Journal of Gorgan University of Medical Sciences

e-ISSN: 2008-4080 p-ISSN: 1562-4765

2023 / Vol 24 / No 4

OPEN ACCESS

Original Paper

Effect of *Spirulina platensis* on Changes in Liver Enzymes of Male BALB/c Mice Exposed to a High Dose of Acetaminophen

Elham Hajian Kelarijani (M.Sc)[1] , Maryam Mohadjerani (Ph.D)*[2]

1 MSc in Biochemistry, Department of Molecular and cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

2 Associate Professor, Department of Molecular and cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

Abstract

Background and Objective: Spirulina (*Spirulina platensis*) has numerous nutritional and therapeutic benefits. This experimental study aimed to investigate the effect of spirulina on changes in the levels of liver enzymes of male BALB/c mice exposed to a high dose of acetaminophen.

Methods: In this experimental study, 42 adult male BALB/c mice were divided into seven groups of six. The toxic dose of acetaminophen 600 mg/kg body weight was considered. The control group received only a standard diet and water. The sham group was gavaged with saline solution. The third to seventh groups were treated as: acetaminophen; spirulina 600 mg/kg/bw, spirulina 300 mg/kg/bw, spirulina 600 mg/kg/bw + acetaminophen, and spirulina 300 mg/kg/bw + acetaminophen, respectively. In all groups, mice were treated with acetaminophen and spirulina powder by gavage for 14 consecutive days. Twenty-four hours after receiving the last dose of medication and deprivation of food (the animals still had access to water), the animals were anesthetized and blood samples were taken from the heart. Activity of liver enzymes including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP) was measured by spectrophotometry. Protein concentration was determined by the Lowry method. Catalase activity was assessed using hydrogen peroxide. The amount of malondialdehyde was measured and the total antioxidant capacity was determined by FRAP method by reducing ferric to ferro ions.

Results: The levels of serum transaminases (ALT, AST, ALP) as well as the level of total antioxidant capacity and malondialdehyde of the acetaminophen-treated group increased significantly compared to the control group ($P<0.05$). The levels of these enzymes in the group treated with *S. platensis* 300 mg/kg/bw + acetaminophen decreased significantly compared to the group treated with acetaminophen ($P<0.05$). Catalase activity in the acetaminophen group was significantly decreased compared to the control group ($P<0.05$).In the group of *S. platensis* 300 mg/kg/bw + acetaminophen, catalase activity increased significantly compared to the acetaminophen group ($P<0.05$). The results of experiments in two groups of spirulina and acetaminophen showed that the active ingredients of the algae at a dose of 300 worked better than 600 mg per kg of body weight in response to oxidative stress.

Conclusion: Consuming 300 mg/kg of *S. platensis* along with a near toxic dose of acetaminophen increases resistance to oxidative stress and injuries caused by drug poisoning by affecting the activity of enzymes and the antioxidant defense system.

Keywords: *Spirulina*, Acetaminophen, Liver Toxicity, Antioxidants, Mice

***Corresponding Author:** Maryam Mohadjerani (Ph.D), E-mail: m.mohajerani@umz.ac.ir

Received 2 Mar 2022
Final Revised 23 Jul 2022
Accepted 24 Jul 2022
Published Online 5 Apr 2023

Cite this article as: Hajian Kelarijani E, Mohadjerani M. [Effect of *Spirulina platensis* on Changes in Liver Enzymes of Male BALB/c Mice Exposed to a High Dose of Acetaminophen]. J Gorgan Univ Med Sci. 2023; 24(4): 37-43. [Article in Persian]

© The author(s)

Owned: Golestan University of Medical Sciences **Publisher:** Deputy of Research and Technology

مجله دانشگاه علوم پزشکی گرگان

زمستان ۱۴۰۱ / دوره ۲۴ / شماره ۴ (پی در پی ۸۴)

دارای رتبه علمی -پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

e-ISSN: ۲۰۰۸-۴۰۸۰ p-ISSN: ۱۵۶۲-۴۷۶۵

با دسترسی آزاد

تحقیقی

اثر جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) بر تغییرات آنزیم‌های کبدی موش‌های نر نژاد BALB/c در معرض دوز بالای استامینوفن

الهام حاجیان کلاریجانی [۱]، دکتر مریم مهاجرانی *[۲]

[۱] کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

[۲] دانشیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: *جلبک اسپیرولینا (Spirulina platensis) دارای ارزش غذایی و درمانی زیادی است. این مطالعه به منظور تعیین اثر جلبک اسپیرولینا بر تغییرات آنزیم‌های کبدی موش‌های نر نژاد BALB/c در معرض دوز بالای استامینوفن انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی از ۴۲ سر موش نر بالغ نژاد BALB/c در هفت گروه شش‌تایی و دوز سمی استامینوفن ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن استفاده شد. گروه کنترل تنها رژیم غذایی استاندارد و آب دریافت نمود. گروه شم با محلول نمکی گاواژ شدند. گروه‌های سوم تا هفتم به ترتیب شامل موش‌های تیمارشده با استامینوفن ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن؛ پودر جلبک ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن؛ پودر جلبک ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن؛ پودر جلبک ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به اضافه استامینوفن و آخرین گروه با پودر جلبک ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به اضافه استامینوفن بودند. در همه گروه‌ها موش‌ها با دارو و پودر جلبک به روش گاواژ به مدت ۱۴روز متوالی تیمار شدند. تمامی حیوانات ۲۴ ساعت بعد از دریافت آخرین دوز داروها و محرومیت از غذا (دسترسی به آب آزاد بود)؛ بیهوش و از قلب آنها خونگیری انجام شد. فعالیت آنزیم‌های کبدی (آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز) به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. غلظت پروتئین به روش لوری تعیین شد. سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از آب اکسیژنه انجام شد. میزان مالون دی آلدئید اندازه‌گیری و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام به روش FRAP با احیاء یون Fe^{3+} (فریک) به یون Fe^{2+} (فرو) تعیین شدند.*

یافته‌ها: *سطح آنزیم‌های ترانس‌آمینازی سرمی (آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز) و همچنین میزان آنتی‌اکسیدان‌تام و سطح مالون‌دی‌آلدئید در گروه تیمارشده با استامینوفن، نسبت به گروه کنترل افزایش آماری معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$). همچنین سطح این آنزیم‌ها در گروه تیمار شده با جلبک ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به اضافه استامینوفن، کاهش آماری معنی‌داری نسبت به گروه تیمار شده با گروه استامینوفن داشت ($P<۰/۰۵$). سطح آنزیم کاتالاز در گروه استامینوفن، کاهش آماری معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P<۰/۰۵$) و در گروه جلبک ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به اضافه استامینوفن، افزایش آماری معنی‌داری نسبت به گروه استامینوفن مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). نتایج آزمایشات در دو گروه همزمان اسپیرولینا و استامینوفن نشان داد که مواد موثره جلبک در دوز ۳۰۰ بهتر از ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در پاسخ به استرس اکسیداتیو عمل نمود.*

نتیجه‌گیری: *مصرف جلبک اسپیرولینا ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به همراه استامینوفن در حدود دوز سمیت آن، با تاثیر بر فعالیت آنزیم‌ها و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی، باعث افزایش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو و صدمات ناشی از مسمومیت دارویی می‌گردد.*

واژه‌های کلیدی: *اسپیرولینا ، استامینوفن ، مسمومیت کبدی ، آنتی‌اکسیدان ، موش*

* نویسنده مسؤول: دکتر مریم مهاجرانی ، پست الکترونیکی m.mohajerani@umz.ac.ir

نشانی: بابلسر، پردیس دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، تلفن ۰۱۱-۳۵۳۰۲۴۵۵، نمابر ۳۵۳۰۲۴۵۰

وصول ۱۴۰۰/۱۲/۱۱ اصلاح نهایی ۱۴۰۱/۵/۱ پذیرش ۱۴۰۱/۵/۲ انتشار ۱۴۰۲/۱/۱۶

مقدمه

استامینوفن (پاراستامول / APAP) پرمصرف‌ترین داروی ضددرد و تب است که به آسانی و بدون نیاز به تجویز پزشک در دسترس عموم قرار دارد. بنابراین احتمال مسمومیت با آن زیاد است. استامینوفن هنگامی که در مقادیر زیاد به قصد خودکشی یا به طور تصادفی توسط کودکان مصرف شود؛ باعث نکروز شدید مرکز لوبولی در کبد می‌گردد. دریافت ۱۰ تا ۱۵ گرم از این دارو شواهد بالینی آسیب کبدی را آشکار می‌کند.[۱] بیش از ۵۰ درصد موارد نارسایی حاد کبد ثانویه به علت مسمومیت کبدی ناشی از دارو است که استامینوفن شایع‌ترین علت آن است.[۲] دستیابی به راهکارهای

مناسب برای پیشگیری و کاهش مسمومیت‌های احتمالی ناشی از مصرف استامینوفن کاملاً ضروری به نظر می‌رسد.[۳] متابولیسم استامینوفن به‌وسیله سیتوکروم P-450 فعال شده و تشکیل متابولیت سمی N–استیل–پارا بنزوکینون ایمین (NAPQI) را می‌دهد که برای ایجاد سمیت ضروری است. بعد از مصرف دوزهای درمانی استامینوفن، متابولیت NAPQI به طور موثری با گلوتاتیون کونژوگه شده و سم‌زدایی می‌گردد؛ اما در صورت مصرف بیش از حد، گلوتاتیون به حدود بیش از ۹۰درصد کاهش می‌یابد و با پایان یافتن منابع گلوتاتیونی، NAPQI به پروتئین‌های سلولی از جمله پروتئین‌های میتوکندری متصل می‌شود. به نظر می‌رسد استرس اکسیداتیو در سمیت استامینوفن دخیل است. طی تشکیل NAPQI توسط سیتوکروم P-450 آنیون سوپراکسید تشکیل می‌شود که همراه با دیسموتاسیون سبب تشکیل هیدروژن پراکسید می‌شود و هیدرون پراکسید نیز به نوبه خود سبب پراکسیداسیون لیپید و استرس اکسیداتیو خواهد شد.[۴]

استفاده از ریزجلبک‌ها به عنوان دارو قدمتی حتی بیشتر از تحقیقات سیستماتیک بر روی گیاهان میکروسکوپی دارد.[۵] جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) سیانوباکتری است که در کشورهای متعددی به عنوان ماده ارزشمند تجاری به دلیل ارزش غذایی، خواص درمانی، پروتئین و ویتامین فراوان شناخته شده است.[۶] گونه‌های مختلف *S.platensis* دارای اثرات بیولوژیکی متعددی از جمله اثرات ضدالتهابی[۷]، ضدتوموری[۸]، محافظت کننده کبدی[۹]، ضدمیکروبی[۱۰]، تقویت کننده سیستم ایمنی[۱۱]، حفاظت کننده از اثرات سمی فلزات سنگین[۱۲] و اثرات آنتی‌اکسیدانی[۱۳] است. برای فایکوسیانین موجود در *S. platensis* اثرات آنتی‌اکسیدانی در شرایط آزمایشگاهی و در شرایط in vivo اثرات ضدالتهابی، حفاظت عصبی و محافظت کبدی گزارش شده است.[۱۴] خواص آنتی‌اکسیدانی فایکوسیانین به فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد و کلاته کردن فلز نسبت داده شده است.[۱۵] فایکوسیانین به تصفیه خون، غلبه بر آنمی، یبوست، ترمیم زخم‌ها، تنظیم سوخت‌وساز بدن و سم‌زدایی کمک می‌کند. این ماده حاوی گلیکوژن است که قادر به تولید سریع انرژی است؛ بدون این که موجب کاهش قندخون گردد.[۱۶] همچنین فلاوونوئید، بتا–کاروتن، ویتامین آلفا–توکوفرول موجود در *S.platensis* تا حد زیادی در فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی حاصل از این ریزجلبک شرکت می‌کنند.[۱۷]

مصرف غذایی مکمل اسپیرولینا تقویت سیستم ایمنی ذاتی، بهبود چربی خون، کاهش توده بدن، بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی و تقویت اثرات ضدالتهابی و ضدپرفشاری خون را در مطالعات انسانی نشان داده است.[۱۸] با اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های سیتوپلاسمی آزاد شده به جریان خون (آلانین ترانس آمیناز، آسپارتات ترانس آمیناز و آلکالین فسفاتاز) مقدار آسیب و سمیت کبدی ناشی از استامینوفن مشخص می‌گردد.[۱۹] مصرف مقادیر زیاد داروی استامینوفن یکی از رایج‌ترین علل مسمومیت کبدی حاد در دنیا است. این مطالعه به منظور تعیین اثر جلبک اسپیرولینا بر تغییرات آنزیم‌های کبدی موش‌های نر نژاد BALB/c در معرض دوز بالای استامینوفن انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۴۲ سر موش نر بالغ نژاد BALB/c با محدوده وزنی ۳۵–۲۵ گرم تهیه شده از حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی مازندران در گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی دانشکده علوم پایه دانشگاه مازندران طی سال ۱۳۹۷ انجام شد.

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه مازندران (IR.UMZ.REC.1397.16) قرار گرفت.

پروتکل کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. حیوانات در قفس جداگانه و در اتاق حیوانات دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه مازندران در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت تاریکی–روشنایی و دمای ۲۸–۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حیوانات دسترسی کامل به آب شهری و غذای نرمال داشتند. به منظور سازگاری با محیط، آزمایش‌ها یک هفته بعد از انتقال موش‌ها به آزمایشگاه صورت گرفت.

پودر استامینوفن از شرکت تهران دارو خریداری شد. دوز تعیین شده استامینوفن و مدت زمان تیمار بر اساس مطالعات قبلی[۲۰و۲۱] تجویز شد. پودر جلبک اسپیرولینا از شرکت آرین‌گستر خریداری شد.

اسپکتروفتومتر مورد استفاده، میکروریدر Biotek Epoch، هموژنایزر IKA T25 ساخت کشور آلمان، سانتریفیویوژ یخچال‌دار 3K30 سیگما–آلدریچ، ترازوی ۰/۰۰۰۱ کرن آلمان و کیت‌های تشخیص کمی تهیه شده از شرکت پارس آزمون بودند.

موش‌ها به صورت اتفاقی در ۷ گروه ۶ تایی به شرح زیر تقسیم شدند.

گروه اول (کنترل): تنها رژیم غذایی استاندارد و آب دریافت کردند.

گروه دوم (شم): با محلول نمکی به صورت گاواژ تیمار شدند.

گروه سوم (تیمار اول، Ace): دریافت کننده استامینوفن ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاواژ.

گروه چهارم (تیمار دوم، Sp600): دریافت کننده *S. platensis* ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاواژ.

گروه پنجم (تیمار سوم، Sp300): دریافت کننده *S. platensis* ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاواژ.

گروه ششم (تیمار چهارم، Sp600+Ace): دریافت کننده

S. platensis ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و پس از گذشت یکساعت دریافت کننده استامینوفن به صورت گاواژ.

گروه هفتم (تیمار پنجم، Sp300+Ace): دریافت کننده *S. platensis* ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و پس از گذشت یکساعت دریافت کننده استامینوفن به صورت گاواژ.

حیوانات گروه‌های تیمار به مدت ۱۴روز متوالی در ساعت ۸ تا ۱۰ صبح به روش خوراکی (گاواژ) تیمار شدند.

همه حیوانات در طول مدت آزمایش قبل از تیمار وزن شده و مقدار داروها براساس میلی‌گرم برکیلوگرم وزن حیوان تجویز شد. همه حیوانات طی مدت تیمار دسترسی آزاد به غذا و آب داشتند. تمامی حیوانات ۲۴ ساعت بعد از دریافت آخرین دوز داروها و محرومیت از غذا (دسترسی به آب آزاد بود)؛ بیهوش و از قلب آنها خونگیری انجام شد. سپس کالبدگشایی شدند و بافت کبد به منظور انجام آزمایشات جدا و تا مرحله انجام آزمایش به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کبدی در پلاسما، آمینوترانسفرازهای سرمی شامل آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) با استفاده از کیت تشخیص کمی (پارس آزمون) در اسپکتروفتومتر میکروریدر اندازه‌گیری شدند. میزان فعالیت آنزیم‌ها بر حسب واحد بین‌المللی در لیتر (IU/L) ثبت و سپس تمامی داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شدند.

برای تعیین غلظت پروتئین ابتدا غلظت پروتئین در واحد حجم به‌روش لوری به‌دست آمد.[۲۲] این روش بر اساس تفاوت در جذب نور در طول موج ۷۲۰ نانومتر است.

به منظور تعیین غلظت پروتئین نمونه‌ها، از سوپرناتانت بافت کبد هموژن شده با هموژنایزر، در حجم‌های مختلف استفاده گردید و سپس به کمک دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۷۲۰ نانومتر در مقابل محلول شاهد، جذب نقطه‌ای آنها خوانده شد. پروتئین هر نمونه با توجه به فرمول خط به‌دست آمده از نمودار استاندارد (BSA) محاسبه شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Aebi استفاده شد.[۲۳] واکنش با افزودن سوبسترا شروع و به مدت ۶۰ ثانیه در طول موج ۲۴۰ nm و دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. فعالیت آنزیم کاتالاز براساس قانون بیرلامبرت (A=εLC) محاسبه و به‌صورت U/g tissue گزارش شد.

برای تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدها، بافت کبد در بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار و pH=7) هموژن شد. براساس میزان مالون دی آلدئید (MDA) به روش Buege و Aust اندازه‌گیری شد.[۲۴] براساس این روش مالون‌دی‌آلدئید با تیوباربیتوریک اسید (TBA) تحت شرایط دمایی بالا (۱۰۰-۹۰) و اسیدی با معرف (TBA) واکنش داده، کمپلکس حاصل از MDA-TBA محصول صورتی رنگ است که مقدار جذب آن به وسیله اسپکترومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی تام به روش FRAP بر طبق روش Benzie و Strain انجام شد.[۲۵] این روش براساس قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها در جهت احیاء یون Fe 3+ (فریک) به یون Fe2+ (فرو) در حضور ماده‌ای تحت عنوان ۲، ۴، ۶ تریس (۲- پیریدیل) اس – تریازین (TPTZ) است. کمپلکس Fe 3+ + TPTZ، آبی‌رنگ با ماکزیمم جذب ۵۹۳ نانومتر است. قدرت احیاکنندگی نمونه‌ها با کمک منحنی استاندارد محلول سولفات آهن (فرو) به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-19 تجزیه و تحلیل شدند. نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شد. برای محاسبات آماری و مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون توکی (Tukey) استفاده شد. سطح معنی‌داری همه آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سطح آنزیم‌های ترانس‌آمینازی سرم (ALT, AST, ALP) گروه تیمار شده با استامینوفن، نسبت به گروه کنترل افزایش آماری معنی‌داری یافت (P<۰/۰۰۱). همچنین سطح این آنزیم‌ها در گروه تیمار شده پنجم (Sp300+Ace) کاهش آماری معنی‌داری نسبت به گروه تیمار شده با استامینوفن نشان داد (P<۰/۰۰۱) (جدول یک).

سطح مالون‌دی‌آلدئید و اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی‌تام در گروه دریافت کننده استامینوفن در مقایسه با گروه کنترل افزایش آماری معنی‌دار یافت (P<۰/۰۰۱) و همچنین در گروه تیمار شده

جدول ۱ : مقایسه میانگین و انحراف معیار مقادیر آنزیم‌های کبدی (ALT, AST, ALP) و معیارهای توان آنتی‌اکسیدانی (MDA، FRAP و CAT)

گروه‌ها	MDA (nmol/gTissue)	TAC (µM/gTissue)	CAT (U/gTissue)	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)
کنترل	۲۴۱/۰۹۸±۵/۸۶۷	۴۲۶/۴۴۶±۲/۶۸۹	۱۸۴/۸۰۳±۸/۴۰۷	۲۹۸/۳۳۳±۷/۰۸۹	۵۱۷/۳۳۳±۷/۵۲۷	۱۱۴/۱۶۶±۵/۱۱۵
شم	۲۴۲/۲۵۸±۶/۲۶۲	۴۳۱/۳۸۸±۴۵۷۴	۱۷۰/۲۷۹±۸/۷۲۳	۳۰۹/۸۳۳±۱۰/۱۴۷	۵۲۲/۱۶۶±۷/۳۲۲	۱۱۵/۵۰۰±۴/۷۶۴
تیمار اول، Ac)	۵۳۸/۴۱۷±۱۰/۶۲۵ **	۵۴۶/۵۳۱±۵/۸۵۹ **	۸۰/۶۲۵±۷/۳۴۸ **	۴۴۹/۰۰۰±۶/۴۸۰ **	۷۲۳/۶۶۶±۸/۲۳۸ **	۱۶۷/۶۶۶±۶/۳۷۷ **
تیمار دوم، Sp60)	۴۸۰/۴۴۲±۱۷/۱۰۴ ** #	۴۵۵/۶۲۸±۱۰/۳۰۴ ** #	۱۳۷/۲۷۳±۱۱/۷۷۷ * #	۴۰۴/۸۳۳±۱۰/۸۳۳ ** #	۶۱۶/۵۰۰±۹/۴۸۱ ** #	۱۳۵/۶۶۶±۸/۰۴۱ ** #
تیمار سوم، Sp30)	۱۳۵/۹۶۲±۱۳/۵۰۸ ** ##	۴۲۵/۲۴۹±۲/۲۸۰ #	۲۱۶/۲۹۲±۸/۴۹۴ * #	۲۹۴/۰۰۰±۱۷/۵۴۹ #	۲۱۵/۶۶۶±۱۱/۲۲۰ #	۱۱۴/۵۰۰±۳/۳۹۱ #
تیمار چهارم، Sp600+Ac)	۵۸۰/۷۸۵±۱۳/۰۴۹ ** ##	۴۷۷/۶۳۵±۶/۵۴۰ ** #	۷۶/۱۳۵±۱۱/۴۹۷ *	۴۳۲/۶۶۶±۱۷/۶۴۵ *** #	۶۳۹/۰۰۰±۱۲/۵۵۳ ** #	۱۵۳/۶۶۶±۳/۵۰۲ ** #
تیمار پنجم، Sp300+Ace	۲۷۷/۷۹۷±۱۸/۶۳۴ #	۴۴۹/۳۳۱±۳/۴۱۵ ** #	۱۶۳/۹۰۵±۷/۴۴۲ * #	۳۱۹/۸۳۳±۹/۹۴۸ ***	۵۳۶/۵۰۰±۱۵/۴۷۵ # ***	۱۲۱/۸۳۳±۳/۴۸۸ #

* P<۰/۰۱ ، ** P<۰/۰۰۱ ، *** P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل

P<۰/۰۰۱ ، ## P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه استامینوفن

پنجم (Sp300+Ace) نسبت به گروه دریافت کننده استامینوفن کاهش آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۱).

سطح آنزیم‌های ترانس‌آمینازی سرم (ALT, AST, ALP) گروه تیمار چهارم (Sp600+Ace) افزایش آماری معنی‌داری نسبت به گروه تیمار شده پنجم (Sp300+Ace) داشت (P<۰/۰۵).

مقدار مالون دی آلدهید در گروه تیمار شده پنجم (Sp300+Ace) کمتر از گروه استامینوفن و گروه تیمار چهارم (Sp600+Ace) به دست آمد (P<۰/۰۰۱) (جدول یک).

سطح آنتی‌اکسیدانی کل در هر دو گروه استامینوفن و جلبک نسبت به گروه استامینوفن افزایش آماری معنی‌داری نشان نداد. سطح آنزیم کاتالاز در گروه استامینوفن، کاهش آماری معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۰۱) و در گروه تیمار شده پنجم (Sp300+Ace) افزایش آماری معنی‌داری نسبت به گروه استامینوفن مشاهده شد (P<۰/۰۰۱) (جدول یک).

نتایج سطح آنزیم‌های سرمی کبد موش (ALT, AST, ALP) و نیز غلظت مالون‌دی‌آلدئید و کاتالاز بافت کبد، بر اثر مصرف استامینوفن نسبت به گروه کنترل تغییرات چشمگیری داشت (جدول یک).

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، سطح سرمی آنزیم‌های کبد موش‌های مورد مطالعه و نیز غلظت مالون‌دی‌آلدئید و کاتالاز بافت کبد، بر اثر مصرف استامینوفن نسبت به گروه کنترل تغییرات چشمگیری داشت که می‌تواند به دلیل آسیب سلول‌های کبدی بر اثر مسمومیت ناشی از دوز سمی استامینوفن و به دنبال آن نشت آنزیم‌های کبدی به خون[۲۶] و همین‌طور تغییرات معنی‌دار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با گروه کنترل باشد. نکروز سلول‌های کبدی و افزایش در فعالیت آنزیم‌های ترانسفرازی که با صدمه غشای پلاسمایی رخ می‌دهد؛ در انسان و برخی از حیوانات پس از مصرف بیش از حد استامینوفن مشاهده شده است.[۲۶]

در مطالعه ما، با مصرف استامینوفن مقدار آنتی‌اکسیدان‌ها و مقدار مالون‌دی‌آلدئید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد. این افزایش می‌تواند به علت تخلیه گلوتاتیون کبدی ناشی از مصرف استامینوفن باشد.[۲۷و۲۸] در مطالعه حاضر، علایم سمیت کبدی در موش‌ها با تجویز دوز سمی استامینوفن ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدون، با کاهش آماری معنی‌دار در مقدار کاتالاز و افزایش آماری معنی‌دار در غلظت مالون‌دی‌آلدئید حاصل از پراکسیداسیون‌لیپیدها و مقادیر در تست FRAP در مقایسه با گروه کنترل، بروز کرد. در واقع بعد از مصرف استامینوفن، تغییرات معنی‌دار شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی، آنزیمی (کاتالاز) و غیرآنزیمی (آنتی‌اکسیدان‌تام و مالون‌دی‌آلدئید) در بافت کبدی اتفاق افتاد. افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید و عدم تغییر چشمگیر سطح آنتی‌اکسیدان‌تام، می‌تواند نشان‌دهنده تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو و آسیب و نکروز کبدی بر اثر مسمومیت با استامینوفن و دوز ۶۰۰ جلبک نسبت به ۳۰۰ باشد. مطالعات نشان داده استفاده از عصاره متانولی برگ گیاه چای گربه (*Orthosiphon stamineus*) می‌تواند از آسیب سلولی بر اثر استامینوفن جلوگیری به عمل آورد و اثر رفع مسمومیت ناشی از جلوگیری از تخلیه مخازن گلوتاتیون و مهار فعالیت هیدروکسیلازهای سلولی وابسته به سیتوکروم P450 کبدی است.[۲۹] در تحقیق حاضر نیز تیمار موش‌ها با استامینوفن و اسپیرولینا (Sp300+Ace) به طور قابل توجهی سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های سرمی کبد و همچنین افزایش فعالیت کاتالاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌تام و کاهش میزان پراکسیداسیون‌لیپیدها نسبت به گروه دریافت کننده استامینوفن بود و این تغییرات معنی‌دار بودند. می‌توان نتیجه گرفت که تیمار موش‌ها با جلبک اسپیرولینا، منجر به افزایش توان آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه حفظ ذخائر گلوتاتیون کبد و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدها شده است. به طوری که گاواژ موش‌ها با این جلبک با دوز پایین قبل از تیمار با استامینوفن توانست تا حدود زیادی (نزدیک به کنترل) از آسیب حاد ناشی از استامینوفن جلوگیری کند. در واقع این جلبک دارای متابولیت‌هایی است که نشان‌دهنده توانایی آن در حفاظت سلول‌های کبدی در مقابل مسمومیت است.

در مطالعه حاضر که نتیجه آن اثرات قوی مهار مسمومیت با استامینوفن توسط جلبک *S.platensis* با دوز پایین است؛ در هماهنگی کامل با دیگر گزارشاتی است که احتمالاً این اثر مربوط به ترکیبات آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنولی، فلاونوئید، فایکوسیانین و کاروتنوئیدهای موجود در این جلبک است که قادر به افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول می‌گردد.[۳۰] آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند غشاهای سلولی و ترکیبات مختلف موجود زنده را در مقابل اکسیدان‌ها حفظ کنند. ساز و کار عمل این ترکیبات جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد، افزایش الکترون به این اکسیدان‌ها و غیرفعال کردن آنها است که متعاقباً باعث پایداری غشاء سلولی و به دنبال آن کاهش مقادیر سرمی آنزیم‌های کبدی (ALP, AST, ALT) می‌شوند. این توانایی در مورد این جلبک با توجه به وجود مقادیر قابل توجه ترکیبات فنولی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالای آن غیرقابل چشم‌پوشی است.[۳۱و۳۲] جلبک‌های دریایی همچون گیاهان زمینی در معرض ترکیبی از نور و اکسیژن هستند که منجر به تشکیل رادیکال‌های آزاد و عوامل اکسیدکننده قوی می‌گردند. عدم وجود آسیب اکسیداتیو در اجزای ساختاری این جلبک‌ها (مانند اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه) نشان از پایداری آنها نسبت به اکسیداسیون و داشتن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنهاست.

تحقیقات بسیاری توان آنتی‌اکسیدانی جلبک‌های دریایی را گزارش نموده‌اند.[۳۳] بهترین ویژگی تعریف شده برای فلاونوئیدها کارکرد آنها به عنوان آنتی‌اکسیدان است.[۳۴] خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در این جلبک، با نتایج مطالعه ما، کاملاً همخوانی دارد. زیرا میزان پارامترهای بیوشیمیایی مورد مطالعه علاوه بر این که در گروه درمان (Sp300 + Ace) نسبت به گروه بیمار (Ace) بسیار بهتر و در حد نرمال بود؛ در گروه Sp300 تغییرات سطح آنزیم‌های ALT وAST و ALP و آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، توان TAC و میزان MDA در حد گروه کنترل یا حتی بهتر از آن بود. در مطالعه مشترکی که به وسیله محققین چینی و کانادایی بر روی فلور میکروبی روده موش‌هایی که با دو دوز جلبک گاواژ شدند؛ گزارش گردید اسپیرولینا (۱/۵ گرم بر کیلوگرم) توانست دو گونه باکتریایی را بر خلاف آنهایی که با دوز بالا (۳ گرم بر کیلوگرم) تیمار شدند؛ افزایش دهد. این گونه‌های باکتریایی در ارتباط مستقیم با چاقی، بیماری التهابی روده و سرطان کولورکتال هستند. بدین ترتیب، بسته به کاربرد درمانی، تنظیم دوز سوسپانسیون اسپیرولینا ضرورت دارد.[۱۸] تجویز عصاره استخراج شده از این جلبک قادر به حفاظت کبدی بود و باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی و پراکسیداسیون لیپیدها و همچنین افزایش غلظت گلوتاتیون نسبت به گروه تیمارشده با استامینوفن شده است[۱۶] که با نتایج مطالعه حاضر برای گروه‌های بیمار و درمان شده با دوز پایین مطابقت دارد. وجود انواع متابولیت‌های ثانویه با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و جاروب رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن از جمله پراکسید هیدروژن می‌تواند عامل موثری برای رفع مسمومیت ناشی از مصرف زیاد استامینوفن در کبد باشد؛ اما برای مصرف دوز بالای آن (Sp600 + Ace) نتیجه خوبی حاصل نشد. به عبارتی تیمار با دوز بالا در موش‌ها (Sp600 و Sp600+Ace) باعث افزایش معنی‌دار آنزیم‌های کبدی و همچنین پارامترهای اکسیدانی شد که می‌تواند نتیجه آسیب بافت کبدی باشد.

اثر محافظتی اسپیرولینا با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن موش در کاهش سطح آنزیم‌های ترانس‌آمینازی کبدی نقش مؤثری داشت. در این تیمار، میزان این آنزیم‌ها تا حد نرمال پایین آورده شده که این نتیجه می‌تواند به خاطر اثر مثبت مصرف این جلبک بر عملکرد بهتر آنزیم‌ها و در نتیجه محافظت بافت کبدی باشد. همچنین در بررسی اثر آنتی‌آکسیدانی بافت کبد، کاهش معنی‌داری در سطح مالون‌دی‌آلدئید و افزایش در ظرفیت آنتی‌آکسیدانی‌تام و همین‌طور میزان کاتالاز مشاهده شد که نشان می‌دهد این جلبک در بهبود آسیب بافت کبدی حاد ناشی از استامینوفن به صورت مطلوبی مؤثر بوده است. بنابراین مصرف اسپیرولینا با اثر بر عملکرد سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن، می‌تواند آن را در مقابل استرس‌های اکسیداتیو مقاوم‌تر کند و با یک استراتژی پیشگیرانه می‌تواند بافت‌های بدن را از آسیب‌های دارویی و شیمیایی محافظت کند. بنابراین بررسی دقیق و یافتن دوز درمانی مناسب به همراه مطالعات دقیق هیستوپاتولوژیک کبد برای استفاده از این جلبک با ارزش پیشنهاد می‌گردد. همچنین هماهنگی نتایج این مطالعه با منابع کتابخانه‌ای دیگر نشان داد محتوی ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و متابولیت‌های ثانویه دیگر در جلبک اسپیرولینا موجب ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی و توانایی مهار رادیکال‌های آزاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف جلبک اسپیرولینا ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به همراه استامینوفن در حدود دوز سمیت آن، با تاثیر بر فعالیت آنزیم‌ها و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی، باعث افزایش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو و صدمات ناشی از مسمومیت دارویی می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم الهام حاجیان کلاریجانی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی (شماره ۹۵۱۵۴۳۲۱۲۰۹) از دانشکده علوم پایه دانشگاه مازندران بود. بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه مازندران تشکر می‌نماییم. بین نویسندگان تضاد منافعی وجود ندارد.

References

1. Ciferri O. Spirulina, the edible microorganism. Microbiol Rev. 1983 Dec; 47(4): 551-78. doi: 10.1128/mr.47.4.551-578.1983
2. Chang CY, Schiano TD. Review article: drug hepatotoxicity. Aliment Pharmacol Ther. 2007 May; 25(10): 1135-51. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03307.x
3. Karazhiyan H, Razavi SMA, Phillips GO, Fang Y, Al-Assaf S, Nishinari K, et al. Rheological properties of Lepidium sativum seed extract as a function of concentration, temperature and time. Food Hydrocolloids. 2009 Dec; 23(8): 2062-68. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.03.019
4. Walker V, Mills GA, Anderson ME, Ingle BL, Jackson JM, Moss CL, et al. The acetaminophen metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) inhibits glutathione synthetase in vitro; a clue to the mechanism of 5-oxoprolinuric acidosis? Xenobiotica. 2017 Feb; 47(2): 164-75. doi: 10.3109/00498254.2016.1166533
5. Hoppe HA, Levring T, Tanaka Y. Marine algae in pharmaceutical science. 1st ed. Berlin: De Gruyter. 1979; pp: 25-119.
6. Khan Z, Bhadouria P, Bisen PS. Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. Curr Pharm Biotechnol. 2005 Oct; 6(5): 373-79. doi: 10.2174/138920105774370607
7. Reddy CM, Bhat VB, Kiranmai G, Reddy MN, Reddanna P, Madyastha KM. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycocyanin, a biliprotein from Spirulina platensis. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Nov; 277(3): 599-603. doi: 10.1006/bbrc.2000.3725
8. Mittal A, Kumar PV, Banerjee S, Rao AR, Kumar A. Modulatory potential of Spirulina fusiformis on carcinogen metabolizing enzymes in Swiss albino mice. Phytother Res.

1999 Mar; 13(2): 111-14. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199903)13:2<111::AID-PTR386>3.0.CO;2-2

9. Sharma MK, Sharma A, Kumar A, Kumar M. Spirulina fusiformis provides protection against mercuric chloride induced oxidative stress in Swiss albino mice. Food Chem Toxicol. 2007 Dec; 45(12): 2412-19. doi: 10.1016/j.fct.2007.06.023

10. Sharma MK, Patni R, Kumar M, Kumar A. Modification of mercury-induced biochemical alterations in blood of Swiss albino mice by Spirulina fusiformis. Environ Toxicol Pharmacol. 2005 Sep; 20(2): 289-96. doi: 10.1016/j.etap.2005.02.006

11. Qureshi MA, Garlich JD, Kidd MT. Dietary Spirulina platensis enhances humoral and cell-mediated immune functions in chickens. Immunopharmacol Immunotoxicol. 1996 Aug; 18(3): 465-76. doi: 10.3109/08923979609052748

12. Anyanwu BO, Orish CN, Ezejiofor AN, Nwaogazie IL, Akaranta O, Orisakwe OE. Multi-organ protective effect of Costus afer on low concentration toxic metal mixture in albino rats. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2021 Apr; 13(2): 52-68.

13. Upasani CD, Balaraman R. Protective effect of Spirulina on lead induced deleterious changes in the lipid peroxidation and endogenous antioxidants in rats. Phytother Res. 2003 Apr; 17(4): 330-34. doi: 10.1002/ptr.1135

14. Romay Ch, González R, Ledón N, Remirez D, Rimbau V. C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. Curr Protein Pept Sci. 2003 Jun; 4(3): 207-16. doi: 10.2174/1389203033487216

15. Bermejo P, Piñero E, Villar ÁM. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of Spirulinaplatensis. Food Chem. 2008 Sep; 110(2): 436-45. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.02.021

16. Rezaee K, Kalantari M, Hashemi Ravan M, Golmakani MT, Faragi N, Faragi D. Optimization of Various Conditions (Temperature, Light Intensity Change, Culture Methods Batch, Fed Batch and kind of Carbon Source) for Phycocyanin Maximum Production by the Microalgae Spirulina Platensis(Arthrospira). Journal of Food Technology and Nutrition. 2014; 12(1): 91-100.

17. Wang L, Pan B, Sheng J, Xu J, Hu Q. Antioxidant activity of Spirulina platensis extracts by supercritical carbon dioxide extraction. Food chemistry. 2007 Jan; 105(1): 36-41. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.03.054

18. Hu J, Li Y, Pakpour S, Wang S, Pan Z, Liu J, et al. Dose Effects of Orally Administered Spirulina Suspension on Colonic Microbiota in Healthy Mice. Front Cell Infect Microbiol. 2019 Jul; 9: 243. doi: 10.3389/fcimb.2019.00243

19. Zeenat M, Sharmin S, Islam MT, Sujan KM, Haque MI, Islam MK. Effect of Spirulina (Arthrospira platensis) on blood uric acid, hemoglobin and kidney histo-texture of mice treated with acetaminophen. Bangladesh Journal of Veterinary Medicine (BJVM). 2019 Jul; 17(1): 71-5. doi: 10.33109/bjvmjj19lam1

20. Abdel-Daim M, Abushouk AI, Reggi R, Yarla NS, Palmery M, Peluso I. Association of antioxidant nutraceuticals and acetaminophen (paracetamol): Friend or foe? J Food Drug Anal. 2018 Apr; 26(2S): S78-S87. doi: 10.1016/j.jfda.2017.11.004

21. Mousavi G, Hasanzadeh S, Malekinejad H, Najafi G. [Protective effects of Spirulina (Arthrospira Platensis) on In Vitro Fertilization (IVF) and embryo development in female mice treated with cyclophosphamide]. JABS. 2018; 8(2): 785-94. [Article in Persian]

22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov; 193(1): 265-75.

23. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984; 105: 121-26. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3

24. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1978; 52: 302-10. doi: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6

25. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem. 1996 Jul; 239(1): 70-76. doi: 10.1006/abio.1996.0292

26. Kharpate S, Vadnerkar G, Jain D, Jain S. Evaluation of hepatoprotective activity of ethanol extract of Ptrospermum acerifolium ster leaves. Indian J Pharm Sci. 2007; 69(6): 850-52.

27. Masella R, Di Benedetto R, Varì R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J Nutr Biochem. 2005 Oct; 16(10): 577-86. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.013

28. Winkler BS, Orselli SM, Rex TS. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. Free Radic Biol Med. 1994 Oct; 17(4): 333-49. doi: 10.1016/0891-5849(94)90019-1

29. Mohamed Saleem TS, Madhusudhana Chetty C, Ramkanth S, Rajan VST, Mahesh Kumar K, Gauthaman K. Hepatoprotective Herbs – A Review. International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences. 2010; 1(1): 1–5.

30. Venkataraman L. Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell Biology and Biotechnologym, edited by Avigad Vonshak. Journal of Applied Phycology. 1997; 9: 295-96. doi: 10.1023/A:1007911009912

31. Heidarian E, Jafari-Dehkordi E, Seidkhani-Nahal A. Effect of garlic on liver phosphatidate phosphohydrolase and plasma lipid levels in hyperlipidemic rats. Food Chem Toxicol. 2011 May; 49(5): 1110-114. doi: 10.1016/j.fct.2011.02.001

32. Urquiaga I, Leighton F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biol Res. 2000; 33(2): 55-64. doi: 10.4067/s0716-97602000000200004

33. Matanjun P, Mohamed S, Mustapha NM, Muhammad K, Ming CH. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. J Appl Phycol. 2008; 20: 367-73. doi: 10.1007/s10811-007-9264-6

34. Zakaria NA, Ibrahim D, Suleiman SF & Supardy A. Assessment of antioxidant activity, total phenolic content and in vitro toxicity of Malaysian red seaweed, Acanthophora spicifera. Journal of Chemical and pharmaceutical Research. 2011; 3(3): 182-91