

تأثیر تیموکینون بر بهبود پروفایل لیپیدی و آنزیم‌های کبدی در موش‌های آزمایشگاهی کوچک مبتلا به کبد چرب

لیلا جعفری نیا^۱، سید علی حائری روحانی^۲ و پریچهره یغمایی^{۳*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی (بیوفیزیک، بیوشیمی و علوم جانوری)، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استاد، گروه زیست‌شناسی (بیوفیزیک، بیوشیمی و علوم جانوری)، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- نویسنده مسئول، استاد، گروه زیست‌شناسی (بیوفیزیک، بیوشیمی و علوم جانوری)، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، پست الکترونیک: pr.yaghmaei@gmail.com

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶

تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶

چکیده

کبد چرب غیرالکلی در حال شیوع بین افراد دارای سبک زندگی شهری می‌باشد که می‌تواند به استتاتوز کبدی پیشرفت کند. تیموکینون، یک آنتی‌اکسیدان قوی و مورد توجه طب سنتی، بر روی کبد چرب القا شده در موش‌های آزمایشگاهی کوچک مورد بررسی قرار گرفت. ۴۰ موش به چهار گروه (کنترل سالم، حلال، گروه تجربی ۱ و ۲ به ترتیب تحت تیمار با دوزهای ۵ و ۱۰ mg/kg تیموکینون به مدت ۲۸ روز و تزریق داخل صفاقی) تقسیم شدند، همگی به جز گروه کنترل سالم طی مدت ۴ هفته تحت رژیم پرچرب قرار گرفتند. در انتهای آزمایش نمونه‌های بافتی و سرمی موش‌ها برای انجام آنالیزهای بیوشیمیایی و بافت‌شناسی جمع‌آوری شد. نتایج نشان داد که میزان تری‌گلیسیرید، VLDL، بیلی‌روبین، فسفولیپید، کلسترول، HOMA و آلانین‌آمینوترانسفراز در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه حلال ($P < 0.001$)، انسولین، آسپاراتات آمینوترانسفراز و LDL ($P < 0.01$) و گلوکز ($P < 0.05$) کاهش داشت. البته میزان آلکالین فسفاتاز و لپتین کاهش معنی‌داری نداشت. میزان آدیپونکتین افزایش معنی‌داری را ($P < 0.001$) نشان داد. HDL نیز افزایش غیر معنی‌داری داشت. در بررسی‌های هیستولوژیکی، آسیب‌های بافتی به میزان قابل توجهی بهبود یافته بود. طبق آزمایش‌ها، تیموکینون می‌تواند مقاومت انسولینی، پروفایل لیپیدی و آنزیم‌های کبدی را در موش‌های مبتلا به کبد چرب بهبود ببخشد.

واژه‌های کلیدی: تیموکینون، رژیم پرچرب، کبد چرب غیرالکلی، کلسترول.

مقدمه

سلول‌های کبدی ایجاد شده و با تخریب سلول‌های کبدی به بیماری مزمن و غیر قابل برگشت سیروز منتهی می‌شود. اغلب افراد در سنین میانسالی به بیماری کبد چرب مبتلا می‌شوند. بیشتر بیماران مبتلا به کبد چرب، از افزایش وزن و چاقی شکمی رنج می‌برند و همچنین مبتلا به چربی خون و

شایعترین بیماری مزمن کبدی که تاکنون در سراسر جهان شناخته شده است کبد چرب غیرالکلی است. بیماری کبد چرب در مرحله خفیف به صورت تجمع چربی در سلول‌های کبدی آغاز می‌شود و در بعضی بیماران التهاب

مطالعه به بررسی میزان تأثیر تیموکینون بر پارامترهای بیوشیمیایی و هیستولوژیکی در مدل کبد چرب القاء شده با کلسترول در موش‌های آزمایشگاهی کوچک پرداخته است.

مواد و روش‌ها

یودر تیموکینون از شرکت سیگما آلدریج تهیه شد. کلیه معرف‌ها و کیت‌های بکار رفته در این تحقیق ساخت کمپانی زیست شیمی (ZistChimi شرکت شیمیایی، تهران، ایران) می‌باشد. برای سنجش آدیپونکتین از کیت الیزای موشی (کمپانی R&D آمریکا) و برای ارزیابی سطوح لپتین از کیت الیزای موشی (YK052، شرکت Yanaiharu ژاپن) استفاده شد. کیت‌هایی برای سنجش انسولین، توتال لیپید (شرکت Zellbio آلمان) و فسفولیپید (شرکت Mybiosource آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت.

روش ایجاد مدل کبد چرب

برای ایجاد مدل کبد چرب، غذای پرچرب متشکل از دو رژیم غذایی آزاد و یک ترکیب غذایی پرچرب تهیه شد، به طوری که رژیم غذایی آزاد شامل روغن ذرت (مایع) ۵۰۰CC، روغن قنادی ۱۵۰CC، روغن نباتی ۱۰۰ گرم، شیر خشک ۱۰۰ گرم و کلسترول ۵۰ گرم بود که پس از ترکیب مایع روانی درست شد و پلت‌های خوراک حیوانات با این مایع روان مخلوط شد و ترکیب غذایی پرچرب شامل روغن ذرت ۲۸۰ میلی‌لیتر، ساکارز ۲۱/۴ گرم، شیر خشک نان ۵/۸ گرم، کلسترول ۱۴/۳ گرم، سدیم دی‌اکسی کولات ۱/۴۵ گرم، توئین (۸۰) ۵/۲ میلی‌لیتر، پروپیلن گلیکول ۴/۵ میلی‌لیتر، مولتی‌ویتامین ۰/۳۳ میلی‌لیتر، نمک (NaCl) ۱/۴۵ گرم و آب مقطر ۶۵ میلی‌لیتر بود که از طریق گاواژ طی مدت ۳۰ روز به موش‌ها خوراند شد (Zou et al., 2006). در پایان این دوره تعدادی حیوان به صورت تصادفی انتخاب شده و برای تأیید القای کبد چرب آزمایش‌های بیوشیمیایی و بافت‌شناسی بر روی آنها انجام شد.

یا دیابت می‌باشند (Dahiru & Obidoa, 2007). ابتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی در بزرگسالان به دلیل چاقی، دیابت نوع II، حاملگی، هیپرلیپیدمی، گرسنگی‌های طولانی و مصرف طولانی بعضی از داروها شایع‌تر است، نتیجه این یافته‌ها این است که کبد چرب حتی بدون وجود خطر فاکتور و عوامل زمینه‌ای دیگر، الزاماً یک روند خوش‌خیم نمی‌باشد و می‌تواند به سمت سیروز کبدی و فیروز کبدی پیشرفت نماید (Qian & Fan, 2005). هرچند کبد چرب تاکنون درمان قطعی نداشته است اما با کنترل بیماری‌های زمینه‌ای همانند کاهش وزن، چربی‌های خون، دیابت و یا قطع داروهای مسبب، می‌توان از پیشرفت این بیماری جلوگیری کرد (Fararh et al., 2005). سیاه‌دانه (*Nigella sativa*) که گیاهی دوطپه‌ای از خانواده آلاله است و در نقاط مختلف ایران می‌روید، دارای اثرات ضدالتهابی، ضددردی، ضدانگلی، ضد میکروبی، ضدتوموری و تقویت‌کننده سیستم ایمنی می‌باشد (Badr et al., 2013). دانه این گیاه حاوی چهار نوع آلکالوئید به نام‌های تیموکینون، دی تیموکینون، تیمول و تیموهیدروکینون و نیز مواد تغذیه‌ای همانند کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی (مثل: کلسیم، آهن، پتاسیم) و پروتئین‌ها (از جمله ۸ نوع اسیدآمینو ضروری بدن) است. البته اثر تحریکی سیاه‌دانه بر آزاد شدن انسولین از جزایر لانگرهانس پانکراس و کاهش دادن پراکسیداسیون لیپیدی و تجزیه پروتئین‌ها تأیید شده است. همچنین شواهد متعدد اثرات مؤثر این گیاه بر عملکرد کلیه، سیستم تنظیم فشارخون، توانایی سم‌زدایی کبد، تولید اسپرم و سیستم مجاری تنفسی برای دفع مواد زائد و نیز اثربخشی آن در درمان آسم با منشأ برونشیت، همچنین سیستم تولید عرق، بافت تولید شیر، دفع عوامل مهاجم انگلی و توانایی هضم سیستم گوارش را تأیید نموده است. ماده مؤثره اصلی سیاه‌دانه تیموکینون است که اثرات حفاظتی در آسیب‌های کبدی ناشی از استرس اکسیداتیو دارد (Hegazi et al., 2003). از آنجایی که کبد چرب غیرالکلی یک بیماری مزمن التهابی است و از آنجا که گیاه سیاه‌دانه و ترکیب تیموکینون دارای خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی فراوانی است؛ این

حیوانات آزمایشگاهی

۴۰ سر موش‌های آزمایشگاهی کوچک با وزن تقریبی 30 ± 5 گرم از مؤسسه انستیتو پاستور خریداری و در شرایط استاندارد با رطوبت و دمای 21°C و در شرایط ۱۲ ساعته روشنایی و تاریکی نگهداری شدند. سپس به‌طور تصادفی گروه‌بندی و تعداد ۱۰ موش در هر گروه قرار گرفت. گروه کنترل سالم (دریافت آب و غذای معمولی)، گروه حلال (القاء کبد چرب و بعد دریافت حلال تیموکینون (توئین ۲۰) برای مدت ۴ هفته)، گروه‌های تجربی I و II: القاء کبد چرب انجام شده و بعد تیموکینون به ترتیب با دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت چهار هفته به‌صورت تزریق داخل صفاقی دریافت شد (Hosseini et al., 2017). تمام مراحل کار با حیوانات مطابق با دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انجام شد.

روش سنجش پارامترهای بیوشیمیایی

وزن حیوانات در شروع و پایان آزمایش ثبت شده است. در انتهای دوره درمان، حیوان با اتر بیهوش و خون‌گیری از قلب انجام شد و بعد برای بررسی پارامترهای بیوشیمیایی سرم آن جدا شد. همچنین بافت کبد به محض خروج وزن و قسمتی از آن برای ارزیابی بیوشیمیایی منجمد و بخشی نیز برای انجام بررسی‌های بافتی در فرمالین ۱۰٪ فیکس گردید. سطوح پارامترهای بیوشیمیایی سرم شامل تری‌گلیسرید، کلسترول، HDL (لیپوپروتئین با چگالی بالا)، VLDL (لیپوپروتئین با چگالی خیلی پایین)، LDL (لیپوپروتئین با چگالی پایین)، آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز، گلوکز و بیلی‌روبین با استفاده از کیت‌های تهیه شده توسط کمپانی زیست شیمی تعیین گردیدند. اندازه‌گیری سطوح آیدپونکتین، لپتین، انسولین، فسفولیپید و توتال لیپید به روش ساندویچی و با استفاده از کیت‌های الایزای موسی ذکر شده است. پس از بدست

آوردن مقادیر انسولین و گلوکز، داده‌های بدست آمده برای اندازه‌گیری مقاومت به انسولین با استفاده از ایندکس HOMA (Homeostatic model assessment) در فرمول زیر قرار دادیم.

انسولین ناشتا / $22/5 \times$ گلوکز ناشتا = HOMA
ایندکس وزن کبد (%) نیز از طریق فرمول زیر بدست آمد (Kim et al., 2012).

$100 \times$ وزن بدن / وزن کبد = ایندکس وزن کبد (%)

بررسی‌های بافت‌شناسی

برای بررسی تغییرات بافتی ناشی از تأثیرات تیموکینون بر روی کبد، بعد از خارج کردن نمونه‌ها، به‌منظور تثبیت در فیکساتور (فرمالین ۱۰٪) قرار گرفتند. رنگ‌آمیزی نمونه‌های بافتی با هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد و برش‌های بافتی در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۳).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی داده‌ها از نظر آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way-ANOVA) و آزمون Tukey بررسی گردید. نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است. ملاک استنتاج آماری ($P < 0/05$) بود.

نتایج

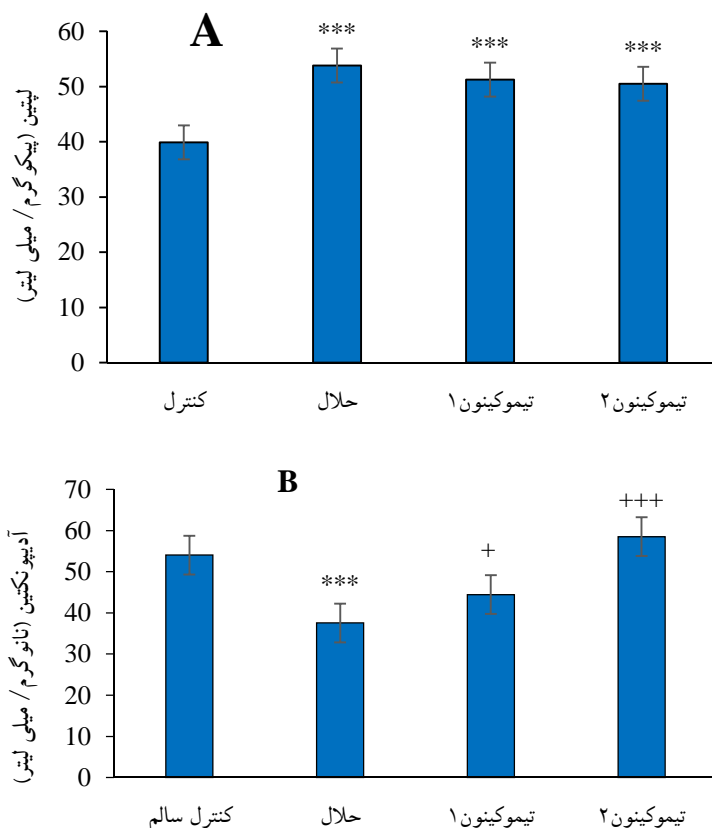
اثرات تیموکینون بر روی پارامترهای بیوشیمیایی میزان تری‌گلیسرید، کلسترول تام، فسفولیپید، توتال لیپید، LDL، VLDL، بیلی‌روبین، گلوکز، انسولین و مقاومت انسولین (HOMA) در گروه حلال و تجربی ۱ افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل سالم نشان دادند ($P < 0/001$)، به‌طوری‌که تجویز تیموکینون با دوز بالا باعث کاهش معنی‌دار این پارامترها نسبت به گروه حلال شد. سطوح HDL نیز در گروه حلال نسبت به گروه

کنترل سالم کاهش معنی‌داری را در $P < 0.01$ نشان داد. تیموکینون، نسبت به گروه حلال تا حدی افزایش یافت، سطح این پارامتر در گروه‌های تجربی ۱ و ۲، با تجویز اما این افزایش معنی‌دار نبود (جدول ۱).

جدول ۱- اثرات تیموکینون بر روی پارامترهای بیوشیمیایی

گروه‌ها	کنترل سالم	حلال	تیموکینون ۱	تیموکینون ۲
پارامترها				
تری‌گلیسرید (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۷۸/۷۳۵±۲/۱۸	۱۰۱/۵۰۶±۱/۵۵***	۹۸/۵۲۱±۳/۴۴***	۸۳/۲۳۲±۲/۳۴+++
کلسترول تام (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۵۱/۷۰۳±۰/۷۴	۶۷/۸۲۵±۰/۷۳***	۶۷/۳۷۵±۰/۴۵***	۵۷/۶۱۸±۱/۴۵***,+++
فسفولیپید (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۱۲۷/۳۸۷±۱/۱۷	۱۳۷/۱۰۸±۰/۲۹***	۱۳۷/۰۳۲±۰/۷۱***	۱۳۱/۰۹۵±۱/۰۰۲***,+++
توتال لیپید (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۱۷۰/۱۵۰±۳/۱۹	۲۱۸/۸۵۰±۲/۰۵***	۲۱۶/۵۰۰±۴/۷۵***	۱۸۵/۳۹۷±۴/۷۲***,+++
HDL-C (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۱۴/۰۷۱±۰/۴۹	۱۲/۲۱۷±۰/۲۱**	۱۳/۰۴۳±۰/۴۲	۱۳/۸۸۳±۰/۱۲
LDL-C (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۲۲/۹۵۱±۱/۰۴	۳۴/۲۰۶±۰/۸۶***	۳۳/۲۱۲±۰/۶۶***	۲۹/۳۷۵±۰/۷۷***,++
VLDL (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۱۵/۷۳۳±۰/۴۳	۲۰۲/۲۸۷±۰/۳۱***	۱۹/۷۰۳±۰/۶۸***	۱۶/۶۱۸±۰/۴۶+++
بیلی‌روبین (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۰/۳۴۶±۰/۰۲	۰/۷۵۶±۰/۰۲***	۰/۷۰۲±۰/۰۰۸***	۰/۵۸۳±۰/۰۱***,+++
گلوکز (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۹۳/۰۵۱±۲/۰۲	۱۵۰/۲۵۰±۶/۶۰***	۱۴۸/۵۰۰±۷/۲۲***	۱۲۱/۲۲۵±۶/۶۰***,+
انسولین (mU/lit)	۰/۷۵۳±۰/۰۲	۰/۹۵۲±۰/۰۱***	۰/۹۳۷±۰/۰۲***	۰/۸۳۰±۰/۰۱+++
HOMA	۳/۱۱۰±۰/۱۱	۶/۳۱۷±۰/۴۰۰***	۶/۲۹۹±۰/۴۱***	۴/۴۵۹±۰/۲۳***,++

یافته‌ها به صورت Mean ± SEM گزارش شده است. *: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم در $P < 0.05$; **: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم در $P < 0.01$; ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم در $P < 0.001$; +: اختلاف معنی‌دار با گروه حلال در $P < 0.05$; ++: اختلاف معنی‌دار با گروه حلال در $P < 0.01$; +++: اختلاف معنی‌دار با گروه حلال در $P < 0.001$; HDL-C: لیپوپروتئین با چگالی بالا-کلسترول؛ LDL-C: لیپوپروتئین با چگالی کم-کلسترول؛ VLDL: لیپوپروتئین با چگالی خیلی کم-کلسترول؛ HOMA: ایندکس مقاومت به انسولین

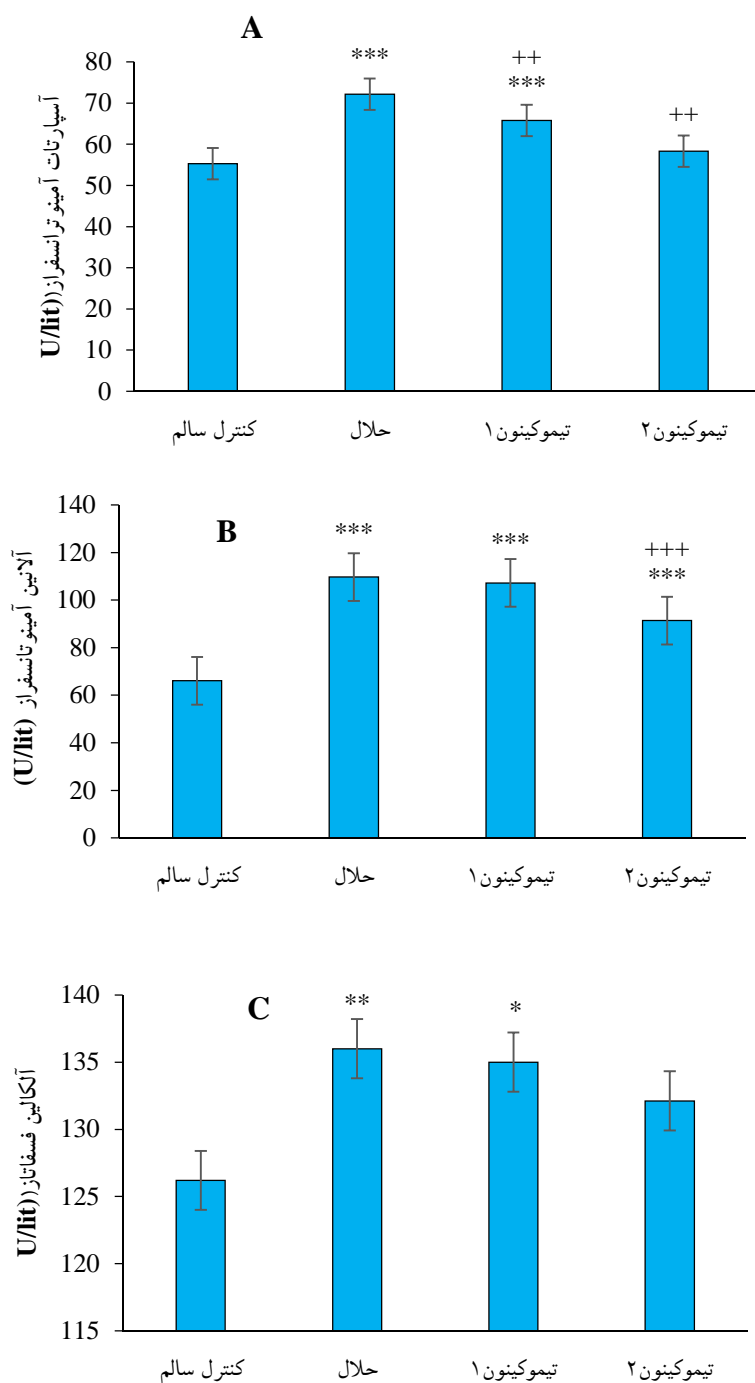


شکل ۱- اثرات تیموکینون در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر روی تغییرات سطح لپتین (A) و آدیپونکتین (B) در موش‌های دارای کبد چرب غیرالکلی

یافته‌ها به صورت Mean \pm SEM گزارش شده است. ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم در $P < 0.001$; +: اختلاف معنی‌دار با گروه حلال در $P < 0.05$; +++: اختلاف معنی‌دار با گروه حلال در $P < 0.001$.

اثرات تیموکینون بر روی سطوح آنزیم‌های کبدی سطوح هر سه آنزیم کبدی آسپارات آمینوترنس فراز، آلانین آمینوترنس فراز و آلکالین فسفاتاز در گروه حلال نسبت به گروه کنترل سالم افزایش معنی‌داری را نشان دادند (شکل ۲). سطح این آنزیم‌ها در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه حلال کاهش یافت، به طوری که این کاهش در سطح آسپارات آمینوترنس فراز در گروه‌های تیموکینون ۱ و ۲ ($P < 0.05$) و آلانین آمینوترنس فراز در گروه تیموکینون ۲ ($P < 0.001$) معنی‌دار گزارش شد (شکل‌های ۲-A و ۲-B)، اما کاهش آلکالین فسفاتاز در گروه‌های تجربی نسبت به گروه حلال معنی‌دار نبود (شکل ۲-C).

اثرات تیموکینون بر روی سطوح آدیپونکتین و لپتین سرم سطح لپتین و آدیپونکتین در گروه حلال نسبت به گروه کنترل سالم به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری را در $P < 0.001$ نشان دادند (شکل ۱). سطح لپتین در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه حلال تا حدی کاهش یافت، اما این کاهش معنی‌دار نبود (شکل ۱-A). سطح آدیپونکتین سرم نیز در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه حلال افزایش معنی‌داری را به ترتیب در $P < 0.05$ و $P < 0.001$ نشان دادند (شکل ۱-B).



شکل ۲- اثرات تیموکینون در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر روی تغییرات سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی آسپاراتات

آمینوترانس فراز (A)، آلانین آمینوترانس فراز (B) و آلکالین فسفاتاز (C) در موش‌های دارای کبد چرب غیرالکلی

یافته‌ها به صورت Mean \pm SEM گزارش شده است. *: اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم در $P < 0.05$ ، **: اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم در $P < 0.01$ ، ***: اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم در $P < 0.001$

***: اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم در $P < 0.001$ ؛ ++: اختلاف معنی دار با گروه حلال در $P < 0.01$ ، +++: اختلاف معنی دار با گروه حلال در $P < 0.001$

اثرات تیموکینون بر روی وزن بدن و ایندکس وزن کبد دریافت رژیم القاءکننده کبد چرب باعث کاهش معنی دار وزن بدن در گروه‌های دریافت‌کننده رژیم نسبت به گروه کنترل سالم شد. وزن بدن حیوانات پس از تیمار با تیموکینون، در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه حلال افزایش معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$). گروه حلال

نیز در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش وزن معنی داری داشت ($P < 0.01$). ایندکس وزن کبد در گروه حلال نسبت به گروه کنترل سالم در $P < 0.001$ افزایش معنی داری را نشان داد. تجویز تیموکینون در گروه تجربی ۲ باعث کاهش معنی دار ایندکس وزن کبد ($P < 0.01$) نسبت به گروه حلال شد (جدول ۲).

جدول ۲- تغییرات ایندکس وزن کبد و وزن بدن

گروه‌ها	کنترل سالم	حلال	تیموکینون ۱	تیموکینون ۲
پارامترها				
هفته شروع	۲۷/۳۷±۱/۴۷	۲۹/۱۲±۰/۵۱	۲۷/۸۷±۰/۹۱	۲۷/۲۵±۰/۵۲
هفته چهارم	۳۷/۵۰±۰/۷۵	۳۱/۸۷±۰/۸۱**	۳۲/۹۳±۱/۴۰***	۳۳/۶۲±۱/۲۶*
هفته پایان	۳۶/۰۵±۰/۸۴	۲۹/۰۰±۱/۷۰***	۳۳/۵۷±۱/۴۰	۳۴/۸۴±۲/۳۰+
ایندکس وزن کبد (%)	۵/۸۲±۰/۲۸	۸/۱۰±۰/۴۱***	۷/۳۴±۰/۲۶***	۶/۱۸±۰/۵۰++

یافته‌ها به صورت Mean ± SEM گزارش شده است. *: اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم در $P < 0.05$; **: اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم در $P < 0.01$ ؛

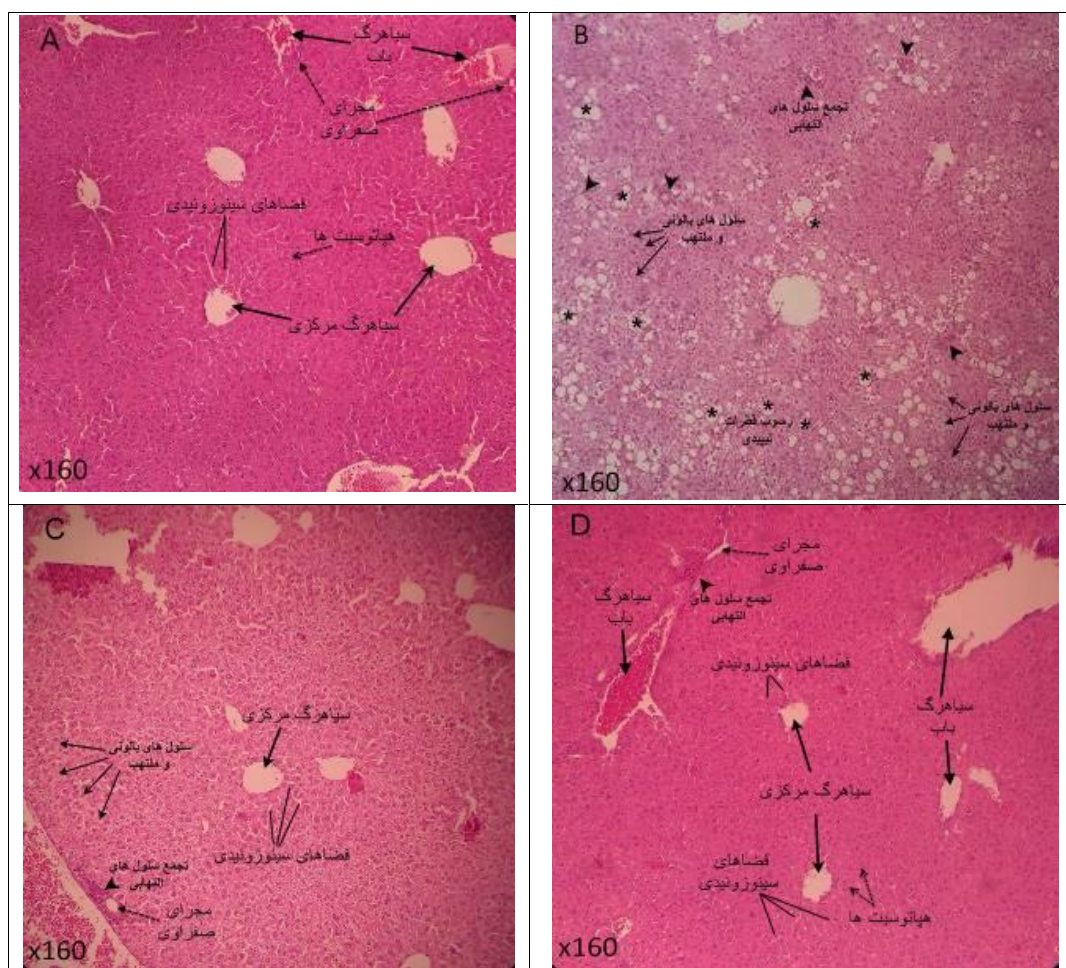
***: اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم در $P < 0.001$; +: اختلاف معنی دار با گروه حلال در $P < 0.05$; ++: اختلاف معنی دار با گروه حلال در $P < 0.01$

اثرات تیموکینون بر روی تغییرات بافتی کبد در برش‌های بافت کبد گروه حلال، استئاتوز شدید بافت کبد به صورت رسوب قطرات کوچک و بزرگ لیپیدی همراه با تورم هیاتوسیت‌ها ایجاد شده است. بررسی‌های هیستولوژیکی در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ با تجویز تیموکینون با دوزهای ۵ و ۱۰ mg/kg نشان داد که از میزان آسیب سلول‌های کبدی به میزان قابل توجهی کاسته شده است. برش بافت کبد در گروه دریافت‌کننده دوز بالای تیموکینون مشابه با گروه کنترل سالم است (شکل ۳).

بحث

طبق آمارهای موجود، کبد چرب غیرالکلی یکی از شایع‌ترین اختلالات جدی کبد در جهان است و با چاقی

و مقاومت به انسولین مرتبط می‌باشد. الگوی نادرست تغذیه و نداشتن فعالیت فیزیکی که منجر به اضافه وزن و چاقی شکمی می‌گردد آمار ابتلا به این بیماری را افزایش داده است (Malekiran et al., 2005). با در نظر گرفتن این موضوع که بیماری کبد چرب شیوع روزافزونی دارد؛ در این تحقیق بر آن شدیم که اثرات درمانی تیموکینون بر پارامترهای بیوشیمیایی و هیستولوژیکی را در موش‌های مبتلا به کبد چرب غیرالکلی ارزیابی نماییم. مصرف رژیم غذایی پرچرب سبب تغییرات دیس لیپیدی می‌شود که با افزایش سطوح سرمی توتال لیپید، توتال کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL و نیز کاهش سطح HDL مشخص می‌گردد. این تغییرات در کبد چرب غیرالکلی مشاهده می‌شود.



شکل ۳- تأثیر تیموکینون در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر روی بافت کبد حیوانات دارای کبد چرب (رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین)

(A) بافت کبد گروه کنترل سالم با بزرگنمایی $\times 160$ ، برش‌های بافتی این گروه هیچ‌گونه ضایعه یا آسیب بافتی را نشان نمی‌دهند، ساختار هیپاتوسیت‌ها، فضاهای سینوزوئیدی، سیاهرگ‌های باب و مرکزی کاملاً نرمال می‌باشند؛ (B) بافت کبد گروه حلال با بزرگنمایی $\times 160$ ، برش‌های بافت کبد این گروه دارای رسوب قطرات کوچک و بزرگ لیپیدی (ستاره) همراه با بالونی شدن و تورم هیپاتوسیت‌ها (پیکان) و تجمع سلول‌های التهابی (نوک پیکان) می‌باشند؛ (C) بافت کبد گروه تجربی ۱ با بزرگنمایی $\times 160$ دریافت‌کننده تیموکینون با دوز ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۲۸ روز، در برش‌های بافتی این گروه سلول‌های بالونی و ملتهب، کاهش قابل توجه قطرات لیپیدی و تجمع سلول‌های التهابی نسبت به گروه حلال و بازیابی فضاهای سینوزوئیدی به چشم می‌خورد؛ (D) بافت کبد گروه تجربی ۲ با بزرگنمایی $\times 160$ دریافت‌کننده تیموکینون با دوز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۲۸ روز نشان‌دهنده بهبود کامل ساختار هیپاتوسیت‌ها و فضاهای سینوزوئیدی نسبت به گروه حلال می‌باشند و هیچ‌گونه رسوب قطرات لیپیدی و هیپاتوسیت‌های بالونی و ملتهب دیده نمی‌شود، مقداری تجمع سلول‌های التهابی در اطراف سیاهرگ باب به چشم می‌خورد.

از تیمار ۳۰ روزه موش‌های آزمایشگاهی کوچک با تزریق درون صفاقی تیموکینون با دوزهای ۵ و ۱۰ mg/kg مشخص شد که شاخص‌های بیوشیمیایی اعم از بیلی‌روبین، توتال لیپید، فسفولیپید، تری‌گلیسرید، کلسترول و VLDL در گروه تجربی ۲ (دریافت‌کننده تیموکینون با دوز ۱۰) کاهش

در این مطالعه، پس از چرب کردن کبد نیز نتایج بدست آمده حکایت از افزایش معنی‌دار در سطح پروفایل لیپیدی و بیلی‌روبین و نیز کاهش معنی‌داری در سطح HDL-C در گروه حلال (دریافت‌کننده رژیم پرچرب) نسبت به گروه کنترل سالم دارد. در حالی‌که پس

مطالعه نیز هم‌راستا با مطالعات قبلی بود. از آنجایی که سطوح آدیپونکتین ارتباط معکوس با چاقی احشایی و مقاومت انسولینی دارد و در این زمینه کاهش وزن به‌عنوان یک عامل القاء‌کننده قوی سنتز آدیپونکتین در نظر گرفته می‌شود، این هورمون تعدادی از فرایندهای متابولیکی مانند تنظیم قند خون و اکسیداسیون اسیدهای چرب را تعدیل می‌کند. همچنین در این مطالعه میزان لپتین در گروه‌های تجربی و گروه حلال در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.001$). اما میزان لپتین در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه حلال کاهش معنی‌داری را نشان نداد. بررسی میزان تأثیر ترکیب‌های تیموکینون و امگا-۳ و پیکولینات کروم روی افراد چاق مبتلا به کبد چرب غیرالکلی (۶۰ بیمار مبتلا به کبد چرب در محدوده سنی ۳۳-۴۵) تحت درمان ۶ ماهه با سیاه‌دانه و چای سبز به‌صورت خوراکی، نشان داد که اصلاح کبد چرب غیرالکلی از طریق تعادل محور آدیپونکتین، لپتین و انسولین است که شامل زنجیره‌ای از وقایعی است که منجر به کاهش وزن می‌شود (Targher *et al.*, 2005). آدیپونکتین بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب در ماهیچه‌ها را افزایش داده و از سوی دیگر بازجذب سرکوبگرهای گلوکز کبدی با واسطه انسولین را از طریق افزایش عملکرد انسولین بهبود می‌بخشد (Polyzos *et al.*, 2011). با توجه به نتایج ما در این پژوهش احتمالاً گردش سطوح لپتین در بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی نسبت به گروه کنترل سالم و تجربی بیشتر بوده و سطوح لپتین بالاتر با شدت این بیماری رابطه مستقیم دارد، از طرفی مشخص شد که سطوح لپتین پلاسما در موش‌هایی که با رژیم پرچرب تغذیه شده بودند افزایش پیدا می‌کند و تیموکینون توانسته است میزان لپتین را که یک هورمون شبه سائتوکاین است و از ژن چاقی تولید می‌شود، کاهش دهد. در این مطالعه، میزان انسولین در گروه تجربی ۲ در مقایسه با گروه حلال کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.001$). همچنین میزان گلوکز در گروه تجربی ۲ در مقایسه با گروه حلال، کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) را نشان داد. به نظر می‌رسد که مکانیسم عمل تیموکینون پیچیده

معنی‌داری نسبت به گروه حلال داشته است ($P < 0.001$). در صورتی‌که تجویز تیموکینون، در دوز بالا، سطح HDL-C را نسبت به گروه حلال افزایش داد، گرچه این تغییر معنی‌دار گزارش نشد. بررسی‌های انجام شده در مورد تأثیر *Nigella sativa* روی میزان کلسترول در رت نیز نشان داد که این ترکیب می‌تواند باعث کاهش سطح کلسترول و LDL و افزایش میزان HDL-C شود (Noeman *et al.*, 2011). نتایج تحقیقات قبلی نشان داده است که تیموکینون همچنین باعث کاهش سطح کلسترول LDL و افزایش سطح HDL سرم می‌شود (Ramadan *et al.*, 2003). بررسی تأثیر تیموکینون روی سطح پروفایل‌های لیپیدی ۲۰۰ رت نشان داد که تیموکینون اثر کاهنده‌ای روی سطح کلسترول، تری‌گلیسرید و LDL دارد (Ramadan *et al.*, 2003). Al-Naqeeq و همکاران (۲۰۰۹) نیز اثر هایپوکلسترولمیای تیموکینون را تأیید کردند. آنان ابراز داشتند که اثر هایپوکلسترولمیای تیموکینون ناشی از مهار HMG-CoAR (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase) کبدی و نیز کاهش بیان mRNA گیرنده‌های LDL می‌باشد. در مطالعه‌ای دیگر برای بررسی اثر حفاظتی تیموکینون در برابر سمیت کبدی روی رت‌ها، تیموکینون به‌صورت خوراکی در آب و با دوز ۱۰ mg/kg به موش‌ها خوراند و گزارش شد که تیموکینون منجر به کاهش سطح بیلی‌روبین سرم می‌شود (Yuan *et al.*, 2014). در تجربیات ما نیز تجویز تیموکینون به‌ویژه با دوز بالا منجر به کاهش معنی‌دار بیلی‌روبین ($P < 0.001$) در مقایسه با گروه دریافت‌کننده رژیم پرچرب را نشان داد. آدیپونکتین، اختلالات متابولیکی که منجر به دیابت نوع ۲، چاقی، آرترواسکلروز و کبد چرب می‌شود را مهار می‌کند. مطالعات نشان داده‌است که سطوح آدیپونکتین در بیماران مبتلا به کبد چرب به کمتر از ۵۰٪ در مقایسه با افراد سالم کاهش می‌یابد. به‌طوری‌که بیان ژن آدیپونکتین هم در طی پیشرفت بیماری روند کاهشی دارد. این در حالیست که بیماران دارای سطوح پایین آدیپونکتین درجات بالایی از التهاب را نشان می‌دهند (Polyzos *et al.*, 2011). نتایج حاصل از این

باشد، مثلاً اثر کاهش‌دهندگی سطح گلوکز خون توسط تیموکینون ممکن است به‌وسیله جذب گلوکز محیطی و یا کاهش گلوکوئوتوز کبدی انجام شود. گرچه مطالعات قبلی اثرات هیپوگلیسمیک و آنتی‌هیپیرگلیسمیک تیموکینون را گزارش کرده‌اند، اما تحقیقات Fararh و همکاران (۲۰۰۵) برای بررسی اثر کاهش‌دهندگی قند خون توسط تیموکینون روی همستر دیابتی شده با STZ نشان داد که تیموکینون از طریق کاهش گلوکوئوتوز کبدی، گلوکز خون را کاهش می‌دهد (Suboh *et al.*, 2004). همچنین Badr و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای بر روی موش‌های دیابتی باردار نشان دادند که استفاده از تیموکینون در دوران بارداری و شیردهی می‌تواند اثر کاهش‌دهنده بر گلوکز خون (با تأثیر بر مسیرهای سیگنالینگ گلوکوئوتوز کبدی) داشته باشد، همچنین تیموکینون می‌تواند باعث تنظیم غلظت پلاسمایی کلسترول و تری‌گلیسرید گردد. با توجه به اینکه در تجربیات ما گلوکز خون کاهش یافته است، اما احتمالاً تیموکینون با اثر بر مسیرهای سیگنالینگ گلوکوئوتوز و همچنین تأثیر روی سلول‌های پانکراس و افزایش ترشح انسولین، موجب کاهش گلوکز خون شده و می‌تواند تأییدی بر یافته‌های Badr و همکاران (۲۰۱۳) باشد. تیموکینون با توانایی کاهش در سطوح مالون دی‌آلدهید و ROS (مارکرهاي اکسیداسیون لیپید) و همچنین کاهش در غلظت‌های تری‌گلیسرید، کلسترول، گلوکز و LDL می‌تواند عوارض ناشی از دیابت نوع ۲ و مقاومت انسولینی را کاهش دهد. محققان نشان دادند که تیموکینون می‌تواند با تنظیم مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT (phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt) عوارض ناشی از توسعه دیابت را از طریق سیگنالینگ انسولین و متابولیسم گلوکز را بهبود بخشد. مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT برای سیگنالینگ انسولین، متابولیسم گلوکز، مهاجرت لنفوسیت‌ها، تکثیر و تمایز و تنظیم سیگنالینگ TGF-beta مهم است، به‌طوری که این ترکیب را هدف درمانی مناسبی برای درمان سرطان، دیابت و دیگر بیماری‌ها کرده است (Badr *et al.*, 2013). در این مطالعه میزان آلکالین فسفاتاز (ALP) در گروه

تجربی ۲ به نسبت گروه حلال کاهش چندان معنی‌داری را نشان نداد، اما در گروه دریافت‌کننده حلال در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.01$). همچنین میزان آسپاراتات آمینوترنس فراز (AST) و آلانین آمینوترنس فراز (ALP) نیز در گروه تجربی ۲ در مقایسه با گروه حلال کاهش معنی‌داری داشتند، ولی سطح معنی‌داری این دو متفاوت بود. از نظر کلینیکی آنزیم‌های ALT و AST نشانگرهای مهمی هستند که افزایش آنها نتیجه تخریب بافت موقع بروز بیماری می‌باشد. محققان نشان دادند که فعالیت مارکرهاي عملکردی کبد مثل ALT و AST در سرم موش‌های تحت رژیم پرچرب به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (Salem, 2005). در این مطالعه نیز همسو با مطالعات گذشته ارتباط معنی‌داری بین افزایش میزان ALP و سایر آنزیم‌های کبدی و بیماری کبد چرب غیرالکلی بدست آمد. در مطالعه‌ای با بررسی میزان تأثیر تیموکینون (دوز ۴ mg/kg به‌صورت محلول در آب آشامیدنی) بر سرطان کبد روی موش‌های ویستار به این نتیجه رسیدند که تیموکینون به‌دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش القای سرطان کبد شده و این اثر را از طریق تثبیت غشای سلولی در نتیجه نشت کمتر آنزیم‌های کبدی (ALT, AST, ALP) به خون اعمال می‌کند (Yki-Järvinen, 2015). در پژوهشی به‌منظور بررسی اثر حفاظتی تیموکینون در برابر سمیت کبدی ناشی از استامینوفن، موش‌ها را با مکمل تیموکینون با دوز ۲ mg/kg در روز تیمار کردند. یافته‌ها حکایت از آن داشت که تیموکینون احتمالاً از طریق افزایش مقاومت به استرس اکسیداتیو از سمیت کبدی ناشی از استامینوفن جلوگیری می‌کند و در این مطالعه کاهش ALT نیز گزارش گردید (Yueh *et al.*, 2011). در مطالعه کنونی میزان تغییرات وزن بدن حیوانات در پایان هفته چهارم پس از تیمار با تیموکینون، در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه حلال افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). گروه حلال نیز در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش وزن معنی‌داری داشتند ($P < 0.01$). در تحقیقات دیگر نیز رژیم‌های متعددی برای

- restoring lymphocyte proliferation via PI3K/AKT signaling. *Lipids in Health and Disease*, 12(1): 37.
- Dahiru, D. and Obidoa, O., 2007. Pretreatment of albino rats with aqueous leaf extract of *Ziziphua mauritiana* protects against alcohol-induced liver damage. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 6(2): 705-710.
 - Fararh, K.M., Shimizu, Y., Shiina, T., Nikami, H., Ghanem, M.M. and Takewaki, T., 2005. Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Research in Veterinary Science*, 79(3): 219-223.
 - Hegazi, R.A., Sutton Tyrrell, K., Evans, R.W., Kuller, L.H., Belle, S., Yamamoto, M., Edmundowicz, D. and Kelley, D.E., 2003. Relationship of adiposity to subclinical atherosclerosis in obese patients with type 2 diabetes. *Obesity Research*, 11(12): 1597-1605.
 - Hosseini, S.M., Taghiabadi, E., Abnous, K., Hariri, A.T., Pourbakhsh, H. and Hosseinzadeh, H., 2017. Protective effect of thymoquinone, the active constituent of *Nigella sativa* fixed oil, against ethanol toxicity in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(8): 927-939.
 - Kim, J., Kim, C.J., Ko, I.G., Joo, S.H. and Ahn, H.J., 2012. Splenectomy affects the balance between hepatic growth factor and transforming growth factor- and its effect on liver regeneration is dependent on the amount of liver resection in rats. *Journal of the Korean Surgical Society*, 82(4): 238-245.
 - Larter, C.Z., Yeh, M.M., Williams, J., Bell-Anderson, K.S. and Farrell, G.C., 2008. MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 49(3): 407-416.
 - Malekirad, A.A., Ranjbar, A., Rahzani, K., Kadkhodae, M., Rezaie, A., Taghavi, B. and Abdollahi, M., 2005. Oxidative stress in operating room personnel: occupational exposure to anesthetic gases. *Human & Experimental Toxicology*, 24(11): 597-601.
 - Milner, J., 1979. Mechanism for fatty liver induction in rats fed arginine deficient diets. *The Journal of Nutrition*, 109(4): 663-670.
 - Noeman, S.A., Hamooda, H.E. and Baalash, A.A., 2011. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 3(1): 17.
 - Polyzos, S.A., Toulis, K.A., Goulis, D.G., Zavos, C. and Kountouras, J., 2011. Serum total adiponectin in
- القای کبد چرب غیرالکلی بکار برده شده است که کاهش وزن بدن را در حیوانات به همراه داشته است. به عنوان مثال، محققان نشان دادند که رژیم دارای سطوح پایین کولین و متیونین کبد چرب غیرالکلی را به خوبی در حیوانات القاء کرده و موجب کاهش وزن بدن آنها نسبت به گروه کنترل سالم می شود (Anstee & Goldin, 2006؛ Larter *et al.*, 2008). همچنین رژیم با سطوح پایین آرژنین نیز این اثرات را در حیوانات القاء می کند (Milner, 1979). در مطالعات هیستولوژیکی، هیچگونه حالت غیرطبیعی در بافت کبد موش های گروه شاهد سالم مشاهده نشد، در حالی که در موش های گروه حلال، استئاتوز شدید بافت کبد به صورت تغییر چربی میکروویکولار و گاهی ماکروویکولار همراه با تورم هیپاتوسیت ها ایجاد شده است. بررسی های هیستولوژیکی مطالعه کنونی در گروه های تجربی پس از تیمار ۳۰ روزه با تیموکینون با دوزهای ۵ و ۱۰ mg/kg نشان داد که از میزان آسیب سلول های کبدی به میزان قابل توجهی کاسته شده است. با توجه به یافته های این مطالعه و عوارض جانبی ناچیز گیاهان دارویی می توان به کمک طب سنتی و با استفاده از خواص گیاهان دارویی از جمله سیاه دانه (*Nigella sativa*) به تولید داروهای جدیدی امید داشت که به وسیله آن به راحتی بتوان کبد چرب را درمان کرد.
- ### منابع مورد استفاده
- Al-Naqeep, G., Ismail, M. and Yazan, L.S., 2009. Effects of thymoquinone rich fraction and thymoquinone on plasma lipoprotein levels and hepatic low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes expression. *Journal of Functional Foods*, 1(3): 298-303.
 - Anstee, Q.M. and Goldin, R.D., 2006. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *International Journal of Experimental Pathology*, 87(1): 1-16.
 - Badr, G., Mahmoud, M.H., Farhat, K., Waly, H., Al-Abdin, O.Z. and Rabah, D.M., 2013. Maternal supplementation of diabetic mice with thymoquinone protects their offspring from abnormal obesity and diabetes by modulating their lipid profile and free radical production and

- cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 54(12): 3541-3546.
- Yki-Järvinen, H., 2015. Nutritional modulation of non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nutrients*, 7(11): 9127-9138.
 - Yuan, T., Nahar, P., Sharma, M., Liu, K., Slitt, A., Aisa, H. and Seeram, N.P., 2014. Indazole-type alkaloids from *Nigella sativa* seeds exhibit antihyperglycemic effects via AMPK activation in vitro. *Journal of Natural Products*, 77(10): 2316-2320.
 - Yueh, C.Y., Chen, J.H., Lee, L.W., Lu, C.W., Parekh, B. and Chi, C.C., 2011. Elevated alanine aminotransferase is associated with metabolic syndrome but not consistently associated with impaired fasting glucose or type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 94(1): 64-70.
 - Zou, Y., Li, J., Lu, C., Wang, J., Ge, J., Huang, Y., Zhang, L. and Wang, Y., 2006. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sciences*, 79(11): 1100-1107.
 - nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism*, 60(3): 313-326.
 - Qian, Y. and Fan, J.G., 2005. Obesity, fatty liver and liver cancer. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 4(2): 173-177.
 - Ramadan, M.F., Kroh, L.W. and Mörsel, J.T., 2003. Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils and oil fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24): 6961-6969.
 - Salem, M.L., 2005. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*, 5(13): 1749-1770.
 - Suboh, S., Bilot, Y. and Aburjai, T., 2004. Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytotherapy Research*, 18(4): 280-284.
 - Targher, G., Bertolini, L., Poli, F., Rodella, S., Scala, L., Tessari, R., Zenari, L. and Falezza, G., 2005. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future

Effect of thymoquinone on improvement of lipid profile and liver enzymes in fatty liver-induced NMRI mice

L. Jafari Nia¹, A. Haeri Rouhani² and P. Yaghmaei^{3*}

1- M.Sc. student, Department of Animal Biology, Science and Research Campus, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Animal Biology, Science and Research Campus, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3*- Corresponding author, Department of Animal Biology, Science and Research Campus, Islamic Azad University, Tehran, Iran,
E-mail: pr.yaghmaei@gmail.com

Received: November 2017

Revised: February 2018

Accepted: February 2018

Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is an increasing disease in people with urban lifestyle and this disease may progress to NASH. Thymoquinone, as a powerful antioxidant and a traditional drug, was assessed in male NMRI mice with fatty liver. In this study, 40 NMRI mice were divided into four groups: healthy control, solvent, treatment 1 and 2, treating with 5 and 10 mg/ kg of thymoquinone by i.p. for 28 days, respectively. All groups were on high fat diet for four weeks except the healthy control group. At the end of the trial, the mice tissue and serum samples were collected and then biochemical and histological parameters were assessed. Our results showed that thymoquinone significantly decreased the triglyceride, VLDL, bilirubin, phospholipid, cholesterol, HOMA, and ALT levels in treatment 2 group compared to sham group ($P<0.001$), insulin, AST, LDL ($P<0.01$), and glucose ($P<0.05$). The levels of ALP and leptin decreased and the HDL levels increased but not significantly. The levels of adiponectin were increased significantly ($P<0.001$). Histopathological assessment showed that the tissue damages were significantly improved. According to our study, thymoquinone improved the insulin resistance, lipid profile, and liver enzymes in fatty liver- nduced mice.

Keywords: Thymoquinone, high fat diet, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), cholesterol.