



## اثر محافظتی تیموکینون در برابر آسیب کبدی ناشی از فلوکستین از طریق تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی در موش صحرایی نر

علی نوری<sup>۱</sup>، قدرت‌اله پناهی<sup>۲</sup>، نادر باقری<sup>۱</sup>، رضا احمدی<sup>۱\*</sup>

۱- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۳، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۳

### چکیده

**مقدمه:** فلوکستین دارویی است که در درمان افسردگی استفاده می‌شود و اثرات سمی روی سلول‌های کبدی دارد. تیموکینون، مهم‌ترین ماده‌ی مؤثره‌ی موجود در سیاه‌دانه (*Nigella sativa*) دارای اثرات فارماکولوژیک متعددی از جمله اثرات آرام‌بخشی، کاهش فعالیت حرکتی و شلی عضلانی می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر تیموکینون بر کاهش اثرات سمی فلوکستین بر کبد می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** ۴۰ سر موش صحرایی ویستار به مدت ۴ هفته با فلوکستین، تیموکینون و سیلیمارین تحت درمان قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی، qRT-PCR و بررسی هیستوپاتولوژیک برای ارزیابی اثر داروها بر سیستم اکسیدان/آنتی‌اکسیدان و پاسخ‌های التهابی انجام شد.

**نتایج:** نتایج نشان داد که فلوکستین باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، اکسیداسیون پروتئین و مهار سیستم آنتی‌اکسیدان در سلول‌های کبدی موش صحرایی می‌گردد. همچنین فلوکستین بیان سیتوکین پیش‌التهابی  $TNF-\alpha$  و مهاجرت لنفوسیت‌ها به سلول‌های کبدی را افزایش داد. در مقابل تیموکینون در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌طور معنی‌داری غلظت‌های  $PC$  و  $MDA$  را کاهش می‌دهد. علاوه بر این، تیموکینون فعالیت کاتالیزوری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکوتانیون پراکسیداز و  $GSH$  را افزایش می‌دهد و تنها غلظت ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در جلوگیری از ارتشاح لنفوسیت‌ها به سلول‌های کبدی با واسطه فلوکستین مؤثر بود.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که تیموکینون از طریق القای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی اثرات محافظتی در برابر سمیت فلوکستین اعمال می‌کند. از آنجایی که تیموکینون اثرات بهبودی خود را در دوز کمتر از مقادیر سمی اعمال می‌کند، این مطالعه نشان می‌دهد که می‌توان از این ترکیب در کنار فلوکستین برای کاهش آسیب کبدی استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی:** فلوکستین، آسیب کبدی، تیموکینون، آنتی‌اکسیدان، التهاب.

\*نویسنده مسئول: استادیار بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، تلفن: ۹۸۹۱۰۳۰۲۹۸۹، نمابر: ????, Email: rezaahmadimd@gmail.com, Ahmadi.r@skums.ac.ir

**ارجاع:** نوری علی، پناهی قدرت‌اله، باقری نادر، احمدی رضا. اثر محافظتی تیموکینون در برابر آسیب کبدی ناشی از فلوکستین از طریق تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی در موش صحرایی نر. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۱؛ ۱۸(۱): ۴۰-۵۰.

## مقدمه

افسردگی که به‌عنوان یک بیماری روانپزشکی ویرانگر توصیف می‌شود، می‌تواند با انگیزه پایین، بدبینی و خود اتهام‌زنی تشخیص داده شود (۱). اگرچه علل متعددی مانند سیناپس تحریکی غیرطبیعی (۲)، میکروگلیا بیش از حد فعال شده (۳) و واکنش‌های التهابی عصبی (۴) به‌عنوان مسئول ایجاد افسردگی پیشنهاد شده‌اند، هنوز مکانیسم دقیقی که می‌تواند منجر به پاتوژنز بیماری شود ناشناخته است. با وجود علت ناشناخته، یکی دیگر از نگرانی‌های جهانی در مورد افسردگی، سرعت سریع بروز آن در بین افراد است. از آنجایی که ارتباط تنگاتنگی بین افسردگی و خودکشی وجود دارد، باید اقدامات جدی برای کنترل افسردگی انجام شود (۵ و ۶). فلوکستین (Flux)، یک مهارکننده انتخابی جذب سروتونین، یکی از داروهایی است که به‌طور گسترده در درمان افسردگی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷) و نتایج گزارشات حاکی از آن است که این عامل بر کیفیت زندگی بیماران تأثیرات بهبود بخشی دارد (۸ و ۹). کبد به‌عنوان محل اولیه متابولیسم دارو، سیستم سیتوکروم P450 را برای تبدیل بیوشیمیایی Flux به متابولیت فعال خود، معروف به نورفلوکستین، بکارگیری می‌کند (۱۰ و ۱۱). Flux در شکل فعال خود، با ناقل بازجذب سروتونین ادغام می‌شود، غلظت سروتونین شکاف سیناپسی را افزایش می‌دهد و به نوبه خود باعث ایجاد اثرات محافظت‌کننده عصبی می‌شود (۱۲). علیرغم افسردگی، Flux برای بیماران مبتلا به سایر اختلالات روانی از جمله اختلال هراس، پرخوری عصبی و اختلال نارسایی پیش از قاعدگی نیز تجویز شده است (۵-۷).

اگرچه مؤثر به‌نظر می‌رسد، اما عوارض جانبی Flux اجتناب‌ناپذیر است و می‌تواند از افزایش وزن و فشار خون بالا تا عوارض جانبی جدی‌تر مانند بیماری عروق کرونر قلب یا دیابت نوع ۲ متغیر باشد (۸،۹). علاوه بر این، نتایج مطالعات قبلی نشان داد که Flux ممکن است اثرات سمی بر سلول‌های کبدی داشته باشد. بندل و همکاران گزارش دادند که دوز بالای Flux در مدل‌های موش باعث تغییر متابولیسم اسیدهای چرب و افزایش اندازه سلول‌های کبدی می‌شود (۱۳). در مطالعه دیگری، ادعا شده است که Flux میتوکندری‌های کبد را مختل می‌کند، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را افزایش می‌دهد و از طریق برهم زدن تعادل سیستم اکسیداسیون و احیا، باعث آسیب کبدی می‌شود (۱۴). گالکی و همکارانش همچنین گزارش داده‌اند که Flux باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و GPx در بیماران افسرده می‌شود (۱۵). برای از بین بردن این عوارض جانبی، بسیاری از مطالعات به ایده جدیدی رسیده‌اند و پیشنهاد کرده‌اند که شاید همراهی

یک عامل دیگر که سمیت Flux را بهبود می‌بخشد، بتواند اثر این Flux را احیا کند (۱۶ و ۱۷).

سیاه دانه یکی از گیاهان دارویی است که خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی آن باعث کاربرد آن در درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله دیس لیپیدی، آسم، اسهال و ... شده است (۱۸). نتایج تجزیه و تحلیل عمیق نشان داد که سیاه دانه حاوی آلکالوئیدها، ساپونین و ماده موثره مختلفی است که هر یک از آنها ممکن است ارزش درمانی خاصی داشته باشند. در میان آنها، تیموکینون (TQ) خواص درمانی امیدوارکننده‌ای دارد (۱۹). در مطالعه‌ای که توسط نیلی احمدآبادی و همکاران انجام شد، گزارش شده است که TQ می‌تواند آسیب کبدی ناشی از آفلاتوکسین B1 را در موش‌ها کاهش دهد (۱۸). علاوه بر این، در مطالعه دیگری نشان داده شده است که TQ از طریق افزایش فعالیت سرمی اکسید نیتريت، سمیت کلوی ناشی از استامینوفن را در موش‌های صحرایی کاهش می‌دهد، که نشان می‌دهد این عامل ممکن است دارای خواص محافظتی در کلیه باشد (۲۰). جدا از خاصیت آنتی‌اکسیدانی، گزارش شده است که TQ می‌تواند در ترکیب با بسیاری از داروهای شیمی درمانی مانند دوکسوروبیسین و سیس پلاتین نیز استفاده کرد تا نه تنها ارزش درمانی آنها را تقویت کند بلکه اثرات مضر آنها را بر سلول‌های طبیعی کاهش دهد (۲۱ و ۲۲). علاوه بر اثربخشی، نتایج مطالعات قبلی نیز بیان کرد که TQ بی خطر است و در بیماران به خوبی تحمل می‌شود (۲۳). طبق مطالعات قبلی، LD50 برای تیموکینون ۷۹۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شده است و در نتیجه استفاده از دوزهای کمتر از این مقدار ممکن است هیچ اثر مضر بر سلول‌های طبیعی نداشته باشد. با توجه به مشخصات ایمن TQ و اثرات بهبوددهنده آن، ارزیابی اینکه آیا این عامل می‌تواند اثرات محافظتی کبدی را اعمال کند و آسیب کبدی ناشی از Flux را در موش‌ها کاهش دهد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بنابراین هدف از انجام این کار بررسی اثر تیموکینون بر سمیت کبدی ناشی از فلوکستین بود.

## مواد و روش‌ها

گروه‌های حیوانی و پروتکل‌های آزمایش برای بررسی تأثیر Flux و TQ بر عملکرد سلول‌های کبدی، ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (۶ تا ۸ هفته) که به مدت ۴ هفته در شرایط استاندارد پرورشی نگهداری شدند تا با محیط آزمایشگاهی عادت کنند، به شش گروه تقسیم شدند. موش‌های گروه کنترل هیچ دارویی دریافت نکردند و فقط با نرمال سالین و آب مقطر تحت درمان قرار گرفتند. گروه دوم موش‌های تحت درمان با فلوکستین بودند که به مدت ۴ هفته به‌صورت خوراکی با دوز ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم فلوکستین تحت درمان قرار گرفتند. گروه سوم موش‌ها ابتدا با

برای ارزیابی تأثیر داروها بر سیستم آنتی‌اکسیدانی، از روش FRAP استفاده کردیم. پلاسما از موش‌های تحت درمان با دارو و گروه کنترل درمان نشده جمع‌آوری شد. پلاسما سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در معرض یک معرف متشکل از ۳۰۰ میلی‌مولار بافر استات، ۱۰ میلی‌مولار TPTZ (تری پیریدیل-s-تریازین)، ۴۰ میلی‌مولار HCl و ۲۰ میلی‌مولار FeCl<sub>3</sub> قرار گرفت. سپس جذب نوری (OD) در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. از FeSO<sub>4</sub> برای طبیعی کردن سطوح سرمی FRAP استفاده شد.

ارزیابی فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنزیمی کاتالاز (CAT) و سوپروکسیدموکساز (SOD) در بافت کبد مورد بررسی قرار گرفت. یک گرم بافت تازه شده کبد در ۴ حجم بافر فسفات سرد (PBS) هموژنیزه شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فعالیت آنزیمی آنزیم‌ها با استفاده از مایع رویی بررسی شد. ما همچنین از روش برادفورد برای تعیین غلظت پروتئین استفاده کردیم. فعالیت CAT و SOD به ترتیب با استفاده از H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و تترازولیم نیترو آبی (NBT) (شرکت سیگما آلدیج، سنت لوئیس، MO) تجزیه و تحلیل شد.

ارزیابی فعالیت GPx در بافت کبد

بافت کبد موش‌های تحت درمان با دارو و موش‌های تحت درمان برای تهیه هموژن مورد استفاده قرار گرفت. پس از انکوباسیون با اتیلن دی آمین تترا استات، آزید سدیم، H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و بافر فسفات، هموژن‌ها در دورل ۲۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و مایع رویی به دست آمده با دی سدیم هیدروژن فسفات و DTNB مخلوط شد. فعالیت GPx در طول موج ۴۱۲ نانومتر ارزیابی شد.

ارزیابی گلوتاتیون احیا (GSH)

روش Elman برای تعیین سطح GSH در موش‌های مواجهه شده با دارو و موش‌های تحت درمان استفاده شد (۲۶). رنگ زرد تولید شده در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. غلظت GSH در سرم به صورت nmol/mg پروتئین بیان شد.

سنجش TNF- $\alpha$

برای تعیین سطح TNF- $\alpha$  کبدی، از کیت سنجش ایمونوسوربنت (ELISA) متصل به آنزیم (BT-Laboratory، چین) استفاده کردیم. تغییر در سطوح سرمی به صورت pg/ml گزارش شد.

تجزیه و تحلیل بیان ژن با استفاده از qRT-PCR

برای ارزیابی تغییرات بیان mRNA از روش Real-time PCR استفاده شد. با استفاده از کیت استخراج RNA (معرف کیت BIOZOL، چین)، RNA از بافت کبد موش‌های صحرایی تحت درمان و درمان نشده برداشت شد. یک کیت معرف PrimeScript™ (Takara.BioInc.Japan) برای تولید cDNA از RNAهای

فلوکسیتین و یک ساعت بعد با سیلیمارین (۱۰۰ mg/kg) به عنوان کنترل مثبت تحت درمان قرار گرفتند. موش‌های گروه‌های درمان نیز با Flux و سپس به ترتیب با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم TQ تحت درمان قرار گرفتند. همه حیوانات ۴ هفته پس از درمان برای جمع‌آوری نمونه‌های خون و بافت کبد قربانی شدند. نمونه خون قبل از کالبدشکافی از قلب موش‌ها جمع‌آوری شد. کلیه مطالعات حیوانی، طبق قوانین اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و پس از گرفتن کد اخلاق به شماره (IR. SKUMS. REC. 1399. 236) انجام گرفت.

ارزیابی شاخص‌های بیوشیمیایی

پس از جمع‌آوری خون کامل، سرم با سانتریفیوژ در ۱۵۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C تهیه شد. سطوح سرمی نشانگرهای اختصاصی کبد، مانند آلانین ترانس آمیناز (ALT)، آسپاراتات ترانس آمیناز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و بیلی روبین تام (TB) و همچنین پروفایل لیپیدی، از جمله تری‌گلیسیرید (TG)، کلسترول (Chol)، LDL-c، VLDL-c و HDL-c با استفاده از کیت بیوشیمیایی (شرکت پارس آزمون، ایران) و سیستم اتوآنالایزر (BT3000، رم، ایتالیا) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدی با استفاده از روش مالون‌دی‌آلدئید (MDA)

برای تعیین اثرات فلوکسیتین، سیلیمارین و تیموکینون بر پراکسیداسیون لیپیدی، واکنش بین MDA تولید شده و ۲- تیوباربیئوریک اسید (TBA) (شرکت مرک، آلمان) در طول موج ۵۳۵ نانومتر طبق پروتکل پیشنهادی توسط حیدریان و همکاران اندازه‌گیری شد (۲۴). سپس، سطح سرمی و کبدی MDA با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده با MDA برآورد شد (Sigma Aldrich; lot 10838-3). سطح MDA به صورت nmol/mg protein ارائه شد.

ارزیابی اکسیداسیون پروتئین با استفاده از روش پروتئین کربونیل (PC)

برای ارزیابی سطح اکسیداسیون پروتئین در پاسخ به تیمار فلوکسیتین، سیلیمارین و تیموکینون سطوح کربونیل را بررسی کردیم. ما از ۴،۲-دی‌نیتروفنیل هیدرازین (DNPH) برای اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری سطوح مشتقات کربنیل فعال طبق پروتکلی که توسط رزنیک و همکاران توضیح داده شده است، استفاده کردیم (۲۵). جذب نوری (OD) در ۳۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سطوح بافتی PC در هر گروه آزمایش شده به صورت nmol/mg پروتئین ارائه شد.

استخراج شده استفاده شد. سپس، cDNA سنتز شده همراه با پرایمرها، SYBR® Green PCR Master Mix (شرکت Qiagen، آلمان) و آب فاقد نوکلئاز در معرض دستگاه چرخه نوری قرار گرفتند. پس از یک مرحله فعال‌سازی اولیه (۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد)، ۴۰ چرخه هر کدام شامل یک مرحله دناتوراسیون (۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و یک مرحله ترکیبی annealing/extension (۶۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. در مقایسه با CT بتا اکتین به‌عنوان یک ژن رفرانس، تغییر در بیان ژن طبق روش  $-\Delta\Delta CT$  محاسبه شد. جدول ۱ حاوی اطلاعاتی در مورد توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر است.

#### بررسی هیستوپاتولوژیک

۲۴ ساعت پس از آخرین درمان موش‌ها با فلوکستین و تیموکینون موش‌ها قربانی شدند و قطعات کبد با محلول بافر فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. پس از جاسازی پارافین، مکعب‌های پارافین به لام‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتر برش داده شدند و طبق پروتکلی که قبلاً توضیح داده شد، هر لام با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شد (۲۷). برای ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژیک از میکروسکوپ Olympus BX50F4 استفاده شد.

#### تحلیل آماری

معناداری آماری با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey تعیین شد. داده‌های ارایه شده میانگین  $\pm$  انحراف معیار سه آزمایش مستقل است. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و GraphPad prism استفاده شد. P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

بررسی اثر تیموکینون و فلوکستین بر پارامترهای بیوشیمیایی سرولوژیک در موش صحرائی نشان داده شده است که فلوکستین عوارض جانبی جدی کبدی دارد (۱۱). جالب توجه است، نتایج ما همچنین نشان داد، هنگامی که موش‌ها را به مدت ۴ هفته به‌صورت خوراکی با فلوکستین (۲۴ mg/kg) درمان کردیم، سطح سرمی نشانگرهای اختصاصی کبدی (ALT، AST، ALP و TB) و همچنین پروفایل لیپیدی افزایش یافت. نتایج در مقایسه با گروه کنترل (جدول ۲)، نشان می‌دهد که شاید فلوکستین ممکن است اثرات مخربی بر کبد داشته باشد. برای ارزیابی اینکه آیا تیموکینون می‌تواند از اثر فلوکستین جلوگیری کند و عوارض جانبی آن را بهبود بخشد، موش‌های تحت درمان با فلوکستین را با دوزهای افزایشی تیموکینون (۱۰، ۲۰ و ۴۰ mg/kg) درمان کردیم و سپس شاخص‌های بیوشیمیایی را ارزیابی کردیم.

جالب توجه است، نتایج ما نشان داد که در تمام گروه‌های آزمایش‌شده، سطوح سرمی شاخص‌های بیوشیمیایی کمتر از موش‌های تحت درمان با فلوکستین بود (جدول ۲). همان‌طور که در جدول ۲ ارایه شده است، در حالی که تیموکینون در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثرات بهبودی جزئی بر شاخص‌های بیوشیمیایی داشت، دوزهای بالاتر دارو در بازگرداندن عوامل مرتبط با کبد و پروفایل لیپیدی به مقادیر طبیعی با حداکثر بازیابی در ۴۰ mg/kg مشاهده شد ( $P \geq 0/05$ ). برای تأیید نتایج، نتایج تیموکینون را با گروه کنترل مثبت دزیافت‌کننده سلیمارین (۱۰۰ mg/kg) مقایسه کردیم. هر مقدار نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار هشت موش است. Control، گروه کنترل؛ Flux، موش‌های صحرائی فقط فلوکستین (۲۴ mg/kg) Flux+SIL، موش‌های تحت درمان با فلوکستین به همراه سلیمارین (۱۰۰ mg/kg) Flux+TQ10 و Flux+TQ20 و Flux+TQ40 موش‌های که به‌ترتیب با فلوکستین به همراه تیموکینون در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تحت درمان قرار گرفتند.

ap < 0/05 در مقابل گروه کنترل

bp < 0/05 در مقابل گروه تجویز شده فقط با فلوکستین (FLU)

cp < 0/05 در مقابل گروه تحت درمان با سلیمارین (FLU+SIL)

dp < 0/05 در مقابل گروه تحت درمان با تیموکینون با دوز ۱۰

میلی‌گرم بر کیلوگرم (FLU+TQ10)

ep < 0/05 در مقابل گروه تحت درمان با تیموکینون با دوز ۲۰

میلی‌گرم بر کیلوگرم (FLU+TQ20)

ارزیابی اثر تیموکینون بر استرس اکسیداتیو ناشی از فلوکستین در

بافت کبد موش صحرائی

برای تعیین اینکه آیا درمان با فلوکستین می‌تواند باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت کبد شود، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون پروتئین به‌ترتیب با ارزیابی سطوح کبدی مالون دی‌آلدئید (MDA) و پروتئین کربنیل (PC) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ما نشان داد که فلوکستین (۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نه تنها سطح سرمی و کبدی MDA را افزایش داد ( $P \geq 0/05$ ) بلکه میزان PC را در بافت کبد موش‌ها نیز افزایش داد ( $P \geq 0/05$ ) (جدول ۳) که نشان می‌دهد که این دارو می‌تواند باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌های کبدی شود. از سوی دیگر، داده‌های ما نشان داد که میزان MDA کبدی و PC به‌طور قابل توجهی از  $5/77 \pm 0/84$  و  $11/19 \pm 1/01$  به  $1/76 \pm 0/52$  و  $4/55 \pm 0/63$  در گروه دریافت‌کننده تیموکینون با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش یافته است (جدول ۳). برای تأیید توانایی تیموکینون در بهبود اثرات اکسیداتیو فلوکستین از روش FRAP استفاده کردیم. ما دریافتیم که در حالی که

فعالیت آنزیمی CAT، SOD و GPx به صورت وابسته به دوز افزایش یافته است، بلکه افزایش در سطوح بافتی GSH مشاهده شد. تأثیر فلوکستین و تیموکینون بر پاسخ التهابی در بافت کبد موش صحرایی

یکی از مکانیسم‌هایی که از طریق آن استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث آسیب بافتی شود، فعال شدن پاسخ‌های التهابی است (۲۹) و (۳۰). نتایج بررسی TNF- $\alpha$  نشان داد که در حالی که Flux سطح این مارکر را در بافت کبد موش‌ها افزایش می‌دهد، TQ می‌تواند به طور قابل توجهی سطح این عامل التهابی را در موش‌ها کاهش دهد (شکل ۲) ( $P \leq 0.05$ ). برای تأیید این نتایج، بیان ژن این فاکتور پیش‌التهابی را با استفاده از تجزیه و تحلیل qRT-PCR ارزیابی کردیم. نتایج ما نشان داد که Flux به طور قابل توجهی بیان ژن TNF- $\alpha$  را در کبد موش‌ها در مقایسه با گروه کنترل (شکل ۲) افزایش داد ( $P \geq 0.05$ ). علاوه بر این، هنگامی که موش‌های تحت درمان با Flux را با دوزهای افزایشی TQ قرار گرفتند، متوجه شدیم که کاهش قابل توجهی در سطح بیان ژن فوق‌الذکر وجود دارد (شکل ۲). لازم به ذکر است که TQ در دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم حداکثر اثر بازدارنده را بر بیان TNF- $\alpha$  داشت. برای تأیید اینکه اثر TQ بر سطح بیان ژن پیش‌التهابی، ما همچنین گروهی از موش‌ها را با سیلی‌مارین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) درمان کردیم.

تأثیر فلوکستین و تیموکینون بر تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت کبدی موش صحرایی

هنگامی که مشخص شد که Flux می‌تواند پاسخ‌های پیش‌التهابی را در بافت کبد القا کند، ما آزمایشات هیستوپاتولوژیک را انجام دادیم. نتایج هیستوپاتولوژیک تغییراتی را در کبد حیوانات تحت درمان با Flux نشان داد. در مقایسه با گروه کنترل (شکل ۳A)، علایم ارتشاح لنفوسیتی در بافت حیوانات تحت درمان با فلوکستین مشهود بود (شکل ۳B)، که احتمالاً می‌تواند به دلیل القای پاسخ‌های التهابی با واسطه Flux باشد. برای تأیید اینکه ارتشاح لنفوسیت‌ها به دلیل تزریق فلوکسوکستین است، موش‌ها با سیلی‌مارین همراه با فلوکستین تحت درمان قرار گرفتند. نتایج بررسی هیستوپاتولوژیک سلول‌های کبدی طبیعی را بدون هیچ نشانه‌ای از ارتشاح لنفوسیتی نشان داد (شکل ۳C). علاوه بر این، درمان TQ با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تعداد لنفوسیت‌های نفوذی در بافت کبد را کاهش داد (شکل E و ۳D). اثرات محافظتی TQ در برابر Flux به حدی بود که دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از این عامل می‌تواند به طور قابل توجهی ارتشاح لنفوسیت‌ها را در بافت کبد حیوانات از بین ببرد (شکل ۳F).

فلوکستین می‌تواند سطوح سرمی FRAP را از ۶۱۶/۱ میکرومولار در گروه کنترل به ۳۶۹/۲ میکرومولار کاهش دهد، تیموکینون در دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند این مقدار را به ۶۰۴/۱ میکرومولار ( $P \leq 0.05$ ) بازگرداند (جدول ۳)، که نشان می‌دهد تیموکینون می‌تواند ظرفیت اکسیداتیو فلوکستین را از طریق فعال کردن سیستم آنتی‌اکسیدانی خنثی کند. نتایج TQ با کنترل مثبت سیلی‌مارین مقایسه شد.

هر مقدار نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار هشت موش است. Control، گروه کنترل؛ Flux، موش‌های صحرایی فقط فلوکستین (۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) Flux+SIL، موش‌های تحت درمان با فلوکستین به همراه سیلی‌مارین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و Flux+TQ10، Flux+TQ20 و Flux+TQ40 موش‌های که به ترتیب با فلوکستین به همراه تیموکینون در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تحت درمان قرار گرفتند.

$ap < 0.05$  در مقابل گروه کنترل

$bp < 0.05$  در مقابل گروه تجویز شده فقط با فلوکستین (FLU)

$cp < 0.05$  در مقابل گروه تحت درمان با سیلی‌مارین (FLU+SIL)

$dp < 0.05$  در مقابل گروه تحت درمان با تیموکینون با دوز ۱۰

میلی‌گرم بر کیلوگرم (FLU+TQ10)

$ep < 0.05$  در مقابل گروه تحت درمان با تیموکینون با دوز ۲۰

میلی‌گرم بر کیلوگرم (FLU+TQ20)

بررسی تأثیر فلوکستین و تیموکینون بر سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی در موش صحرایی

در بافتی مانند کبد که منطقه فعالیت‌های متابولیکی است، حفظ تعادل اکسیداتیو و آنتی‌اکسیداتیو اهمیت دارد. برای جلوگیری از آسیب‌های بافتی ناشی از استرس اکسیداتیو، بافت کبد آنزیم‌هایی مانند کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوکاتیون (Gpx) را برای مقابله با تأثیر بدتر رادیکال‌های آزاد و متعادل کردن مجدد سیستم اکسیداسیون و احیا به کار می‌گیرد (۲۸). برای ارزیابی تأثیر Flux و TQ بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی موش‌ها، فعالیت آنزیمی CAT، SOD و GPx و همچنین سطوح بافتی GSH را ارزیابی کردیم. در توافق با تأثیر Flux بر عوامل مرتبط با اکسیداتیو، تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که Flux به طور قابل توجهی فعالیت آنزیم‌های مرتبط با آنتی‌اکسیدان را در بافت کبد موش‌ها در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد (شکل ۱). از سوی دیگر، نتایج ما نشان داد که TQ می‌تواند به طور قابل توجهی از بافت کبد در برابر فلوکستین، احتمالاً از طریق تقویت فعالیت CAT، SOD و GPx در مقایسه با موش‌های تحت درمان با Flux محافظت کند (شکل ۱)، زمانی که موش‌ها با Flux-plus-TQ تحت درمان قرار گرفتند، متوجه شدیم که نه تنها

در شکل ۱ هر مقدار نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار هشت موش است. Control، گروه کنترل؛ FLU، موش‌های صحرایی فقط فلوکستین (۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) FLU+SIL، موش‌های تحت درمان با فلوکستین به همراه سیلیمارین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و FLU+TQ20، FLU+TQ40 و موش‌های که به ترتیب با فلوکستین به همراه تیموکینون در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تحت درمان قرار گرفتند.

$P < 0.05$  در مقابل گروه کنترل

$P < 0.05$  در مقابل گروه تجویز شده فقط با فلوکستین (FLU)

در شکل ۲ هر مقدار نشان‌دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار هشت موش است. Control، گروه کنترل؛ FLU، موش‌های صحرایی فقط فلوکستین (۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) FLU+SIL، موش‌های تحت درمان با فلوکستین به همراه سیلیمارین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و FLU+TQ20، FLU+TQ40 و موش‌های که به ترتیب با فلوکستین به همراه تیموکینون در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تحت درمان قرار گرفتند.

$P < 0.05$  در مقابل گروه کنترل

$P < 0.05$  در مقابل گروه تجویز شده فقط با فلوکستین (FLU)

جدول ۱- فهرست پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

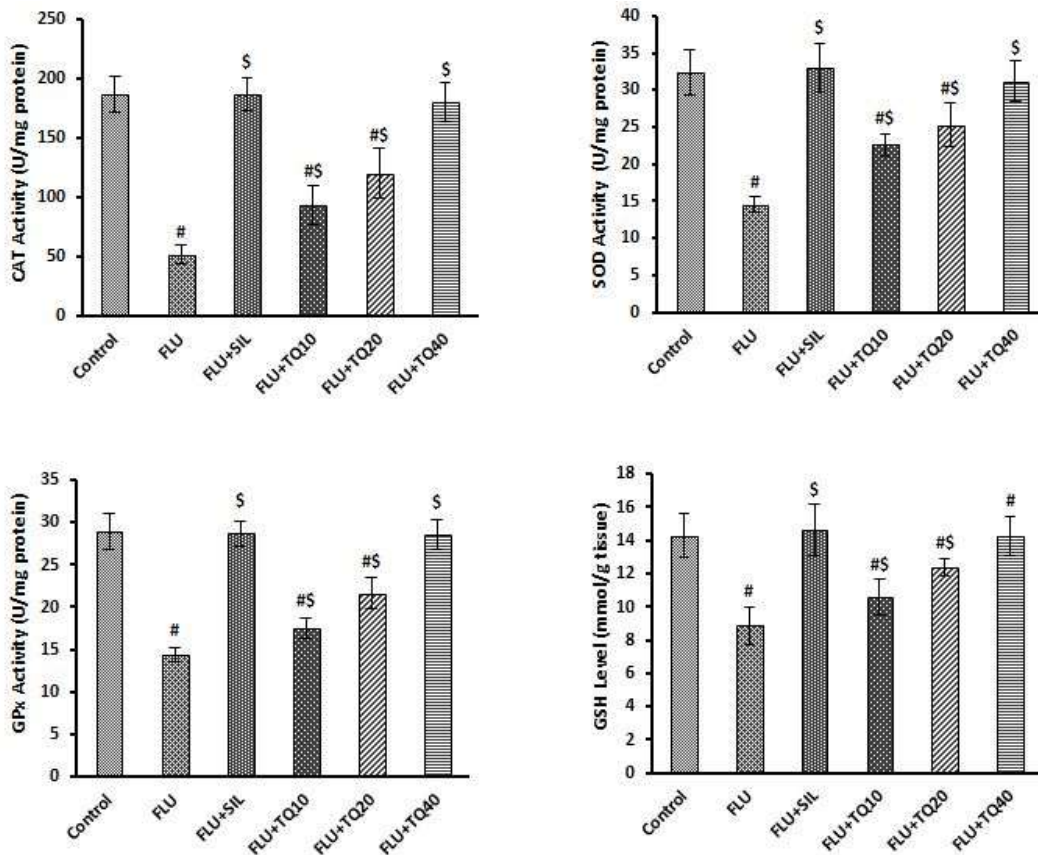
ژن	پرایمر مستقیم	پرایمر معکوس
$\beta$ -actin	5'-GCCAACCGTGAAAAGATGAC-3'	5'-AGCGCGTAACCCCTCATAGAT-3'
TNF- $\alpha$	5'-CTGGCGTGTTCATCCGTCT-3'	5'-CGTGTGTTTCTGAGCATCGTAGT-3'

جدول ۲- اثرات فلوکستین و تیموکینون بر شاخص‌های بیوشیمیایی در موش‌های صحرایی

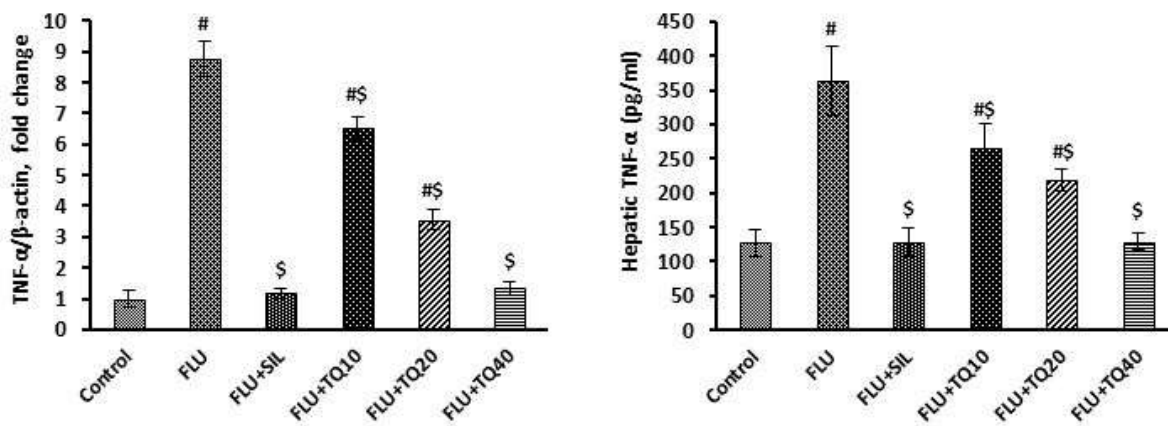
شاخص‌ها	کنترل	فلوکستین	فلوکستین و سیلی مارین	فلوکستین و تیموکینون ۱۰	فلوکستین و تیموکینون ۲۰	فلوکستین و تیموکینون ۴۰
آزمون‌های کبدی						
آلانین ترانسفراز (U/L)	۶۳/۶ $\pm$ ۶/۲	۱۳۵/۹ $\pm$ ۱۰/۷ <sup>a</sup>	۶۴/۵ $\pm$ ۴/۷ <sup>b</sup>	۹۴/۹ $\pm$ ۷/۱ <sup>abc</sup>	۷۷/۹ $\pm$ ۱۰/۸ <sup>abd</sup>	۶۴/۴ $\pm$ ۱۲/۸ <sup>bde</sup>
آسپاراتات (U/L) ترانسفراز	۱۵۹/۵ $\pm$ ۱۸/۷	۲۹۰/۹ $\pm$ ۱۶/۵ <sup>a</sup>	۱۶۰/۱ $\pm$ ۱۴/۱ <sup>b</sup>	۱۹۲ $\pm$ ۱۳ <sup>abc</sup>	۱۷۳/۱ $\pm$ ۹/۱ <sup>b</sup>	۱۴۸/۵ $\pm$ ۲۰/۷ <sup>bde</sup>
آلکالان فسفاتاز (U/L)	۱۸۵/۹ $\pm$ ۱۷/۵	۴۴۹/۷ $\pm$ ۴۷/۹ <sup>a</sup>	۱۸۶/۲ $\pm$ ۱۲/۱ <sup>b</sup>	۳۱۰/۴ $\pm$ ۴۷ <sup>abc</sup>	۲۵۰/۶ $\pm$ ۱۴/۵ <sup>abcd</sup>	۱۹۱/۶ $\pm$ ۲۱/۲ <sup>bde</sup>
بیلی روبین (mg/dl) توتال	۰/۸۶ $\pm$ ۰/۰۶	۲/۲۷ $\pm$ ۰/۷۱ <sup>a</sup>	۰/۸۶ $\pm$ ۰/۰۷ <sup>b</sup>	۱/۸۹ $\pm$ ۰/۱۳ <sup>ac</sup>	۱/۲۹ $\pm$ ۰/۱۵ <sup>bd</sup>	۰/۸۴ $\pm$ ۰/۱۱ <sup>bd</sup>
پروفایل لیپیدها						
تری گلیسرید (mg/dl)	۶۶/۱ $\pm$ ۴/۷	۱۳۴/۴ $\pm$ ۱۰/۴ <sup>a</sup>	۶۸ $\pm$ ۳/۳ <sup>b</sup>	۹۸ $\pm$ ۵/۶ <sup>abc</sup>	۸۲ $\pm$ ۷/۸ <sup>abcd</sup>	۶۶/۱ $\pm$ ۱۰/۹ <sup>bde</sup>
کلسترول (mg/dl)	۷۷/۵ $\pm$ ۵/۵	۱۲۶/۱ $\pm$ ۷	۷۷/۹ $\pm$ ۶/۱ <sup>b</sup>	۹۵/۵ $\pm$ ۷/۱ <sup>abc</sup>	۸۷/۲ $\pm$ ۷/۲ <sup>b</sup>	۷۶/۶ $\pm$ ۸/۳ <sup>bde</sup>
لیپوپروتئین با چگالی کم (mg/dl)	۲۳/۱ $\pm$ ۴/۱	۶۱/۸ $\pm$ ۱۱/۹ <sup>a</sup>	۲۳/۲ $\pm$ ۲/۳ <sup>b</sup>	۴۴/۴ $\pm$ ۶/۳ <sup>abc</sup>	۳۷/۱ $\pm$ ۷/۶ <sup>abc</sup>	۲۲ $\pm$ ۶/۱ <sup>bde</sup>
لیپوپروتئین با چگالی بسیار کم (mg/dl)	۱۳/۲ $\pm$ ۰/۹	۲۸/۷ $\pm$ ۲/۱ <sup>a</sup>	۱۳/۶ $\pm$ ۰/۷ <sup>b</sup>	۱۹/۶ $\pm$ ۱/۱ <sup>abc</sup>	۱۶/۴ $\pm$ ۱/۶ <sup>abcd</sup>	۱۳/۲ $\pm$ ۲/۲ <sup>bde</sup>
لیپوپروتئین با چگالی بالا (mg/dl)	۳۷/۶ $\pm$ ۲/۸	۱۴/۷ $\pm$ ۳/۴ <sup>a</sup>	۳۷/۸ $\pm$ ۳/۲ <sup>b</sup>	۲۲/۷ $\pm$ ۳ <sup>abc</sup>	۲۶/۶ $\pm$ ۲/۹ <sup>abc</sup>	۳۶/۴ $\pm$ ۲/۹ <sup>bde</sup>

جدول ۳- اثرات Flux و TQ بر شاخص‌های اکسیداتیو در موش‌های صحرایی

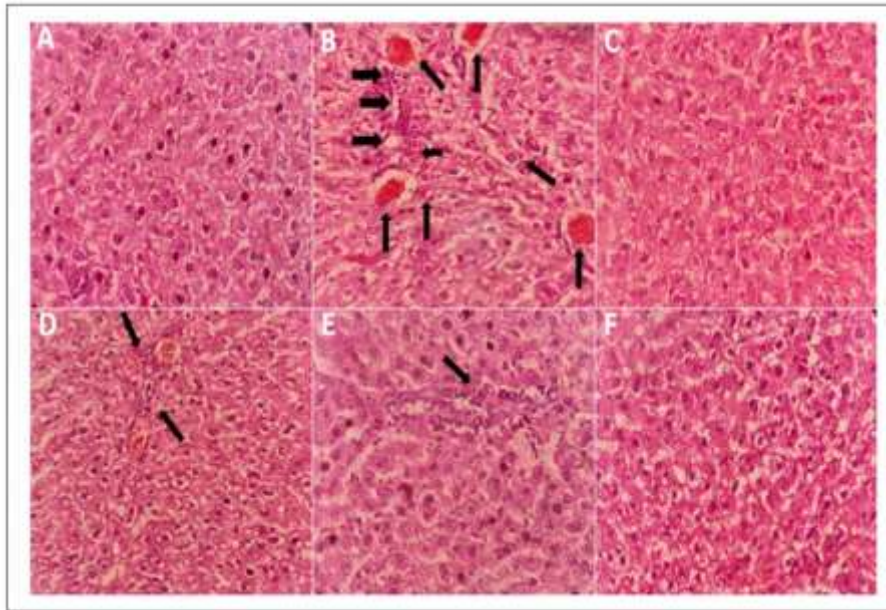
شاخص‌ها	کنترل	فلوکستین	فلوکستین و سیلی مارین	فلوکستین و تیموکینون ۱۰	فلوکستین و تیموکینون ۲۰	فلوکستین و تیموکینون ۴۰
مالون دی آلدئید سرم (nmol/L)	۸/۵۲ $\pm$ ۰/۵۷	۱۹/۵۸ $\pm$ ۱/۳۰ <sup>a</sup>	۸/۶۰ $\pm$ ۰/۵۴ <sup>b</sup>	۱۴/۹۹ $\pm$ ۰/۸۳ <sup>abc</sup>	۱۲/۶۰ $\pm$ ۱/۷۳ <sup>abcd</sup>	۸/۹۲ $\pm$ ۱/۴۳ <sup>bde</sup>
مالون دی آلدئید کبد (nmol/mg protein)	۱/۵۷ $\pm$ ۰/۱۹	۵/۷۷ $\pm$ ۰/۸۴ <sup>a</sup>	۱/۵۵ $\pm$ ۰/۱۷ <sup>b</sup>	۳/۹۸ $\pm$ ۰/۳۱ <sup>abc</sup>	۲/۹۹ $\pm$ ۰/۵۸ <sup>abcd</sup>	۱/۷۶ $\pm$ ۰/۵۱ <sup>bde</sup>
پروتئین کربونیل (nmol/mg protein)	۴/۴۰ $\pm$ ۰/۵۵	۱۱/۱۹ $\pm$ ۱/۰۱ <sup>a</sup>	۴/۵۱ $\pm$ ۰/۶۷ <sup>b</sup>	۹/۱۰ $\pm$ ۰/۹۳ <sup>abc</sup>	۷/۲۷ $\pm$ ۱/۳۱ <sup>abcd</sup>	۴/۵۵ $\pm$ ۰/۶۳ <sup>bde</sup>
ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (μM)	۶۱۶/۱ $\pm$ ۵۲/۴	۳۶۹/۲ $\pm$ ۳۸/۸ <sup>a</sup>	۶۰۶/۵ $\pm$ ۳۸/۷ <sup>b</sup>	۵۱۸/۱ $\pm$ ۴۵/۸ <sup>abc</sup>	۵۴۶/۲ $\pm$ ۳۸/۸ <sup>ab</sup>	۶۰۴/۱ $\pm$ ۴۴/۱ <sup>abcd</sup>



شکل ۱- اثر FLU، TQ و سیلیمارین بر فعالیت آنزیمی و سطوح سرمی CAT، SOD، GPx و GSH در بافت کبد



شکل ۲- اثر FLU، TQ و سیلیمارین بر سطوح سرمی و بیان ژن TNF-α در بافت کبد



شکل ۳- اثرات Flux، TQ و silymarin بر ویژگی مورفولوژی سلول‌های کبدی (بزرگنمایی X ۴۰۰)

(A) گروه کنترل؛ (B) موش مواجهه شده با فلوکسیستین. (C) موش‌های مواجهه شده با فلوکسیستین و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن سیلی‌مارین. (D) (E) و (F) موش‌های مواجهه شده با Flux و دوزهای مختلف تیموکینون به ترتیب با ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن. فلش‌های سیاه نشان‌دهنده ارتشاح لنفوسیتی است.

### بحث

بیش از حد لیپیدی باعث افزایش نفوذپذیری غشای سلول‌های کبدی می‌شود و این اتفاق منجر به نشت ALT و AST به سرم و تغییر پروفایل لیپیدی می‌شود (۳۵). جالب توجه است، نتایج ما نشان داد که Flux نه تنها باعث پراکسیداسیون لیپیدی و همچنین اکسیداسیون پروتئین می‌شود (همان‌طور که با افزایش سطح کبدی محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA) و پروتئین کربونیل (PC) آشکار شد) بلکه پروفایل لیپیدی سرم را نیز مختل کرد. با توجه به اثرات سمی Flux بر عملکرد سلول‌های کبد، هدف ما بررسی این بود که آیا تیموکینون، یک ترکیب فعال موجود در اسانس حاصل از سیاه‌دانه، می‌تواند از سلول‌های کبدی موش‌ها در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از فلوکسیستین محافظت کند یا خیر.

نتایج ما نشان داد که وقتی موش‌های تحت درمان با Flux در معرض TQ قرار گرفتند، این عامل با موفقیت آسیب‌های ناشی از Flux را معکوس کرد. ما دریافتیم که در سرم موش‌های تحت درمان با Flux-plus-TQ، کاهش قابل توجهی در شاخص‌های بیوشیمیایی و همچنین MDA و PC وجود دارد. جالب‌تر اینکه، در حالی که Flux سیستم آنتی‌اکسیدانی را در سلول‌های کبدی موش‌ها تضعیف می‌کند، TQ سطح سرمی FRAP و GSH را که دو شاخص سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی هستند، افزایش می‌دهد. وقتی صحبت از سیستم اکسیداتیو می‌شود، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و

کبد به‌عنوان محل اولیه و حیاتی فعال‌سازی و سم‌زدایی دارو، همواره در معرض خطر سمیت مواد شیمیایی است. پراکسیداسیون بیش از حد لیپیدی یا اکسیداسیون پروتئین به دلیل متابولیسم دارو، رادیکال‌های آزاد تولید می‌کند که به نوبه خود، مجموعه‌ای از حوادث منجر به آسیب کبدی و اختلال عملکرد کبدی را تنظیم می‌کند (۳۱). فهرست داروهایی که می‌توانند مسمومیت کبدی ایجاد کنند، هر روز با سرعت شگفت‌انگیزی در حال افزایش است. داروی ضد افسردگی فلوکستین (Flux) یکی از داروهایی است که اثرات مخرب آن بر روی سلول‌های کبدی در مطالعات قبلی به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است (۳۲ و ۳۳).

در مطالعه حاضر، ما دریافتیم که وقتی موش‌ها به مدت ۴ هفته با فلوکسیستین (۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت خوراکی تحت درمان قرار گرفتند، سطح سرمی نشانگرهای اختصاصی کبد، از جمله ALT، AST، ALP و TB افزایش یافت که نشان می‌دهد احتمالاً فلوکسیستین در سلول‌های کبدی سمیت ایجاد می‌کند. Gaerthner و همکاران نیز نشان داده‌اند که بین سطوح سرمی ALT و استفاده از کلوزاپین، یکی دیگر از داروهای ضدافسردگی، ارتباط وجود دارد. آنها گزارش کردند که ۴۰ درصد از بیماران که با کلوزاپین درمان شده‌اند، مقادیر ALT بالایی دارند (۳۴). ادعا شده است که پراکسیداسیون



نتایج ما نشان داد که TQ می‌تواند از طریق القای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، اثرات محافظتی کبدی در برابر Flux اعمال کند، همان‌طور که تجویز تیموکینون با کاهش اکسیداسیون لیپید/پروتئین، افزایش فعالیت کاتالیزوری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، و کاهش سیتوکین التهابی همراه شد. این عامل همچنین در بازیابی سطوح سرمی شاخص‌های بیوشیمیایی مانند پروفایل لیپیدی و نشانگرهای ویژه کبدی موفق بود. از آنجایی که TQ می‌تواند ارزش درمانی خود را در دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اعمال کند که به‌طور قابل‌توجهی کمتر از مقدار LD50 آن است، نتایج مطالعه حاضر می‌تواند نشان دهد که این جزء اسانس حاصل از سیاه‌دانه می‌تواند در کنار Flux مورد استفاده قرار گیرد تا آسیب کبدی ناشی از آن کاهش یابد.

## References

- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 2003;289:3095-105. doi: 10.1001/jama.289.23.30950
  - Thompson SM, Kallarackal AJ, Kvarata MD, Van Dyke AM, LeGates TA, Cai X. An excitatory synapse hypothesis of depression. *Trends Neurosci* 2015;38:279-94. doi: 10.1016/j.tins.2015.03.003
  - Yirmiya R, Rimmerman N, Reshef R. Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci* 2015;38:637-58. doi: 10.1016/j.tins.2015.08.001
  - Hodes GE, Kana V, Menard C, Merad M, Russo SJ. Neuroimmune mechanisms of depression. *Nat Neurosci* 2015;18:1386-93. doi: 10.1038/nn.4113
  - Lang UE, Borgwardt S. Molecular mechanisms of depression: perspectives on new treatment strategies. *Cell Physiol Biochem* 2013;31:761-77. doi: 10.1159/000350094
  - Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Warden D, Ritz L, et al. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry* 2006;163:28-40. doi: 10.1176/appi.ajp.163.1.28
  - Perez-Caballero L, Torres-Sanchez S, Bravo L, Mico JA, Berrocoso E. Fluoxetine: a case history of its discovery and preclinical development. *Expert Opin Drug Discov* 2014;9:567-78. doi: 10.1517/17460441.2014.907790
  - Emslie GJ, Heiligenstein JH, Wagner KD, Hoog SL, Ernest DE, Brown E, et al. Fluoxetine for acute treatment of depression in children and adolescents: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2002;41:1205-15. doi: 10.1097/00004583-200210000-00010
  - Nikam BP, Kale M, Jamale V, Arora T, Hussain A, Shrivastav N. Safety and efficacy of fluoxetine in the treatment of acne exacerbation: a double-blind, placebo-controlled study. *Iranian Journal of Dermatology* 2020;23:98-104. doi: 10.22034/ijd.2020.111546
  - Hiemke C, Hartter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther* 2000;85:11-28. doi: 10.1016/s0163-7258(99)00048-0
  - Inkiewicz-Stepniak I. Impact of fluoxetine on liver damage in rats. *Pharmacol Rep* 2011;63:441-7. doi: 10.1016/s1734-1140(11)70510-2
  - Lee JY, Lee HE, Kang SR, Choi HY, Ryu JH, Yune TY. Fluoxetine inhibits transient global ischemia-induced hippocampal neuronal death and memory impairment by preventing blood-brain barrier disruption. *Neuropharmacology* 2014;79:161-71. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.11.011
- گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) شناخته‌شده‌ترین آنزیم‌هایی هستند که فعالیت آنها باعث کاهش میزان رادیکال‌های آزاد در سلول‌های کبدی می‌شود (۳۶). از طریق تخریب رادیکال‌های آزاد، این آنزیم‌ها یکپارچگی غشای سلول‌های کبدی را حفظ می‌کنند و از آپوپتوز سلولی با واسطه میتوکندری جلوگیری می‌کنند (۳۶). در راستای اثرات اکسیداتیو Flux، فعالیت کاتالیزوری این آنزیم‌ها نیز به‌طور قابل توجهی در موش کاهش یافت، که نشان می‌دهد احتمالاً Flux با جلوگیری از فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی، استرس اکسیداتیو طولانی مدت را در سلول‌های کبدی ایجاد می‌کند. برعکس، موش‌هایی که با ترکیب Flux و TQ تحت درمان قرار گرفتند، افزایش فعالیت SOD، CAT و GPx را نشان دادند. در این راستا، کسب و همکاران. همچنین نشان داده‌اند که TQ می‌تواند سمیت اکسید نیتريت را در موش‌های بیمار شده با آرسنات سدیم از طریق افزایش فعالیت GPx، GSH، SOD و CAT خنثی کند (۳۷). در یک مطالعه دیگر در مدل حاد پروستاتیت ایجاد شده توسط سودوموناس در موش، TQ نشان داد که می‌تواند فعالیت آنزیم‌های مرتبط با آنتی‌اکسیدان را افزایش دهد و ویژگی هیستوپاتولوژیک پروستات را بهبود بخشد (۳۸). با توجه به این موارد، منطقی است که فرض کنیم شاید TQ از اثرات سمی Flux بر روی سلول‌های کبدی از طریق تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی جلوگیری کند.
- فعال شدن استرس اکسیداتیو در سلول‌های کبدی، علاوه بر اثرات مضر آن بر عملکرد سلول‌ها، می‌تواند پاسخ‌های پیش‌التهابی را فعال کند (۳۹). هنگامی که استرس اکسیداتیو در سلول‌ها منتشر می‌شود، فعالیت رونویسی NF-kB را فعال می‌کند، که بیان طیف وسیعی از ژن‌ها، به‌ویژه سایتوکاین‌های التهابی را از طریق انتقال به هسته تسهیل می‌کند (۴۰). در مطالعه حاضر، ما دریافتیم که Flux همچنین می‌تواند بیان TNF- $\alpha$  را در بافت کبدی موش‌ها افزایش دهد. TNF- $\alpha$  ارتشاح لنفوسیت‌ها را به محل آسیب دیده برای انتشار پاسخ‌های التهابی افزایش می‌دهد (۴۱). بر این اساس، نتایج ما نشان داد که درمان فلوکسیتین با ارتشاح لنفوسیت‌ها به بافت کبد همراه بود. این نشان می‌دهد که Flux ممکن است اثرات پیش‌التهابی داشته باشد. اما نکته قابل توجه این بود که TQ در دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نه تنها بیان این سایتوکاین پیش‌التهابی را در سلول‌های کبدی کاهش داد، بلکه می‌تواند اثرات سمی Flux را بر روی سلول‌های کبدی از طریق جلوگیری از مهاجرت لنفوسیت‌ها بازیابی کند. مطابق با یافته‌های ما، نشان داده شده است که TQ همچنین می‌تواند اثرات سمی داروهای ضد سل را بهبود بخشد و مورفولوژی سلول‌های کبدی را از طریق کاهش نکروز بافتی و آپوپتوز بهبود بخشد (۴۲).

13. Bendele RA, Adams ER, Hoffman WP, Gries CL, Morton DM. Carcinogenicity studies of fluoxetine hydrochloride in rats and mice. *Cancer Res* 1992;52:6931-5.
14. Shanthakumari D, Srinivasalu S, Subramanian S. Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats. *Toxicology* 2004;204:219-28. doi: 10.1016/j.tox.2004.06.058
15. Gałecki P, Szymraj J, Bienkiewicz M, Zboralski K, Gałecka E. Oxidative stress parameters after combined fluoxetine and acetylsalicylic acid therapy in depressive patients. *Hum Psychopharmacol* 2009;24:277-86. doi: 10.1002/hup.1014
16. Hajizadeh Z, Soleimani Mehranjani M, Najafi G, Shariatzadeh SMA, Shalazar Jalali A. Black grape seed extract modulates fluoxetine-induced oxidative stress and cytotoxicity in the mouse testis. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 2016;11. doi: 10.17795/jjnpp-27512
17. Karimi-Khouzani O, Heidarian E, Amini SA. Anti-inflammatory and ameliorative effects of gallic acid on fluoxetine-induced oxidative stress and liver damage in rats. *Pharmacol Rep* 2017;69:830-5. doi: 10.1016/j.pharep.2017.03.011
18. Nili-Ahmadabadi A, Tavakoli F, Hasanzadeh G, Rahimi H, Sabzevari O. Protective effect of pretreatment with thymoquinone against Aflatoxin B(1) induced liver toxicity in mice. *Daru* 2011;19:282-7.
19. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res* 2003;17:299-305. doi: 10.1002/ptr.1309
20. Aycan IO, Tokgoz O, Tufek A, Alabalik U, Evliyaoglu O, Turgut H, et al. The use of thymoquinone in nephrotoxicity related to acetaminophen. *Int J Surg* 2015;13:33-7. doi: 10.1016/j.ijsu.2014.11.020
21. Badary OA, Nagi MN, al-Shabanah OA, al-Sawaf HA, al-Sohaibani MO, al-Bekairi AM. Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75:1356-61.
22. Effenberger K, Breyer S, Schobert R. Terpene conjugates of the *Nigella sativa* seed-oil constituent thymoquinone with enhanced efficacy in cancer cells. *Chem Biodivers* 2010;7:129-39. doi: 10.1002/cbdv.200900328.
23. Valizadeh N, Zakeri H, Shafiee A, Sarkhail P, Heshmat R, Sereshti H, et al. Impact of Black seed (*Nigella sativa*) extract on bone turnover markers in postmenopausal women with osteoporosis. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015:20-5.
24. Heidarian E, Soofiniya Y. Hypolipidemic and hypoglycemic effects of aerial part of *Cynara scolymus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Plant Res* 2011;5:2717-23. doi: 1996-0875 ©2011
25. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology* 233: Elsevier; 1994. p. 357.63-7.
26. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-7. doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6
27. Bancroft JD, Gamble M. Theory and practice of histological techniques: Elsevier health sciences;2008.
28. Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. *Ann Hepatol* 2004;3:86-92.
29. Fujihara J, Tongu M, Hashimoto H, Fujita Y, Nishimoto N, Yasuda T, et al. Pro-inflammatory responses and oxidative stress induced by ZnO nanoparticles in vivo following intravenous injection. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015;19:4920-6.
30. Liu L, Tao R, Huang J, He X, Qu L, Jin Y, et al. Hepatic oxidative stress and inflammatory responses with cadmium exposure in male mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015;39:229-36. doi:10.1016/j.etap.2014.11.029
31. Zhan X, Wang F, Gevaert O. Filter drug-induced liver injury literature with natural language processing and ensemble learning. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 2022. doi: 10.48550/arXiv.2203.11015
32. Hong-Mei Z, Guang-Chen L, Yang-Fang H, Zhou W, Hou J-Q. Liver injury induced by the interaction between fluoxetine and celecoxib: a case report and the literature review. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 2019;21. doi: 10.5812/ircmj.93271
33. Gaertner I, Altendorf K, Batra A, Gaertner HJ. Relevance of liver enzyme elevations with four different neuroleptics: a retrospective review of 7,263 treatment courses. *J Clin Psychopharmacol* 2001;21:215-22. doi: 10.1097/00004714-200104000-00014
34. Yajima D, Motani H, Hayakawa M, Sato Y, Sato K, Iwase H. The relationship between cell membrane damage and lipid peroxidation under the condition of hypoxia-reoxygenation: analysis of the mechanism using antioxidants and electron transport inhibitors. *Cell Biochem Funct* 2009;27:338-43. doi: 10.1002/cbf.15780
35. Muradian KK, Utoko NA, Fraifeld V, Mozzhukhina TG, Pishel IN, Litoshenko AY. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the liver of young and old mice: linear regression and correlation. *Arch Gerontol Geriatr* 2002;35:205-14. doi: 10.1016/s0167-4943(02)00025-0
36. Kassab RB, El-Hennamy RE. The role of thymoquinone as a potent antioxidant in ameliorating the neurotoxic effect of sodium arsenate in female rat. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 2019;4:160-7. doi: 10.1016/j.ejbas.2017.07.002
37. Rifaioglu MM, Nacar A, Yuksel R, Yonden Z, Karcioğlu M, Zorba OU, et al. Antioxidative and anti-inflammatory effect of thymoquinone in an acute *Pseudomonas* prostatitis rat model. *Urol Int* 2013;91:474-81. doi: 10.1159/000351261
38. Escobar J, Pereda J, Arduini A, Sandoval J, Sabater L, Aparisi L, et al. Cross-talk between oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in acute pancreatitis: a key role for protein phosphatases. *Curr Pharm Des* 2009;15:3027-42. doi: 10.2174/138161209789058075
39. Timucin AC, Basaga H. Pro-apoptotic effects of lipid oxidation products: HNE at the crossroads of NF-kappaB pathway and anti-apoptotic Bcl-2. *Free Radic Biol Med* 2017;111:209-18. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.010
40. Mbow ML, Rutti B, Brossard M. Infiltration of CD4+ CD8+ T cells, and expression of ICAM-1, Ia antigens, IL-1 alpha and TNF-alpha in the skin lesion of BALB/c mice undergoing repeated infestations with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Immunology* 1994;82:596-602.
41. Jaswal A, Sinha N, Bhadauria M, Shrivastava S, Shukla S. Therapeutic potential of thymoquinone against anti-tuberculosis drugs induced liver damage. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013;36:779-86. doi: 10.1016/j.etap.2013.07.010



## Protective Effect of Thymoquinone Against Fluoxetine-Induced Liver Damage Through Enhancing Antioxidant and Anti-Inflammatory System in Male Rats

Ali Nouri (Ph.D.)<sup>1</sup>, Ghodratollah Panahi (Ph.D.)<sup>2</sup>, Nader Bagheri (Ph.D.)<sup>1</sup>, Reza Ahmadi (Ph.D.)<sup>1\*</sup>

1- Medical Plants Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

2- Dept. of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 23 January 2022, Accepted: 12 April 2022

### Abstract:

**Introduction:** Fluoxetine is a drug used to treat depression and has toxic effects on liver cells. Thymoquinone, the most important active ingredient in black seed (*Nigella sativa*), has several pharmacological effects, including sedation, reduced motor activity, and muscle relaxation. This study aimed to investigate the effect of thymoquinone on reducing the hepatotoxicity effects of fluoxetine.

**Methods:** A total of forty Wistar rats were treated with fluoxetine, thymoquinone, and silymarin for four weeks. Different techniques, including biochemical analysis, qRT-PCR, and histopathological examination, were performed to investigate the effect of drugs on the oxidant/antioxidant system and inflammatory responses.

**Results:** Our results revealed that fluoxetine increased lipid peroxidation and protein oxidation and inhibited antioxidant systems in rat hepatocytes. In addition, fluoxetine increased the expression of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  and also the migration of lymphocytes to liver cells. In contrast, thymoquinone (10, 20, and 40 mg/kg) significantly decreased MDA, PC, and TNF- $\alpha$  levels. Moreover, thymoquinone enhanced the catalytic activity of antioxidant enzymes, including catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and GSH. Thymoquinone only at a dose of 40 mg/kg can inhibit the infiltration of lymphocytes into the liver.

**Conclusion:** Thymoquinone exerted liver protective effects against fluoxetine hepatotoxicity by inducing antioxidant and anti-inflammatory activities. This study suggests that thymoquinone, in combination with fluoxetine, can be used to reduce liver damage.

**Keywords:** Fluoxetine, Liver damage, Thymoquinone, Antioxidant, Inflammation.

Conflict of Interest: No

\*Corresponding author: R. Ahmadi, Email: Ahmadi.r@skums.ac.ir

**Citation:** Nouri A, Panahi Gh, Bagheri N, Ahmadi R. Protective effect of thymoquinone against fluoxetine-induced liver damage through enhancing antioxidant and anti-inflammatory system in male rats. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;18(1):40-50.