Feyz Medical Sciences Journal
2024, Volume 28, Issue 4
Pages: 375-382
Doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.4.375
Original Article

Protective effect of chlorogenic acid on diclofenac-induced oxidative stress and inflammation in the liver of BALB/c mice

Mohamad Hadi Yazdani [1], Firoozeh Saghaei [2*], Maryam Karimi-Dehkordi [3]

[1] D.V.M. Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[3] Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

[*]**Corresponding author: Firoozeh Saghaei**, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
Email: f_saghaei@yahoo.com

Received: 3 January 2024 **Revised:** 9 October 2024 **Accepted:** 9 October 2024

Abstract

Background and Aim: Diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, is known to induce liver damage. This study evaluated the protective effects of chlorogenic acid, a plant compound with anti-inflammatory and antioxidant properties, against diclofenac-induced hepatotoxicity in BALB/c mice.

Methods: In this experimental study, 42 BALB/c mice were randomly divided into seven groups: control (saline), diclofenac, chlorogenic acid, diclofenac + chlorogenic acid, diclofenac + vitamin E, diclofenac + propylene glycol (the solvent for chlorogenic acid), and a prevention group (chlorogenic acid administered for six days followed by diclofenac on the seventh day). All treatments were conducted over seven days. At the end of the treatment period, gene expression levels of pro-inflammatory factors, including interleukin 1 beta (IL-1β) and tumor necrosis factor alpha (TNF-α), as well as antioxidant enzymes such as catalase and superoxide dismutase, were measured using RT-PCR.

Results: Diclofenac significantly increased the gene expression of pro-inflammatory factors (IL-1β and TNF-α) while decreasing the expression of antioxidant enzymes (catalase and superoxide dismutase). Conversely, administration of chlorogenic acid for seven days significantly reduced the gene expression of pro-inflammatory factors and increased the levels of antioxidant enzymes.

Conclusion: The findings of this study indicate that chlorogenic acid exhibits antioxidant and anti-inflammatory effects in liver toxicity induced by diclofenac in mice. These effects are comparable to those of vitamin E.

Keywords: Chlorogenic Acid, Diclofenac, Liver Toxicity, Antioxidants, Interleukin 1 Beta.

Copyright© 2024. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms. Downloaded from: http://feyz.kaums.ac.ir/

مجله علوم پزشکی فیض
دوره ۲۸، شماره ۴، مهر و آبان ۱۴۰۳
صفحات: ۳۸۲-۳۷۵
Doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.4.375
اصیل پژوهشی

اثر محافظتی کلروژنیک اسید بر استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از دیکلوفناک در کبد موش

محمد هادی یزدانی [۱]، فیروزه سقایی [۲*]، مریم کریمی دهکردی [۳]

[۱] دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[۲] گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[۳] گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۱۳ **اصلاح مقاله:** ۱۴۰۳/۰۷/۱۸ **پذیرش مقاله:** ۱۴۰۳/۰۷/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: دیکلوفناک یک داروی ضد التهاب غیر استروئیدی است که میتواند باعث آسیبهای کبدی گردد. در این مطالعه اثر کلروژنیک اسید که یک ترکیب گیاهی با خواص ضد التهاب و آنتی اکسیدان است در مسمومیت کبدی القا شده با دیکلوفناک در موش ارزیابی شد.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۴۲ موش BALB/c به‌صورت تصادفی به ۷ گروه شامل کنترل (سالین)، دیکلوفناک، کلروژنیک اسید، دیکلوفناک+کلروژنیک اسید، دیکلوفناک+ویتامین E، دیکلوفناک+پروپیلن گلیکول (حلال کلروژنیک اسید) و پیشگیری (کلروژنیک اسید به مدت ۶ روز و در روز هفتم دیکلوفناک) تقسیم شدند. همه تیمارها ۷ روز انجام شد. در پایان، بیان ژن فاکتورهای پیش التهابی شامل اینترلوکین ۱ بتا (IL-1β) و فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α) و آنزیمهای آنتی اکسیدانی شامل کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز به روش RT-PCR سنجش گردید.

یافته‌ها: دیکلوفناک به طور معناداری موجب افزایش بیان ژن فاکتورهای پیش التهابی (IL-1β و TNF-α) و کاهش بیان ژن آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز) گردید. در حالی که تجویزکلروژنیک اسید به مدت ۷ روز به‌طور معناداری بیان ژن فاکتورهای پیش التهابی را کاهش و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه بیانگر اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی کلروژنیک اسید در مسمومیت کبدی ناشی از دیکلوفناک در موش می‌باشد. این اثرات تقریبا با اثر ویتامین E هم ارز است.

کلیدواژه‌ها: کلروژنیک اسید، دیکلوفناک، مسمومیت کبدی، آنتی اکسیدان‌ها، اینترلوکین ۱ بتا.

*نویسنده مسئول: **فیروزه سقایی.** پست الکترونیک: f_saghaei@yahoo.com
آدرس: گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

مقدمه

بیماری کبد یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر در سراسر جهان است. آسیب کبدی می‌تواند توسط عوامل مختلفی از جمله الکل، سوء مصرف مواد مخدر، عفونت‌های ویروسی، حمله متابولیک و خودایمنی ایجاد شود [۱، ۲]. تجویز داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی نیز می‌تواند منجر به سمیت کبدی گردد [۳]. دیکلوفناک که یک داروی ضد التهاب غیر استروئیدی است، برای بیماری‌های روماتیسمی مختلف تجویز می‌شود. با این وجود، استفاده طولانی مدت از آن مانند سایر داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی منجر به آسیب کبدی در حیوانات و انسان می‌شود [۴]. تصور می شود دیکلوفناک سمی ترین عضو این دسته دارویی است که منجر به آسیب‌های کبدی، کلیوی و گوارشی می‌شود. در مدل‌های حیوانی بروز آسیب کبدی به مدت قرار گرفتن در معرض و دوز بستگی دارد. سمیت کبدی دیکلوفناک ناشی از چندین واکنش است، از جمله تغییر کووالانسی پروتئین‌ها، استرس اکسیداتیو، واکنش دارویی خاص (ایدیوسینکرازی) و گسترش آسیب میتوکندری توسط گونه‌های فعال اکسیژن. همچنین، دیکلوفناک فعالیت آدنین نوکلئوتید ترانسلوکاز را مهار می‌کند و فعالیت ATPase را در میتوکندری مسدود می نماید. دیکلوفناک می‌تواند سایتوکین‌های پیش التهابی مانند فاکتور نکروز تومور (Tumor necrosis factor alpha., TNF-α) را در کبد نیز افزایش دهد [۳]. اینتر لوکین ۱ بتا (Interleukin-1 beta., IL-1β) نیز یک سایتوکین پیش التهابی بسیار قوی است و سطح آن در طول سمیت کبدی ناشی از داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی افزایش می‌یابد [۵].

در مطالعات گوناگون برای مهار یا کاهش اثرات سمی دیکلوفناک از داروها و ترکیبات مختلفی استفاده شده است. نوری و همکاران اثر محافظتی ان استیل سیستئین را بر سمیت کبدی ناشی از دیکلوفناک در موش صحرایی تایید کردند. ان استیل سیستئین نه تنها سلول‌های التهابی کبد، TNF-a و مالون دی آلدئید (Malondialdehyde., MDA) سرم را کاهش داد، بلکه موجب افزایش فعالیت ویتامین C، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز کبدی نیز شد [۳]. در مطالعه‌ای دیگر تجویز امگا-۳ به‌صورت وابسته به دوز به ویژه در دوز پایین نیز توانست از بروز سمیت کبدی ناشی از دیکلوفناک در موش صحرایی پیشگیری نماید [۶]. تحقیقات زیادی نشان داده که برخی از گیاهان و پلی‌فنول‌های غذایی می‌توانند با فعال کردن سیگنال Nrf2 که یک تنظیم کننده درون زای مهم استرس اکسیداتیو است کبد را از آسیب جدی محافظت کند [۷]. ژل رویال با کاهش موثر فاکتورهای استرس اکسیداتیو و تعدیل آنزیمهای کبدی پس از القای مسمومیت با دیکلوفناک در موش صحرایی توانست شدت آسیب‌های کبدی را کاهش دهد [۸]. عصاره های گیاهی مختلفی نیز در این راستا مورد مطالعه قرار گرفته اند و اثرات مفید آنتی اکسیدانی و ضد التهابی آنها مشاهده شده است مانند نارینژین و هسپریدین [۹] و فلاونوئیدهای Garcinia kola [۱۰].

اسید کلروژنیک، استر کافئیک اسید و کوینیک اسید، که نوعی ترکیب پلی‌فنلی است و در قهوه، میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شود، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی قوی است [۱۱]. اثر شیمیایی اسید کلروژنیک ممکن است از طریق تنظیم آنزیم های آنتی اکسیدانی سلولی مرتبط با Nrf2 باشد [۱۲]. اثر آنتی اکسیدان این ترکیب با افزایش سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز و گلوکاتیون پروکسیداز (GPX) مشخص شده است. همچنین موجب کاهش تولید MDA که محصول اکسیژناسیون می‌باشد، می‌شود [۱۳]. Yuan و همکاران در مطالعه ای نشان دادند اثر محافظتی کلروژنیک اسید در کبد با کاهش تولید فاکتورهای پیش التهابی مانند TNF-α و اینترفرون گاما (IFN-γ) و کاهش تولید اینترلوکین‌هایی مانند IL-1β و IL-6 همراه بوده است [۱۴]. در تحقیق دیگری اثر مهاری کلروژنیک اسید بر استرس اکسیداتیو و التهاب در نفروپاتی دیابتی نشان داده شده است [۱۸]. لذا این مطالعه اثر محافظتی کلروژنیک اسید را بر مبنای اثرات آنتی اکسیدان و ضد التهاب آن بر سمیت کبدی القا شده با دیکلوفناک در موش بررسی می‌کند.

روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۴۰۲ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد. ۴۲ موش نژاد BALB/c با سن حدود ۶ تا ۸ هفته و وزن تقریبی ۵±۴۰ گرم از پژوهشکده زیست فناوری رویان خریداری شد. حیوانات ۱۴ روز پیش از انجام آزمایش در قفس‌های ۵ تایی و در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی به آب و غذای استاندارد و دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند.

گروه‌های آزمایشی

موش‌ها به صورت رندوم به ۷ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل دریافت ۰/۱ میلی لیتر آب مقطر به‌صورت عضلانی، گروه دیکلوفناک (DIC) دریافت۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیکلوفناک بصورت داخل عضلانی جهت القای سمیت کبدی، گروه کلروژنیک اسید (CGA) دریافت کلروژنیک اسید در حلال پروپیلن گلیکول با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی، گروه دیکلوفناک+ کلروژنیک اسید (DIC+CGA) ابتدا دریافت کلروژنیک اسید با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی و پس از ۲ ساعت تجویز دیکلوفناک با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت داخل عضلانی، گروه دیکلوفناک+ویتامینE (DIC+V.E) ابتدا دریافت ویتامین E با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داخل عضلانی و پس از ۲ ساعت تجویز دیکلوفناک با دوز ۵۰ میلیگرم بر کیلوگرم به‌صورت داخل عضلانی، گروه پروپیلن گلایکول+ دیکلوفناک (DIC+PPG) ابتدا دریافت ۰/۱ میلی لیتر

پروپیلن گلیکول داخل صفاقی و پس از ۲ ساعت دیکلوفناک با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داخل عضلانی، گروه پیشگیری (CGA+DIC(P)) به منظور مشاهده اثر پیشگیری کننده کلروژنیک اسید ابتدا دریافت۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کلروژنیک اسید به صورت داخل صفاقی و سپس در آخرین روز دریافت دیکلوفناک با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داخل عضلانی.

داروها روزانه و به‌مدت ۷ روز تجویز شدند. در روز هفتم مواد غذایی از دسترس موش‌ها خارج شد و در روز هشتم تحت بیهوشی عمیق با کلروفرم شکم موش‌ها باز شد و کبد کاملا خارج گردید و بخشی از بافت کبد جهت تعیین بیان ژن فاکتورهای استرس اکسیداتیو (سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز) و فاکتورهای پیش التهابی (IL-1β,TNF-α) به روش RT-PCR جدا و تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

روش Real Time PCR

برای بررسی میزان بیان ژن های فاکتورهای پیش التهابی TNF-α و IL1-β و آنزیمهای آنتی‌اکسیدان سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در بافت کبد ابتدا ۱۰۰ mg از بافت کبد هموژن و توتال RNA با استفاده از کیت تجاری BIOZOL (Bioer، کشورچین) استخراج گردید. کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفروز روی ژل آگارز بررسی شد. سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ ۲۰۰۰ (Thermo USA)، کمیت RNA مورد ارزیابی قرار گرفت (نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰). به منظور حذف حضور DNA احتمالی در نمونه RNA استخراج شده از کیت DNase I ساخت شرکت سیناژن استفاده شد. برای تبدیل RNA به cDNA ازکیت سنتز cDNA (شرکت یکتا تجهیز) استفاده شد. پس از تشکیل cDNA، در حضور پرایمرهای خاص از روش Real Time PCR بیان ژن‌های مورد نظر سنجیده شد.

برای طراحی پرایمرها از نرم افزار Beacon designer software (تکاپو زیست – کشورایران) استفاده شد. پرایمرها به صورت اتصال اگزون- اگزون طراحی شد و برای تکثیر DNA ژنومی از ۲۵ نانوگرم cDNA در تیوب‌های جداگانه استفاده شد. توالی پرایمرهایسوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز و TNF-α و IL1-β و همچنین GAPDH در جدول-۱ آمده است. از ژن GAPDH به‌عنوان یک ژن کنترل داخلی برای کنترل بیان mRNA و نرمال سازی داده‌ها استفاده شد.

فرایند RT-q PCR در ۴۵ سیکل انجام شد. مراحل شامل دناتوراسیون که در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد، سپس اتصال پرایمر در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ ثانیه و در مرحله بعد گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۵ ثانیه بود. کارآیی تکثیر قطعات مورد نظر با استفاده از منحنی استاندارد مورد بررسی قرار گرفت و از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ جهت براورد میزان بیان ژن استفاده شد.

محاسبات آماری

داده ها در نرم افزار SPSS نسخه ۲۵ آنالیز شد. برای بررسی نتایج از انالیز واریانس یک طرفه ANOVA و پست آزمون Tukey بهره گرفته شد. سطح معنی‌دار کمتر از ۰/۰۵ لحاظ شد.

ملاحظات اخلاقی

پژوهش طبق دستور کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد با کد اخلاق IR.IAU.SHK.REC.1402.012 انجام شد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در Real-time PCR

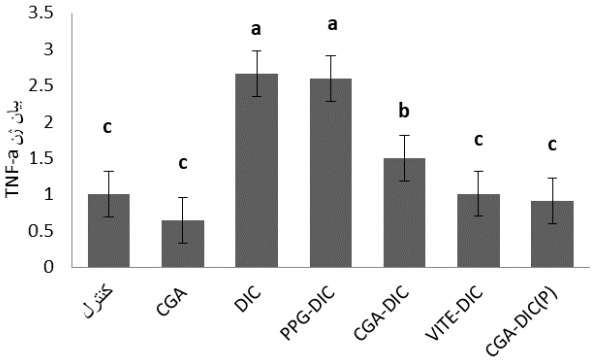
ژن	توالی زوج پرایمر
TNF-α forward reverse	5´-CTGGCGTGTTCATCCGTTC-3′ 5′-GGCTCTGAGGAGTAGACGATAA-3′
IL-1β forward reverse	5´ - CAACAAAAATGCCTCGTGCTG-3′ 5´ -TCGTTGCTTGTCTCTCCTTGTA-3′
سوپر اکسید دیسموتاز forward reverse	5´-TGACTTGGGCAAAGGTGGAAATG-3′ 5´ -ATGGTTTGAGGGTAGCAGATGAGT-3′
کاتالاز forward reverse	5′- CACCTGTAATCAACGCTGGATGG-3′ 5-GCCCTAACCTTTCATTTCCCTTCAG-3′
GAPDH forward reverse	5′- TTGGCTACAGCAACAGG -3′ 5′- GGGGAGATTCAGTGTGG -3′

نتایج

طبق نمودار-۱ بالاترین میزان بیان ژن TNF-α در گروه دریافت کننده دیکلوفناک مشاهده می شود. تجویز کلروژنیک اسید همراه با دیکلوفناک موجب کاهش معنادار بیان این ژن شد (P<۰/۰۵). کلروژنیک اسید به تنهایی موجب کاهش بیان ژن TNFα شده ولی تغییر معناداری در بیان این ژن نسبت به گروه کنترل نداشته است. تیمار گروه دیکلوفناک +ویتامین E نسبت به گروه دیکلوفناک به تنهایی سبب کاهش معناداری در بیان ژن TNF-α شده است (P<۰/۰۰۱). میزان بیان TNF-α در گروه پروپیلن گلیکول+دیکلوفناک اختلاف معناداری با گروه دیکلوفناک ندارد که نشان می‌دهد حلال کلروژنیک اسید (پروپیلن گلیکول) تاثیری در نتایج آزمایش نداشته است. در گروه پیشگیری از آسیب دیکلوفناک،کاهش بیان ژن TNFα شبیه تیمار ویتامین E به طور معناداری کمتر از گروه تیمار با کلروژنیک اسید+ دیکلوفناک بوده است (P<۰/۰۰۱) (نمودار-۱).

همانگونه که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود دیکلوفناک باعث افزایش معنادار بیان ژن IL-1β نسبت به گروه کنترل شده است. تیمار دیکلوفناک+کلروژنیک اسید و ویتامین E +کلروژنیک اسید و همچنین در گروه پیشگیری بیان ژن IL-1β نسبت به گروه دیکلوفناک کاهش معناداری دارد (P<۰/۰۵). افزودن پروپیلن گلیکول به دیکلوفناک تاثیر معناداری در نتایج بیان این ژن در مقایسه با دیکلوفناک به تنهایی نداشته است.

دیکلوفناک موجب کاهش معنادار سوپر اکسید دیسموتاز نسبت به گروه کنترل شده است. مصرف کلروژنیک اسید همراه با دیکلوفناک موجب افزایش معنادار بیان سوپر اکسید دیسموتاز نسبت به دیکلوفناک شده است (p<۰/۰۵). مصرف ویتامین E همراه دیکلوفناک نیز موجب افزایش معنادار فعالیت این آنزیم آنتی‌اکسیدانی نسبت به گروه دیکلوفناک شده است (P<۰/۰۰۱). پروپیلن گلیکول همراه با دیکلوفناک تاثیر معناداری در میزان بیان ژن سوپر اکسید دیسموتازنسبت به گروه دیکلوفناک به تنهایی نداشته است. در گروه پیشگیری با کلروژنیک اسید، تغییرات به سمت افزایش معنادار بیان ژن سوپر اکسید دیسموتازاست (P<۰/۰۵) (نمودار ۳).

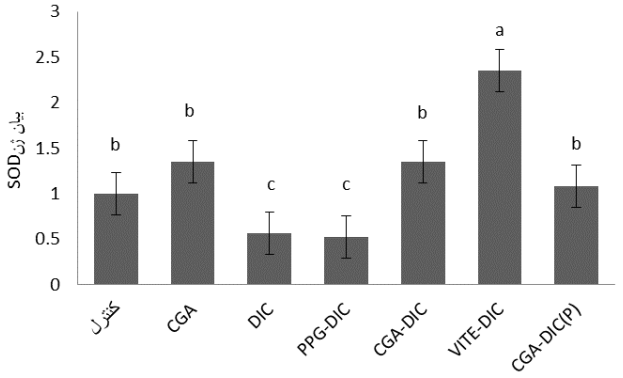


نمودار ۱. مقایسه بیان ژن TNF-α در گروههای آزمایش کلروژنیک اسید (CGA)، دیکلوفناک (DIC)، پروپیلن گلیکول + دیکلوفناک (PPG-DIC)، کلروژنیک اسید+ دیکلوفناک (CGA-DIC)، ویتامین E + دیکلوفناک (VITE-DIC) و گروه پیشگیری با کلروژنیک اسید+ دیکلوفناک ((CGA+DIC(P).

وجود حروف متفاوت در هر گروه بیانگر اختلاف معنادار است (P<۰/۰۵).

نتایج به صورت mean±SD بیان شده است.

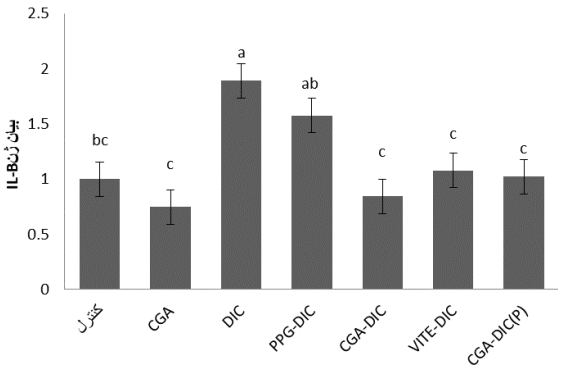
بیان ژن کاتالاز پس از تجویز دیکلوفناک کاهش یافته ولی معنادار نیست. مصرف کلروژنیک اسید همراه با دیکلوفناک بیان این ژن را به طور معناداری افزایش داده است (P<۰/۰۵). تجویز ویتامین E نیز به‌طور معناداری بیان ژن کاتالاز را افزایش داده است (P<۰/۰۰۱). پروپیلن گلیکول (به‌عنوان حلال کلروژنیک اسید) تاثیر معناداری نداشته و در گروه پیشگیری گرچه بیان ژن کاتالاز نسبت به دیکلوفناک افزایش یافته ولی معنادار نمی‌باشد (نمودار ۴).



نمودار۳. مقایسه بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز در گروههای آزمایش کلروژنیک اسید (CGA)، دیکلوفناک (DIC)، پروپیلن گلیکول + دیکلوفناک (PPG-DIC)، کلروژنیک اسید+ دیکلوفناک (CGA-DIC)، ویتامین E + دیکلوفناک (VITE-DIC) و گروه پیشگیری با کلروژنیک اسید+ دیکلوفناک ((CGA+DIC(P).

وجود حروف متفاوت در هر گروه بیانگر اختلاف معنادار است (P<۰/۰۵).

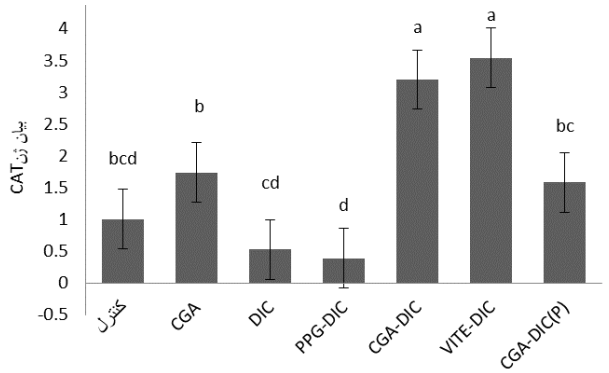
نتایج به صورت mean±SD بیان شده ست.



نمودار۲. مقایسه بیان ژن IL-1ß در گروه‌های آزمایش کلروژنیک اسید (CGA)، دیکلوفناک (DIC)، پروپیلن گلیکول + دیکلوفناک (PPG-DIC)، کلروژنیک اسید+ دیکلوفناک (CGA-DIC)، ویتامین E + دیکلوفناک (VITE-DIC) و گروه پیشگیری با کلروژنیک اسید+ دیکلوفناک ((CGA+DIC(P).

وجود حروف متفاوت در هر گروه بیانگر اختلاف معنادار است (P<۰/۰۵).

نتایج به صورت mean±SD بیان شده است.



نمودار۴. مقایسه بیان ژن کاتالاز در گروه‌های آزمایش کلروژنیک اسید (CGA)، دیکلوفناک (DIC)، پروپیلن گلیکول + دیکلوفناک (PPG-DIC)، کلروژنیک اسید+ دیکلوفناک (CGA-DIC)، ویتامین E + دیکلوفناک (VITE-DIC) و گروه پیشگیری با کلروژنیک اسید+ دیکلوفناک ((CGA+DIC(P).

وجود حروف متفاوت در هر گروه بیانگر اختلاف معنادار است (P<۰/۰۵).

نتایج به صورت mean±SD بیان شده است.

بحث

مطالعه حاضر به منظور تعیین اثر ضد التهاب و آنتی اکسیدان کلروژنیک اسید بر سمیت کبدی ناشی از دیکلوفناک در موش طراحی شد. نتایج نشان می‌دهد استفاده از دیکلوفناک بیان ژن‌های فاکتورهای پیش التهابی (TNF-α و IL-1β) را به طور معناداری افزایش و موجب کاهش بیان ژن‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز نسبت به گروه کنترل شد. افزودن کلروژنیک اسید به رژیم درمانی موش‌ها در دو گروه درمان و پیشگیری و تجویز ویتامین E همراه با دیکلوفناک بیان ژنهای مربوط به التهاب را به‌طور معناداری کاهش داد و موجب افزایش معنادار فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز شد.

مطالعات گوناگون نشان داده که التهاب و استرس اکسیداتیو واسطه سمیت کبدی ناشی از دیکلوفناک است [۸،۱۵،۱۶]. دیکلوفناک می تواند با ایجاد اختلال در مکانیسم‌های محافظتی با واسطه ایمنی، تولید متابولیت های اکسیژن فعال و مهار فعالیت آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی باعث آسیب میتوکندری در بافت کبد شود [۱۷]. مطالعات قبلی نشان داده که متابولیت‌های دیکلوفناک موجب نفوذ نوتروفیل‌ها در سلول‌های کبدی و نکروز سلول‌های کبدی میشوند که این اثرات با تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مرتبط است. بنابراین، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی هر عامل درمانی که آسیب‌های سلولی ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش دهد، می‌تواند رویکرد درمانی برای متوقف کردن یا جلوگیری از اثر سیتوتوکسیک دیکلوفناک باشد [۱۰]. نوری و همکاران گزارش کردند که دیکلوفناک موجب القای استرس اکسیداتیو و بیان ژن TNF-α در کبد رت می‌شود و با تجویز ان استیل سیستئین علاوه بر کاهش سلول‌های التهابی، TNF-α و MDA، فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز نیز افزایش می‌یابد [۳]. همچنین حسن و همکاران نشان دادند دیکلوفناک موجب آپوپتوز و نکروز سلول‌های کبدی در اثر نفوذ سلول‌های التهابی در رت میشود که تجویز نارینژین، هسپریدین و ترکیب آنها، که قوی‌تر بوده، از طریق اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد آپوپتوز، آسیب کبدی ناشی از دیکلوفناک را خنثی میکند [۹] که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارند.

کلروژنیک اسید بیان پروتئین‌ها و ژن‌های مرتبط به پاسخ‌های التهابی را تنظیم میکند تا از آسیب‌های مختلف ناشی از التهاب به بدن جلوگیری نماید [۱۸]. علاوه بر این، در موش‌های دچار آسیب نخاعی، کلروژنیک اسید موجب کاهش سطح TNF-α و غلظت IL-1β و IL-6 شده است [۱۹]. Lee و همکاران نیز اثر ضد التهابی کلروژنیک اسید در موش‌های مبتلا به بیماری التهابی روده را با کاهش بیان ژن‌های التهابی و سیکلواکسیژناز پس از تجویز کلروژنیک اسید تایید نموده‌اند [۲۰]. مطالعه دیگری نشان داده کلروژنیک اسید به‌دلیل اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی می‌تواند یک ماده محافظت کننده عصبی مفید در برابر آسیب ایسکمی – پرفیوژن مجدد باشد [۲۱]. از طرفی سطوح سرمی و بیان ژن‌های IL6، IL-1β و TNFα توسط کلروژنیک اسید در مسمومیت کبدی ناشی از CCl4 کاهش داشته است [۲۲]. در تحقیق دیگری اثر کلروژنیک اسید بر سمیت کبدی ناشی از تاموکسیفن بررسی شد که کلروژنیک اسید توانست موجب کاهش سطوح بیومارکرهای پیش التهابی مانند IL-1β و TNFα گردد که به‌وسیله تاموکسیفن القا شده بودند. همچنین در رت‌های دریافت‌کننده کلروژنیک اسید نیز فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در بافت کبد به‌طور معناداری افزایش یافت [۲۳]. یافته های این تحقیقات با نتایج تحقیق حاضر همسو می باشد. دو مطالعه مختلف نشان داد تجمع آلومینیوم و کادمیوم در سلول‌های بدن موجب آسیب بافتی شده و قرار دادن سلول‌ها در معرض کلرید آلومینیوم و کادمیوم موجب افزایش معنادار میزان MDA و کاهش سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز و GSH میشود. پس از استفاده از کلروژنیک اسید، نه تنها سطح MDA کاهش یافت بلکه افزایش سوپر اکسید دیسموتاز وکاتالاز و GSH نیز مشاهده شد که نشان داد کلروژنیک اسید با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها توانسته سمیت کلرید آلومینیوم و کادمیوم را کاهش دهد [۲۴،۲۵].

مبتنی بر شواهد ارائه شده و نتایج حاصل از تحقیق حاضر کلروژنیک اسید توانسته، همانند ویتامین E که اثرات آنتی اکسیدان آن پیش از این اثبات شده، موجب مهار استرس اکسیداتیو شود و کبد را از اثرات مضر دیکلوفناک محافظت نماید. تیمار موشها با ویتامین E موجب کاهش معنی دار بیان ژن‌های پیش التهابی به ویژه TNF-α نیز شده است. قابل توجه است که تجویز پروپیلن گلیکول (حلال کلروژنیک اسید) به موشهای دریافت کننده دیکلوفناک نشان دهنده هیچ تغییر معناداری نسبت به دیکلوفناک به تنهایی در فاکتورهای مورد بررسی نیست. این نشان می‌دهد پروپیلن گلیکول تاثیری در نتایج آزمایش نداشته است.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج حاضر بیانگر این است که تجویز دوز بالای دیکلوفناک سبب ایجاد التهاب با افزایش بیان ژن فاکتورهای پیش التهابی IL-1β و TNFα می‌شود. همچنین میزان آنزیمهای آنتی اکسیدان سوپر اکسید دیسموتاز وکاتالاز نیز کاهش می‌یابد که نشان دهنده القای استرس اکسیداتیو است. کلروژنیک اسید که یک ترکیب طبیعی استخراج شده از برخی گیاهان با خواص آنتی-اکسیدان و ضد التهاب می‌باشد، موجب کاهش بیان ژن فاکتورهای پیش التهابی و افزایش آنزیمهای آنتی اکسیدان به ویژه کاتالاز شد. نتایج نشان داد اثر آنتی اکسیدان این ماده با ویتامین E مشابه است. گرچه اثرات آنتی‌اکسیدان ویتامین E نسبت به کلروژنیک اسید برجسته تر بود ولی این امکان وجود دارد که با افزایش دوز کلروژنیک اسید به اثرات ضد التهابی و انتی‌اکسیدانی قویتری دست یافت.

تشکر و قدردانی: این مقاله مستخرج از پایان نامه دانشجو محمدهادی یزدانی می باشد. تمامی هزینه‌ها به عهده نویسندگان بوده و هیچ گونه حمایت مالی نشده است. نویسندگان از آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد شهرکرد بابت انجام آزمایشات کمال تقدیر و تشکر را دارد.

نقش نویسندگان: همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Udompap P, Kim D, Kim WR. Current and future burden of chronic nonmalignant liver disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2015; 13(12):2031-41. doi:10.1016/j.cgh.2015.08.015
2. Wang FS, Fan JG, Zhang Z, Gao B, Wang HY. The global burden of liver disease: the major impact of China. Hepatology. 2014; 60(6): 2099-108. doi:10.1002/hep.27406
3. Nouri A, Heidarian E, Nikoukar M. Effects of N-acetyl cysteine on oxidative stress and TNF-α gene expression in diclofenac-induced hepatotoxicity in rats. Toxicol Mech Methods. 2017; 27(8): 561-7. doi:10.1080/15376516.2017.1334732
4. Licata A. Adverse drug reactions and organ damage: the liver. Eur J Intern Med. 2016; 28:9-16. doi:10.1016/j.ejim.2015.12.017
5. Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohamadnejad M, Sutterwala FS, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. J Clin Invest. 2009; 119(2):305-14. doi:10.1172/JCI35958
6. Adeyemi WJ, Olayaki LA. Diclofenac-induced hepatotoxicity: Low dose of omega-3 fatty acids have more protective effects. Toxicol Rep. 2018; 1(5):90-5. doi:10.1016/j.toxrep.2017.12.002
7. Zhang Q, Pi J, Woods CG, Andersen ME. A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response. Toxicol Appl Pharmacol. 2010; 244(1):84-97. doi:10.1016/j.taap.2009.08.018
8. Mostafa RE, El-Marasy SA, Jaleel GA, Bakeer RM. Protective effect of royal jelly against diclofenac-induced hepato-renal damage and gastrointestinal ulcerations in rats. Heliyon. 2020; 6(2). doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03330
9. Hassan RA, Hozayen WG, Abo Sree HT, Al-Muzafar HM, Amin KA, Ahmed OM. Naringin and hesperidin counteract diclofenac-induced hepatotoxicity in male wistar rats via their antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic activities. Oxid Med Cell Longev. 2021; 2021. doi:10.1155/2021/9990091
10. Alabi QK, Akomolafe RO, Olukiran OS, Adeyemi WJ, Nafiu AO, Adefisayo MA, et al. The Garcinia kola biflavonoid kolaviron attenuates experimental hepatotoxicity induced by diclofenac. Pathophysiology. 2017; 24(4):281-90. doi:10.1016/j.pathophys.2017.07.003
11. Ali N, Rashid S, Nafees S, Hasan SK, Shahid A, Majed F, et al. Protective effect of Chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: An experimental approach. Chem Biol Interact. 2017; 272:80-91. doi:10.1016/j.cbi.2017.05.002
12. Feng R, Lu Y, Bowman LL, Qian Y, Castranova V, Ding M. Inhibition of activator protein-1, NF-κB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. J Biol Chem. 2005; 280(30):27888-95. doi:10.1074/jbc.M503347200
13. Liang N, Kitts DD. Amelioration of oxidative stress in Caco-2 cells treated with pro-inflammatory proteins by chlorogenic acid isomers via activation of the Nrf2-Keap1-ARE-signaling pathway. J Agric Food Chem. 2018; 66(42):11008-17. doi:10.1021/acs.jafc.8b03983
14. Yuan Y, Gong X, Zhang L, Jiang R, Yang J, Wang B, et al. Chlorogenic acid ameliorated concanavalin A-induced hepatitis by suppression of Toll-like receptor 4 signaling in mice. Int Immunopharmacol. 2017; 44: 97-104. doi:10.1016/j.intimp.2017.01.017
15. Gómez-Lechón MJ, Ponsoda X, O'Connor E, Donato T, Castell JV, Jover R. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. Biochem Pharmacol. 2003; 66(11): 2155-67. doi:10.1016/j.bcp.2003.08.003
16. Kakita H, Aoyama M, Nagaya Y, Asai H, Hussein MH, Suzuki M, Kato S, Saitoh S, Asai K. Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced phagocytosis of cultured microglia via nitric oxide production. Toxicol Appl Pharmacol. 2013; 268(2): 99-105. doi:10.1016/j.taap.2013.01.024
17. Masubuchi Y, Nakayama S, Horie T. Role of mitochondrial permeability transition in diclofenac-induced hepatocyte injury in rats. Hepatology. 2002; 35(3):544-51. doi:10.1053/jhep.2002.31871
18. Bao L, Li J, Zha D, Zhang L, Gao P, Yao T, et al. Chlorogenic acid prevents diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress and inflammation through modulation of the Nrf2/HO-1 and NF-κB pathways. Int Immunopharmacol. 2018; 54: 245-53. doi:10.1016/j.intimp.2017.11.021
19. Chen D, Pan D, Tang S, Tan Z, Zhang Y, Fu Y, et al. Administration of chlorogenic acid alleviates spinal cord injury via TLR4/NF κB and p38 signaling pathway anti inflammatory activity. Mol Med Rep. 2018; 17(1):1340-6. doi:10.3892/mmr.2017.7987
20. Lee YM, Shin DW, Lim BO. Chlorogenic acid improves symptoms of inflammatory bowel disease in Interleukin-10 knockout mice. J Med Food. 2020; 23(10):1043-53. doi:10.1089/jmf.2019.4621
21. Lee TK, Kang IJ, Kim B, Sim HJ, Kim DW, Ahn JH, Experimental pretreatment with chlorogenic acid

prevents transient ischemia-induced cognitive decline and neuronal damage in the hippocampus through anti-oxidative and anti-inflammatory effects. Molecules. 2020; 25(16):3578. doi:10.3390/molecules25163578
22. Shi A, Shi H, Wang Y, Liu X, Cheng Y, Li H, et al. Activation of Nrf2 pathway and inhibition of NLRP3 inflammasome activation contribute to the protective effect of chlorogenic acid on acute liver injury. Int Immunopharmacol. 2018; 54:125-30. doi:10.1016/j.intimp.2017.11.007
23. E Owumi S, K Olusola J, O Arunsi U, K Oyelere A. Chlorogenic acid abates oxido-inflammatory and apoptotic responses in the liver and kidney of Tamoxifen-treated rats. Toxicol Res. 2021; 10(2):345-53. doi:10.1093/toxres/tfab002
24. Cheng D, Zhang X, Tang J, Kong Y, Wang X, Wang S. Chlorogenic acid protects against aluminum toxicity via MAPK/Akt signaling pathway in murine RAW264. 7 macrophages. J Inorg Biochem. 2019; 190:113-20. doi:10.1016/j.jinorgbio.2018.11.001
25. Xue Y, Huang F, Tang R, Fan Q, Zhang B, Xu Z, et al. Chlorogenic acid attenuates cadmium-induced intestinal injury in Sprague-Dawley rats. Food Chem Toxicol. 2019; 133:110751 doi:10.1016/j.fct.2019.110751

How to Cite this Article:
Yazdani M H, Saghaei F, Karimi-Dehkordi M. Protective effect of chlorogenic acid on diclofenac-induced oxidative stress and inflammation in the liver of BALB/c mice. Feyz Med Sci J 2024; 28 (4) :375-382.
doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.4.375