجی آپوپتوزیس از طریق $TNF-\alpha$ در هپاتوسیت ها است.^۷ همچنین گزارش شده است که کاهش مقادیر $TNF-\alpha$ و $IL-6$ از طریق مهار استرس اکسیداتیو می تواند التهاب کبد ناشی از مصرف اتانول را کاهش دهد.^۸ با توجه به اینکه استفاده از داروهای گیاهی در سال های اخیر رو به افزایش است بنابراین تلاش برای بازنگری و احیای داروهای قدیمی امری منطقی است و شناخت مکانیسم فعالیت آنها می تواند منجر به شکل گیری و پذیرش درمان های جدید برای بسیاری از بیماری ها شود.^۹ زردچوبه (*Curcuma longa*)

گیاهی از خانواده زنجبیل با کاربرد گسترده است. زردچوبه از طیف وسیعی از مواد شیمیایی گیاهی تشکیل شده است که از جمله آنها می توان از کورکومین، دی متوکسی کورکومین، بیس دی متوکسی کورکومین، کورکومونول، کورکومول تترا هیدرو کورکومین، تورمرین، تورمرونز و تورمرونول نام برد.^۹ مهم ترین مواد تشکیل دهنده زردچوبه، کورکومینوئیدها هستند که رنگ زرد زردچوبه را نیز ایجاد می کنند.^{۱۰} عصاره آبی زردچوبه فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی دارد و همچنین موجب التیام زخم قرینه و تنظیم فعالیت سیتوکروم P450 (CYP) می گردد. عصاره آب گرم زرد چوبه با مهار نمودن $TNF-\alpha$ ، از طریق جلوگیری از ارسال سیگنال NF-kB، ویژگی چسبندگی سلولهای آندوتلیال را تنظیم می نماید.^{۱۱} کورکومین، دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و هم فعالیت های ضد التهابی می باشد.^{۱۲} کورکومین فعالیت ضد التهابی و ضد میکروبی اعمال می نماید و ثابت شده است که مصرف روزانه کورکومین ممکن است برای کبد در برابر استرس اکسیداتیو مرتبط با مصرف الکل اثر محافظتی داشته باشد.^{۱۳،۱۴}

فعالیت محافظت کنندگی زردچوبه روی بافت ها در مقابل اشعه رادیواکتیو نیز ثابت شده است.^{۱۵} زردچوبه موجود در رژیم غذایی از طریق تشدید فعالیت آنزیم های ضد اکسیدانی میزان پراکسیداسیون لیپید را کاهش می دهد. اثرات محافظتی و ضد اکسیدانی زردچوبه و کورکومین بیش از ویتامین E، A گزارش شده است.^{۱۶}

مطالعات مشخص کردند که کورکومین و زردچوبه از کبد در مقابل سموم مختلفی از قبیل تتراکلریدکربن، آفلاتوکسین B، استامینوفن و سیکلوفسفامید در موش صحرایی و اردک محافظت می کند.^{۱۷} زردچوبه اثر مهاری در تولید سم قارچ آفلاتوکسین دارد که سم حاصل به شدت روی کبد اثرات نامطلوب ایجاد می کند.^{۱۸} داروهایی نظیر گلیسریریزین و سایلیبین که به عنوان داروهای محافظت کننده کبدی کاربرد بالینی دارند نیز در مسمومیت سلولی حاصل از تتراکلرید کربن در سلول های کشت داده شده موش صحرایی در همان دوز مطلوب و موثر کورکومینوئیدها قادر به عمل می باشند.^{۱۹} تجویز دهانی کورکومین به موش صحرایی سبب بازگشت پراکسیداسیون لیپیدهای مغز می شود. کورکومین نقش اصلی را در محافظت از بافت مغز و آسیب مغزی حاصل از اتانول ایفا می نماید.^{۲۰} همچنین تجویز خوراکی کورکومین، با اثرات

بازدارندگی در بروز آب مروارید همراه بوده است.^{۲۱} کورکومین عامل ضد التهابی موثر است که سطح هیستامین را کاهش می‌دهد.^{۲۲} کورکومین و مقایسه آن با عملکرد فنیل بوتازون در مبتلایان آرتریت روماتوئید و روماتیسم استخوانی با نتایج رضایت بخشی توام بوده است. به نحوی که هیچ گونه اثرات جانبی کورکومین در این تحقیق مشاهده نگردید، لیکن عملکرد زردچوبه و ماده موثر آن یعنی کورکومین ضعیف تر از فنیل بوتازون گزارش شده است.^{۲۳} نتایج پاره‌ای تحقیقات، اثر ضد التهابی کورکومین را معادل فنیل بوتازون گزارش نموده اند.^{۲۴}

از آنجا که کورکومین دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است، این مطالعه با هدف بررسی تاثیر کورکومین بر آسیب‌های کبدی ناشی از مصرف اتانول در موش‌های صحرایی طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این مطالعه ۳۰ موش صحرایی بالغ نر از نژاد ویستار با میانگین وزنی 29.0 ± 1.0 گرم و سن ۹ هفته از خانه حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی کازرون تهیه و نگهداری شد. قبل از انجام آزمایش و بمنظور سازگاری با شرایط جدید، حیوانات به مدت ۷ روز در کنار یکدیگر نگهداری شدند و با رژیم غذایی پایه تغذیه گردیدند. حیوانات در محیط کنترل شده با درجه حرارت $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ، رطوبت نسبی $55 \pm 5\%$ و سیکل ۱۲ ساعت تاریکی ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. در طول این مطالعه، حیوانات دسترسی کافی به غذا و آب براساس رژیم غذایی پایه بر مبنای رژیم غذایی موسسه (AIN)-93G آمریکایی را داشتند. براساس دستورالعمل‌های کار با حیوانات آزمایشگاهی، پروتکل این مطالعه تنظیم و به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه آزاد واحد کازرون قرار گرفت (شماره کد اخلاقی: IR.IAU.KAU.REC.1399.097).

آماده سازی کورکومین

گیاه زردچوبه در دمای هفتاد درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد و سپس با استفاده از آسیاب پودر شد. پودر

حاصل با مش‌های سایز ۴۰-۸۰ الک شد تا پودر با توزیع ذرات یکنواخت به اندازه ۰.۱۸-۰.۲۴ میلی متر به دست آید. پودر به دست آمده به منظور جلوگیری از جذب رطوبت در یخچال نگه داری گردید. سپس، یک گرم پودر زردچوبه خشک با ۳۰ گرم از مایع یونی کریماتی (شرکت ادونیس گل دارو، ایران) مخلوط شد و در شیکر انکوباتور در دمای ۴۵-۱۵ درجه سانتیگراد به مدت ۸-۱ ساعت همزده شد. پس از آن، مخلوط در مکانی ساکن شده و مایع رویی با استفاده از سیستم میلی پور فیلتر گردید. مایع فیلتر شده با استفاده از دستگاه تبخیر روتاری تحت خلا در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تقطیر و مایع یونی کریماتی بازیافت گردید. عصاره زردچوبه به دست آمده از فرایند استخراج با روش ستون کروماتوگرافی مایع خالص سازی شد تا کورکومین با خلوص بالا به دست آید.

آماده سازی اتانول ۳۰٪

با استفاده از پیت پاستور ۳۰ ml اتانول ۹۹٪ (شرکت صنایع اتانول غدیر، ایران) با ۷۰ ml آب مقطر مخلوط گردید تا محلول ۳۰٪ اتانول بدست آید.

پروتکل مطالعه

۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار به ۶ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه‌ها به شرح زیر تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل روزانه فقط آب و مواد غذایی معمولی دریافت کردند.

۲- گروه شم روزانه فقط روغن زیتون با دوز ۲ cc دریافت کردند.

۳- گروه تجربی ۱ روزانه فقط کورکومین دوز 100 mg/kg دریافت کردند.^{۲۵}

۴- گروه تجربی ۲ روزانه ۲ cc اتانول ۳۰٪ دریافت کردند.^{۲۶}

۵- گروه تجربی ۳ روزانه ۲ cc اتانول ۳۰٪ و 50 mg/kg کورکومین دریافت کردند.^{۲۵}

۶- گروه تجربی ۴ روزانه ۲ cc اتانول ۳۰٪ و کورکومین 100 mg/kg دریافت کردند.^{۲۵} انتخاب دوزهای کورکومین و اتانول با استفاده از مطالعات قبلی صورت گرفت.

تحلیل آماری

با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۰ ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون Kolmogorov-smirnov مورد تایید قرار گرفت و سپس با آزمون واریانس یک طرفه و تست تعقیبی LSD تجزیه و تحلیل داده‌ها در سطح $P < 0.05$ بررسی شدند. با استفاده از نرم افزار Graphpad prism ورژن ۶ نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار در نمودارها بیان شدند.

نتایج

یافته های بیوشیمیایی

شکل ۱ نتایج حاصل از تجویز کورکومین و اتانول بر سطح سرمی ALT، AST، ALP، GGT، آرژیناز، Alb، TP و BUN را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. سطح سرمی ALT در گروه Ethanol30 افزایش معناداری را در مقایسه با گروه کنترل، شم، CUR100، Ethanol30+CUR50 و Ethanol30+CUR100 نشان داد ($P < 0.05$). اختلاف معناداری در سطح ALT بین گروه‌های CUR100 و کنترل مشاهده نشد ($P > 0.05$) اما گروه‌های Ethanol30+CUR50 و Ethanol30+CUR100 در مقایسه با گروه کنترل، شم و CUR100 افزایش معنادار داشتند ($P < 0.05$). سطح سرمی AST در گروه Ethanol30 افزایش معناداری را در مقایسه با گروه کنترل، CUR100، شم، Ethanol30+CUR50 و Ethanol30+CUR100 نشان داد ($P < 0.05$). گروه‌های CUR100، شم و Ethanol30+CUR100 در سطح سرمی AST اختلاف معناداری با گروه کنترل نداشتند ($P > 0.05$) اما گروه Ethanol30+CUR100 نسبت به گروه Ethanol30 کاهش معنادار داشت ($P < 0.05$). سطح سرمی ALP در گروه Ethanol30 افزایش معناداری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($P < 0.05$) در حالیکه بقیه گروه‌ها اختلاف معناداری با گروه کنترل نداشتند ($P > 0.05$). سطوح سرمی GGT و آرژیناز در گروه Ethanol30 افزایش معناداری را در مقایسه با گروه کنترل، CUR100، Ethanol30+CUR50 و Ethanol30+CUR100 نشان دادند ($P < 0.05$). گروه CUR100 و شم در سطوح سرمی GGT و آرژیناز اختلاف معناداری با گروه کنترل نداشتند ($P > 0.05$) اما گروه‌های Ethanol30+CUR50 و Ethanol30+CUR100 کاهش معنادار نسبت به گروه Ethanol30

حیوانات در مدت ۲۸ روز، روزانه آب، اتانول، کورکومین و مواد غذایی را به صورت دهانی دریافت کردند. گروه‌ها اتانول را ساعت ۸ صبح و کورکومین را ساعت ۴ بعد از ظهر دریافت کردند. انتخاب دوزهای دریافتی اتانول و کورکومین با استفاده از مطالعات قبلی صورت گرفت.

در پایان مطالعه، تمامی حیوانات ابتدا با دی اتیل اتر (Merck, Germany) بی‌هوش شدند و سپس خونگیری از قلب بصورت مستقیم و با استفاده از سرنگ ۵ سی سی انجام شد. نمونه‌های خونی به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور (Memmert UNB 400, Germany) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از وقوع اگلوتیناسیون، لوله‌ها در دستگاه سانتریفیوژ (MSE, England) به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند تا سرم جدا گردد. سطح سرمی ALT، AST، ALP، GGT، آرژیناز، Alb، TP و BUN توسط دستگاه اتوآنالیزر مدل RA-1000 (Technicon, USA) با توجه به دستور العمل شرکت سازنده (شرکت پارس آزمون، ایران) اندازه گیری شدند. سطوح سرمی ALT و AST به روش IFCC بدون افزودن Pyridoxal-50phosphate، سطح سرمی ALP به روش PGKC، سطح سرمی GGT به روش آنزیماتیک طبق روش SZASZ، سطح سرمی آرژیناز براساس روش Urease-GLDH اندازه گیری شدند. همچنین، سطح سرمی Tp به روش فتومتریک بر اساس روش Biuret، سطح سرمی Alb به روش BROMOCRESOL-GREE و سطح سرمی BUN به روش DCA اندازه گیری شدند.

آزمایش های بافت شناسی

پس از خونگیری، با باز نمودن محوطه شکمی، بافت کبد همه حیوانات خارج شد و جهت فیکساسیون در محلول فرمالین بافر ۱۰٪ قرار گرفت. نمونه‌ها در پارافین قالب گیری شدند و به کمک دستگاه میکروتوم برش‌های متوالی جهت مطالعه هیستوپاتولوژیک تهیه شد. در مرحله رنگ آمیزی از رنگ هماتوکسیلین-ائوزین استفاده گردید. تمام مطالعات بافتی زیرنظر پاتولوژیست صورت گرفت.^{۲۷}

بحث

در مطالعه حاضر دریافت اتانول باعث نکروز کبدی افزایش سطح سرمی GGT, ALT, AST, ALP ، آرژیناز و BUN گردید و در مقابل باعث کاهش پروتئین تام و آلبومین شد. افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی مانند AST و ALT در سرم، عمدتاً نشان دهنده افزایش سرعت ورود آنها به سرم از سلول‌های کبدی آسیب دیده است. آنزیم AST در سیتوپلاسم و میتوکندری سلول‌های بافت‌های قلب و کبد و عضلات وجود دارد و در نکروز حاد الکلی سلول‌های کبدی میزان این آنزیم افزایش می‌یابد. در صورتی که این بافت‌ها دچار ضایعه شوند میزان AST افزایش می‌یابد.^{۲۸} آنزیم ALP در بیشتر بافت‌های بدن وجود دارد اما بیشترین غلظت ALP در سلول‌های کوپفر کبد است.^{۲۹} سطح آنزیم ALP در انسدادهای صفراوی ایتراپاتیک و اکستراپاتیک و همچنین سیروزکبدی بسیار افزایش می‌یابد. افزایش این آنزیم می‌تواند نشانگر آسیب مجاری صفراوی و سیروز بافت کبدی باشد. در آسیب‌های ناشی از الکل معمولاً زمانی که سیروز اتفاق می‌افتد میزان ALP افزایش می‌یابد.^{۳۰} آنزیم GGT شاخصی برای مصرف مداوم یا افراط آمیز الکل است آنزیم GGT در توبول‌های پروگزیمال کلیه، کبد، پانکراس و روده‌ها وجود دارد. افزایش فعالیت GGT در سرم بیماران مبتلا به هپاتیت الکلی و افرادی که به میزان زیاد مشروبات الکلی می‌خورند دیده می‌شود که ممکن است حاکی از القای فعالیت آنزیم توسط عمل الکل و اثرات الکل بر روی سلول‌های کبدی باشد حتی زمانی که آنزیم‌های AST، ALT درحالت طبیعی قراردارند این آنزیم بالا می‌باشد، درواقع اولین آنزیمی که درخون بر اثر آسیب الکلی رها می‌شود GGT است.^{۳۱} بخش عمده پروتئین‌های پلاسما در سلول‌های کبدی سنتز می‌شوند. در بیماری‌های مزمن کبد نظیر سیروز کبدی گاهی غلظت پروتئین‌های پلاسما تا مقادیر بسیار کاهش می‌یابد.^{۳۲} پروتئین‌ها نقش تغذیه ای داشته و فشار اسمزی کلئیدی را ایجاد کرده و همچنین به توازن اسید و باز در بدن کمک می‌کنند. سنتز آلبومین یک عملکرد مهم برای کبد است که روزانه تقریباً ۱۰ گرم سنتز و ترشح می‌شود. غلظت‌های پایین آلبومین سرم می‌تواند ناشی از عدم توانایی کبد در سنتز آن باشد که کاهش فشار اتونیک خون رابه دنبال دارد.^{۳۳} میزان BUN در سرم نشان دهنده

داشتند ($P < 0.05$). سطح سرمی Alb در گروه Ethanol30 کاهش معناداری را در مقایسه با گروه‌های کنترل، شم، CUR100، Ethanol30+CUR50 و Ethanol30+CUR100 نشان داد ($P < 0.05$). گروه CUR100 در سطح سرمی Alb اختلاف معناداری با گروه کنترل نداشتند ($P > 0.05$) اما گروه‌های Ethanol30+CUR50 و Ethanol30+CUR100 کاهش معنادار داشتند ($P < 0.05$). سطح سرمی TP در گروه Ethanol30 کاهش معناداری را در مقایسه با گروه‌های کنترل، شم، CUR100، Ethanol30+CUR50 و Ethanol30+CUR100 نشان داد ($P < 0.05$).

گروه CUR100 در سطح سرمی TP اختلاف معناداری با گروه کنترل نداشتند ($P > 0.05$) اما گروه‌های Ethanol30+CUR50 و Ethanol30+CUR100 کاهش معنادار داشتند ($P < 0.05$). سطح سرمی BUN در گروه Ethanol30 افزایش معناداری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($P < 0.05$) در حالیکه بقیه گروه‌ها اختلاف معناداری با گروه کنترل نداشتند ($P > 0.05$).

یافته های هیستوپاتولوژیک

شکل ۲ یافته‌های هیستوپاتولوژیک را در گروه های مختلف نشان می‌دهد. در گروه‌های کنترل، شم و CUR100 شواهدی از آسیب هپاتوسیت‌ها و سیاهرگ مرکزی مشاهده نشد. هپاتوسیت‌ها به‌طور منظم و بدون هیچ آسیبی در کنار هم قرار داشتند و بافت کبد کاملاً طبیعی بود. در گروه Ethanol30 در مقایسه با گروه کنترل تغییرات ساختاری زیادی در بافت کبد مشاهده شد. تجمع قطرات چربی در سلول‌های Ito (نوعی از سلول‌های سینوزوئید)، پرخونی، نکروز، آپوپتوزیس، تحلیل واکوئلر و احتقان در بافت کبد مشاهده شد. همچنین پیکنوزیس، قطعه قطعه شدن (کاریورکسی)، لیز شدن (کاریولیز) هسته سلول‌ها و اتوزینوفیلی شدن سیتوپلاسم مشاهده گردید. در گروه‌های Ethanol30+CUR50 و Ethanol30+CUR100 کاهش چشمگیری در نکروز سلولی و التهاب موضعی هپاتوسیت‌ها نسبت به گروه Ethanol30 مشاهده شد بطوری که در این گروه‌ها میزان آندوتلیوزین و پرخونی هپاتوسیت‌ها تا حد زیادی کاهش یافته بود. در این دو گروه آسیب کبدی خفیف بود.

شاخص‌های آنزیمی و هیستوپاتولوژیکی در مقایسه با گروه دریافت کننده اتانول دیده می‌شود. از نتایج بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیک این مطالعه می‌توان حدس زد که احتمالاً نقش کورکومین جلوگیری از استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط اتانول در بخش‌های مختلف کبد است. در موجودات زنده به منظور مقابله با اثرات تخریبی ناشی از رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو دو سیستم آنتی اکسیدانی وجود دارد که شامل دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی (سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز) و غیر آنزیمی از جمله اسید آسکوربیک، آلفا توکوفرول، بیلی روبین، اسید اوریک، پلی فنول‌ها می‌باشد.^{۳۵} این ترکیبات با جلوگیری از تولید رادیکال‌های آزاد و ترمیم و بازسازی بافت‌های صدمه دیده، آسیب‌های ناشی از فعالیت رادیکال‌های آزاد را به حداقل می‌رسانند.^{۳۶} بنابراین به نظر می‌رسد کورکومین در موش‌های دریافت کننده اتانول با توجه به عملکرد فنولی (کورکومین) و آنتی اکسیدانی موجود در آنها و اثرات مهار تولید و ترشح کلسترول در کبد اثر تخریبی و خاصیت اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی اتانول را مهار می‌کنند و نقش حفاظتی برای سلول‌های کبدی ایفا می‌کنند.

در مطالعه ای که توسط پالیزگیر و همکارانش انجام شد مشخص گردید که کورکومین موجود در زرد چوبه باعث مهار ترشح فاکتور نکروز دهنده تومور-آلفا (TNF ALFA) می‌شود^{۳۷} و همچنین میزان آنزیم‌های ALT, AST, ALP, GGT را تا نزدیک به سطح نرمال کاهش می‌دهد. همچنین در مطالعه ای که توسط قندادی و همکاران انجام شد مشخص گردید که زردچوبه سبب مهار ایترلوکین ۱ که یکی از عوامل نکروز بافتی است از ماکروفاژها می‌گردد.^{۳۸} در این مطالعه نشان داده شد که کورکومین می‌تواند تا حد زیادی اثرات تخریبی اتانول بر روی کبد را مهار نماید. ویژگی‌های آنتی اکسیدانی و محافظت کنندگی کورکومین در برابر انواع گونه‌های رادیکال آزاد و استرس اکسیداتیو در برخی از مطالعات آزمایشگاهی اثبات شده است.

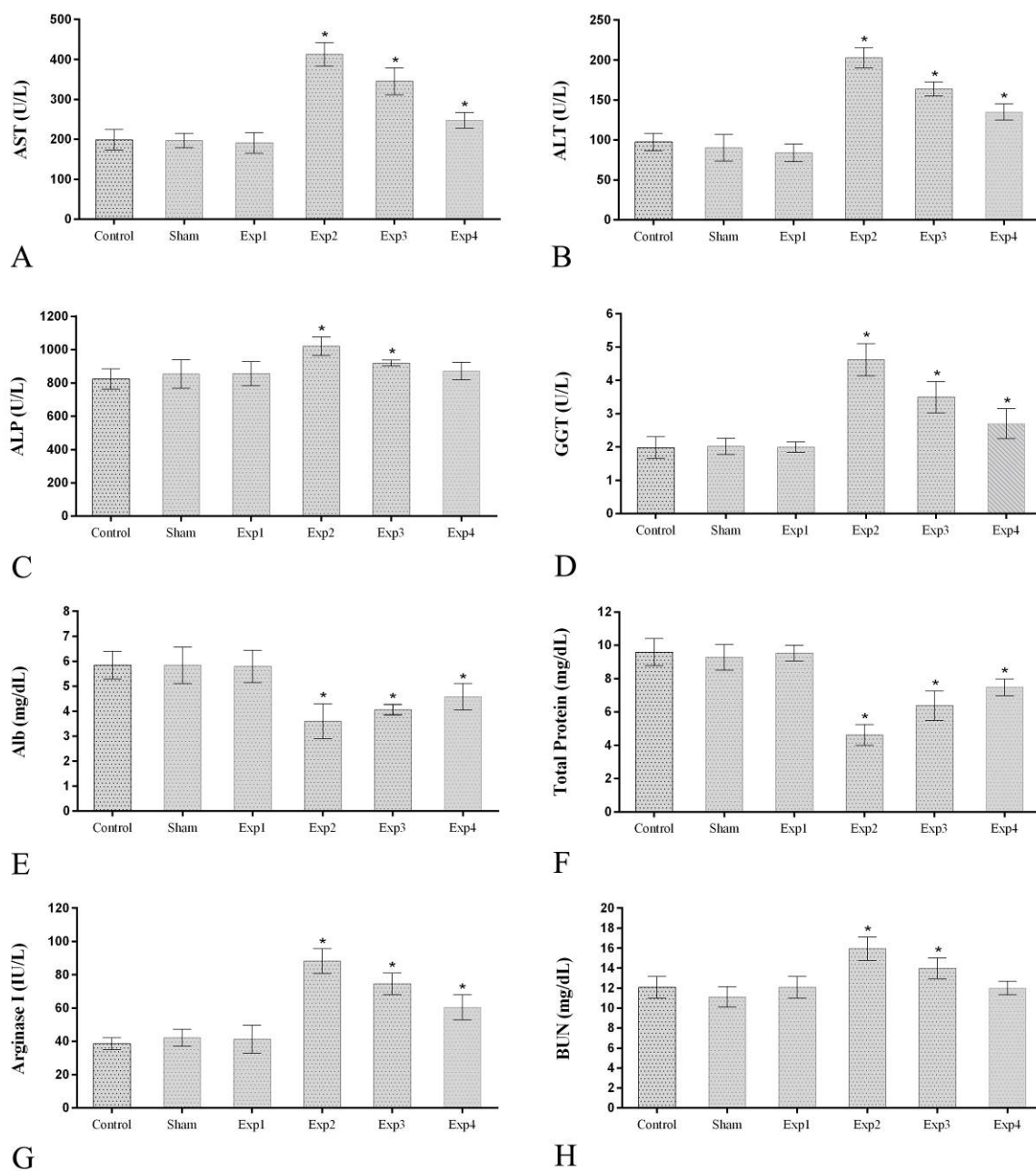
باتوجه به مطالعات فوق و نتایج این تحقیق، در موش‌های تحت درمان با کورکومین با دوز های 50mg/kg, 100mg/kg که مسمومیت شدید الکلی داشته اند کاهش چشمگیر سطح آنزیم‌های سرمی ALT, AST, ALP, GGT و BUN و آرژیناز و نزدیک شدن به حالت نرمال این آنزیم‌ها دیده شد و افزایش چشمگیر سطح سرمی TP و Alb و

سلامت کبد و کلیه است. آمونیاک که حاوی نیتروژن است توسط کبد تولید می‌شود. سپس نیتروژن با مواد دیگر مانند کربن، هیدروژن و اکسیژن ترکیب می‌شود تا اوره تشکیل شود که ماده ای زائد است.^{۳۹} پس از آن اوره از طریق جریان خون از کبد به کلیه‌ها می‌رود. کاتابولیسم سریع پروتئین در کبد و اشکال در عملکرد کلیه‌ها باعث افزایش و بالا رفتن BUN می‌شود. درافزایش تولید اوره، نکروز بافتی، کاتابولیسم پروتئین و افزایش سرعت ترشح نیتروژن اوره توسط کلیه دیده می‌شود.^{۴۰}

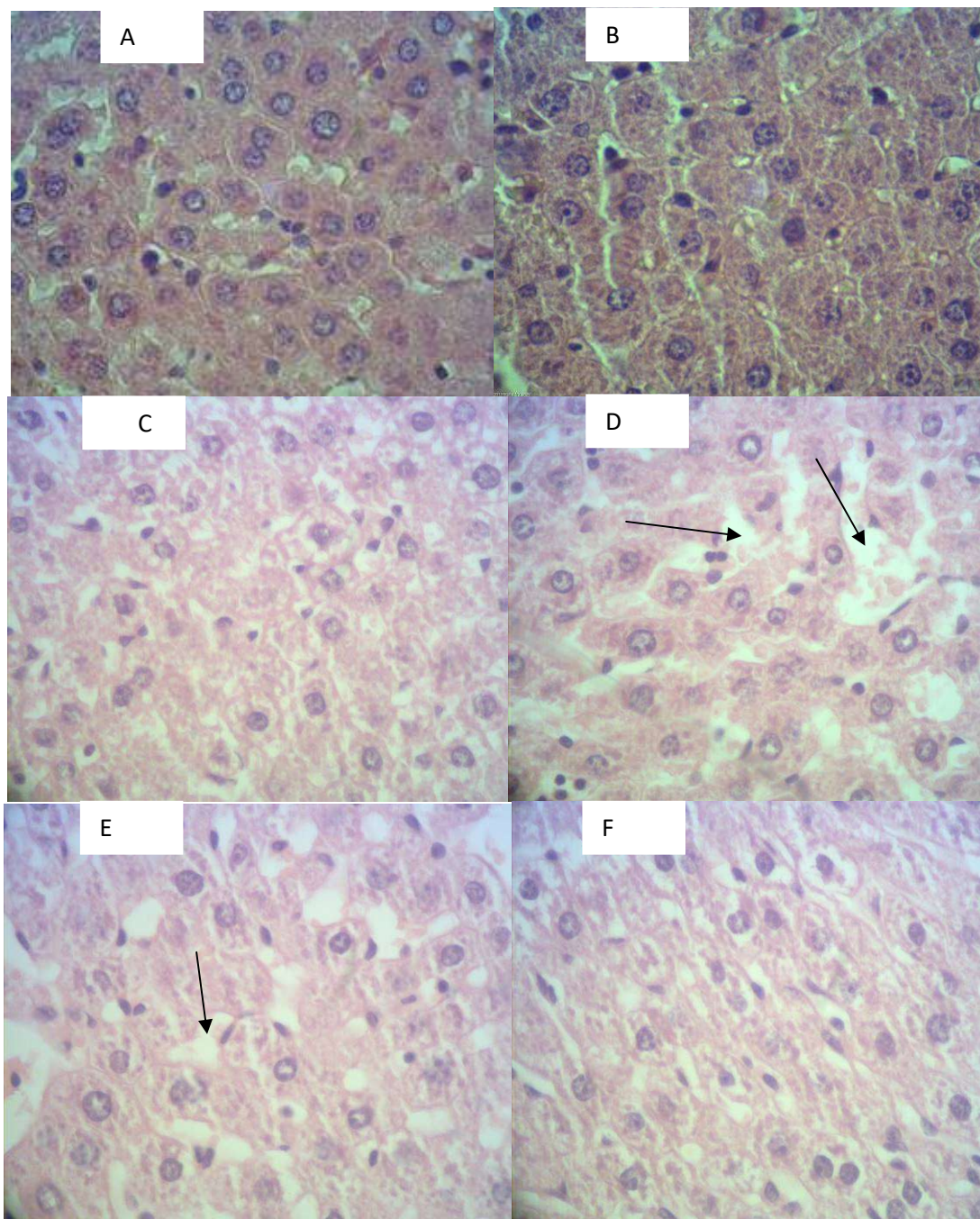
بررسی‌ها نشان می‌دهند که الکل از طریق تشکیل رادیکال‌های آزاد و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌تواند صدمات سلولی و ژنتیکی زیادی در بافت کبد ایجاد کند.^{۴۱} الکل به طور عمده بعد از مصرف توسط سه سیستم الکل دهیدروژناز، سیتوکروم p450 و کاتالاز در کبد متابولیزه می‌شود و متابولیت‌های ثانویه سمی و فعال استالدید و استات تولید می‌شود که این مواد می‌توانند موجب آسیب به بافت‌های مختلف از جمله کبد شوند.^{۴۲} همچنین باعث اختلال در سیستم‌های آنتی اکسیدانی بدن می‌شوند. در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرایندها موجب استرس اکسیداتیو می‌گردد. رادیکال‌های آزاد به دلیل تمایل به جذب الکترون می‌توانند به ماکرو مولکول‌های مهم بدن از جمله پروتئین‌ها، چربی‌ها و DNA آسیب برسانند.^{۴۳} برخی از محققین معتقدند الکل با افزایش آپوپتوز سلولی و تولید رادیکال‌های آزاد و هم چنین مهار فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی از قبیل گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز باعث تخریب در سلول‌های مختلف بدن می‌شوند.^{۴۴} به نظر می‌رسد آسیب‌های کبدی در گروه‌های دریافت کننده اتانول با افزایش استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدها و القای مرگ سلولی مرتبط باشد.^{۴۵} کورکومین دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت‌های ضد التهابی می‌باشد.^{۴۶} کورکومین یک ترکیب پلی فنولی و ماده فعال مشتق از ریزوم گیاه زرد چوبه است که فعالیت موثر آنتی اکسیدانی، فعالیت ضد التهابی و ضد میکروبی اعمال می‌نماید و ثابت شده است که مصرف روزانه کورکومین می‌تواند برای کبد در برابر استرس اکسیداتیو مرتبط با مصرف الکل اثر محافظتی داشته باشد.^{۴۷} نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در گروه‌هایی که کورکومین همراه با اتانول استفاده شده است بهبود

کبدی ناشی از مصرف اتانول را در موشهای صحرایی کاهش دهد و سطح سرمی پارامترهای کبدی و خونی را بهبود دهد.

نزدیک شدن به حالت نرمال این پروتئین‌ها دیده شد. این امر نشان دهنده این است که احتمالاً تجویز کورکومین می‌تواند آسیب‌های



شکل ۱: نمودار A: مقایسه ی میانگین AST در گروه های مورد مطالعه. نمودار B: مقایسه ی میانگین ALT در گروه های مورد مطالعه. نمودار C: مقایسه ی میانگین ALP در گروه های مورد مطالعه. نمودار D: مقایسه ی میانگین GGT در گروه های مورد مطالعه. نمودار E: مقایسه میانگین Alb در گروه های مورد مطالعه. نمودار F: مقایسه میانگین TP در گروه های مورد مطالعه. نمودار G: مقایسه میانگین آرژیناز در گروه های مورد مطالعه. نمودار H: مقایسه میانگین BUN در گروه های مورد مطالعه.



شکل ۲: فتومیکروگراف بافت کبد (E&H staining, 40X). (A) در گروه کنترل ساختار طبیعی بافت کبد مشاهده می‌شود. (B) در گروه شم ساختار طبیعی بافت کبد مشاهده می‌شود (C) ساختار کبد به صورت طبیعی می‌باشد و مشکل خاصی مشاهده نمی‌شود. (D) در گروه Ethanol30 آپوپتوزیس، کاریورکسی، کاریولیز و اتوزینوفیلی شدن سیتوپلاسم مشاهده می‌شود. بافت کبد تخریب شده است و کبد دچار نکروز حاد می‌باشد. (E) در گروه Ethanol30+CUR50 نکروز خفیف مشاهده می‌شود و تغییرات ساختاری بافت کبد جزئی است. بافت کبد بهبود یافته است. (F) در گروه Ethanol30+CUR100 نکروز بسیار خفیف مشاهده می‌شود و تغییرات ساختاری بافت کبد بسیار جزئی است و بافت کبد بهبود یافته است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، تجویز اتانول باعث تغییرات هیستوپاتولوژیک شدید در بافت کبد موشهای صحرایی از طریق افزایش التهاب سلولی و آپوپتوزیس در مدت ۲۸ روز گردید. با این حال، تجویز همزمان کورکومین در موشهای صحرایی تیمار شده با اتانول باعث ایجاد اثرات حفاظتی و بهبود بافت کبد گردید. بنظر میرسد اثرات حفاظتی و درمانی کورکومین از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب بافتی صورت می‌پذیرد. بنابراین تجویز همزمان کورکومین بعنوان یک مکمل، می‌تواند در رژیم غذایی افرادی که در معرض

مسمویت کبدی با اتانول قرار دارند در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم می‌دانند از همکاری و حمایت دانشگاه آزاد اسلامی کازرون و تمام افرادی که در انجام این مطالعه یاری رساندند تشکر و قدردانی نمایند.

References

- Oleshchuk O, Ivankiv Y, Falfushynska H, Mudra A, Lisnychuk N. Hepatoprotective effect of melatonin in toxic liver injury in rats. *Medicina*. 2019 Jun;55(6):304.
- Mainardi V, Rando K, Valverde M, Olivari D, Castelli J, Rey G, Gerona S. Acute liver failure due to Wilson disease: eight years of the national liver transplant program in Uruguay. *Annals of hepatology* 2019 Jan 23;18(1):187-92.
- Gawrieh S, Wilson LA, Cummings OW, Clark JM, Loomba R, Hameed B, Abdelmalek MF, Dasarathy S, Neuschwander-Tetri BA, Kowdley K, Kleiner D. Histologic findings of advanced fibrosis and cirrhosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease who have normal aminotransferase levels. *American Journal of Gastroenterology* 2019 Oct 1;114(10):1626-35.
- Farzaei MH, Zobeiri M, Parvizi F, El-Senduny FF, Marmouzi I, Coy-Barrera E, Naseri R, Nabavi SM, Rahimi R, Abdollahi M. Curcumin in liver diseases: a systematic review of the cellular mechanisms of oxidative stress and clinical perspective. *Nutrients* 2018 Jul;10(7):855.
- Amel Zabihi N, Pirro M, P Johnston T, Sahebkar A. Is there a role for curcumin supplementation in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease? The data suggest yes. *Current Pharmaceutical Design*. 2017 Feb 1;23(7):969-82.
- Sid B, Verrax J & Calderon PB, Role of oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease. *Free Radic Res* 2013; 47:894-904.
- Uchio R, Higashi Y, Kohama Y, Kawasaki K, Hirao T, Muroyama K, Murosaki S. A hot water extract of turmeric (*Curcuma longa*) suppresses acute ethanol-induced liver injury in mice by inhibiting hepatic oxidative stress and inflammatory cytokine production. *Journal of nutritional science* 2017;6.
- El-Bahr SM. Effect of curcumin on hepatic antioxidant enzymes activities and gene expressions in rats intoxicated with aflatoxin B1. *Phytother Res*: PTR2015; 29: 134-140.
- Inzaugarat ME, De Matteo E, Baz P, Lucero D, García CC, Gonzalez Ballerga E, Daruich J, Sorda JA, Wald MR, Chernavsky AC. New evidence for the therapeutic potential of curcumin to treat nonalcoholic fatty liver disease in humans. *PLoS One*. 2017 Mar 3;12(3):e0172900.
- Li Y, Shi X, Zhang J, Zhang X, Martin RC. Hepatic protection and anticancer activity of curcuma: A potential chemopreventive strategy against hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology* 2014 Feb 1;44(2):505-13.
- Cheng JJ, Yang NB, Wu L, Lin JL, Dai GX, Zhu JY. Effects of zedoary turmeric oil on P450 activities in rats with liver cirrhosis induced by thioacetamide. *International journal of clinical and experimental pathology* 2014;7(11):7854.
- Kawasaki K, Muroyama K, Yamamoto N, et al. A hot water extract of *Curcuma longa* inhibits adhesion molecule protein expression and monocyte adhesion to TNF- α -stimulated human endothelial cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2015; 79: 1654-1659.
- Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, Monisha J, Roy NK, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *British journal of pharmacology* 2017 Jun 1;174(11):1325-48.
- Kyung EJ, Kim HB, Hwang ES, Lee S, Choi BK, Kim JW, Kim HJ, Lim SM, Kwon OI, Woo EJ. Evaluation of hepatoprotective effect of curcumin

- on liver cirrhosis using a combination of biochemical analysis and magnetic resonance-based electrical conductivity imaging. *Mediators of Inflammation* 2018 May 17;2018.
15. Kuttan R, Binitha PP. Neuroprotective Activity of Curcumin and Emblica officinalis Extract against Carbofuran-Induced Neurotoxicity in Wistar Rats. *Neuroprotective Effects of Phytochemicals in Neurological Disorders* 2017 Jan 3:447.
 16. Blumanthal. M, Herbal medicine expanded Commision E Monographs, 1998: 379-384.
 17. Lee GH, Lee HY, Choi MK, Chung HW, Kim SW, Chae HJ. Protective effect of Curcuma longa L. extract on CCl 4-induced acute hepatic stress. *BMC Research Notes* 2017 Dec 1;10(1):77.
 18. Hwang KW, Son D, Jo HW, Kim CH, Seong KC, Moon JK. Levels of curcuminoid and essential oil compositions in turmeric (Curcuma longa L.) grown in Korea. *Applied Biological Chemistry* 2016 Apr 1;59(2):209-15.
 19. Nile SH, Nile AS, Keum YS. Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods. *3 Biotech*. 2017 May 1;7(1):76.
 20. Rajakrishnan V, Viswanathan P, Rajasekharan KN, Menon VP. Neuroprotective role of curcumin from Curcuma longa on ethanol-induced brain damage. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 1999 Nov;13(7):571-4.
 21. Srimal.R.C Turmeric, A brief review of medical properties. *Fitoterapia* 1997; (6): 483-494.
 22. Werawatganon D. Protective Effects of Curcumin on Gastric Inflammation and Liver Disease. *Superfood and Functional Food: The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine*. 2017 Feb 22:173.
 23. Martin pares E, Recherche de la active anti inflamatoire de substances D origine naturelle. *Ethnopharmacologie* 1990; 12: 22-25.
 24. Maulina T, Diana H, Cahyanto A, Amaliya A. The efficacy of curcumin in managing acute inflammation pain on the post-surgical removal of impacted third molars patients: A randomised controlled trial. *Journal of oral rehabilitation* 2018 Sep;45(9):677-83.
 25. Menozzi A, Pozzoli C, Poli E, Martelli M, Martelli L, Zullian C, Bertini S. Effects of oral curcumin on indomethacin-induced small intestinal damage in the rat. *Drug discoveries & therapeutics* 2009;3(2).
 26. Habib-ur-Rehman M, Tahir M, Lone KP, Sami W. Ethanol induced hepatotoxicity in albino rats. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2011;21(10):642-3.
 27. Abdulaziz Bardi D, Halabi MF, Abdullah NA, Rouhollahi E, Hajrezaie M, Abdulla MA. In vivo evaluation of ethanolic extract of Zingiber officinale rhizomes for its protective effect against liver cirrhosis. *BioMed Research International* 2013;2013.
 28. Akomolafe SF, Aluko BT. Protective effect of curcumin on fertility in cyclophosphamide exposed rats: Involvement of multiple pathways. *Journal of Food Biochemistry* 2020 Jan;44(1):e13095.
 29. Fan Y, Du Z, Steib CJ, Ding Q, Lu P, Tian D, Liu M. Effect of SEPT6 on the biological behavior of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats and its mechanism. *Laboratory Investigation* 2019 Jan;99(1):17-36.
 30. Yuan Y, Che L, Qi C, Meng Z. Protective effects of polysaccharides on hepatic injury: A review. *International journal of biological macromolecules* 2019 Dec 1;141:822-30.
 31. Ali ES, Rychkov GY, Barritt GJ. Deranged hepatocyte intracellular Ca²⁺ homeostasis and the progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocellular carcinoma. *Cell calcium* 2019 Sep 1;82:102057.
 32. McGill MR. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI journal* 2016;15:817-28.
 33. R Teschke Alcoholic liver disease: Current mechanistic aspects with focus on their clinical relevance. *Biomedicines* 2019; 63:214-227.
 34. Niemelä O. Biomarker-based approaches for assessing alcohol use disorders. *International journal of environmental research and public health* 2016 Feb;13(2):166.
 35. Fan JH, Xiang MQ, Li QL, Shi HT, Guo JJ. PNPLA3 rs738409 polymorphism associated with hepatic steatosis and advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus: a meta-analysis. *Gut and liver* 2016 May;10(3):456.
 36. Palizgir MT, Akhtari M, Mahmoudi M, Mostafaei S, Rezaieanesh A, Shahram F. Curcumin reduces the expression of interleukin 1 β and the production of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha by M1 macrophages from patients with Behcet's disease. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 2018 Jul 4;40(4):297-302

Azam Letafat Farashbandi¹,
Mehrdad Shariati^{2*}, Mokhtar
Mokhtari³, Ameneh
Khoshvaghti⁴

¹ Ph.D Student in Animal
Physiology, Department of
Biology, Kazerun Branch
Islamic Azad University,
Kazerun, Iran

² Associate Professor,
Department of Biology, Kazerun
Branch, Islamic Azad
University, Kazerun, Iran

³ Full Professor, Department of
Biology, Kazerun Branch,
Islamic Azad University,
Kazerun, Iran

⁴ Associate Professor,
Department of Clinical
Pathology, Faculty of
Veterinary Medicine, Kazerun
Branch, Islamic Azad
University, Kazerun, Iran

Evaluation of the Effects of Curcumin on Ethanol-Induced Liver Failure in Male Rats

Received: 4 Sept 2020 ; Accepted: 15 Apr 2021

Abstract

Purpose: Alcohol consumption can cause hepatitis and long-term cirrhosis of the liver. Curcumin has antioxidant and anti-inflammatory activity. The aim of this study was to evaluate the protective effects of curcumin in the prevention and treatment of liver damage caused by overuse of ethanol.

Material and Methods: In this experimental study, 30 adult male Wistar rats were divided into 6 groups of 5. The control group received only normal water and food daily. The sham group received only 2cc of olive oil daily. The experimental group1 received only 100 mg / kg curcumin daily. Experimental group 2 daily received 2 cc Ethanol30%. The experimental group3 daily received Ethanol 30% and 50mg/kg of curcumin and experimental group 4 daily received Ethanol30% and 100 mg/kg. of curcumin. The animals received water, ethanol, curcumin, and food orally daily for 28 days. At the end of the test period, blood samples were taken from the hearts of the animals. Serum levels of AST, ALT, ALP, GGT and arginase as well as serum albumin, total protein and blood urea nitrogen were measured. Animal liver tissue was removed in different groups. Hematoxylin-eosin staining method was used to test the testicular tissue.

Findings: Ethanol treatment significantly increased the activity levels of serum enzymes ALT, AST, ALP, GGT, arginase 1 and blood urea nitrogen compared to control, sham and experimental group 1 ($p<0.05$), while decreased albumin and the total protein levels ($p<0.05$). In addition, ethanol treatment caused the accumulation of fat droplets, hyperemia, necrosis, apoptosis and eosinophilia of the cytoplasm in hepatocytes. However, co-administration of ethanol and curcumin significantly reduced ALT, AST, ALP, GGT, arginase 1 and BUN levels compared to the ethanol group ($p<0.05$), while increased albumin and total protein levels ($p<0.05$). Histopathologically, a decrease in structural changes in liver tissue and apoptosis was observed, resulting in the improvement of liver tissue.

Conclusion: The administration of curcumin can reduce ethanol-induced liver damage in rats and improve serum liver and blood parameters.

Keywords: Curcumin, Ethanol, Liver, Rats

*Corresponding Author:

Department of Biology,
Kazerun Branch, Islamic Azad
University, Kazerun, Iran

Tell: 09173133221
E-mail:: mehrdadshariati@hotmail.com