

بررسی اثر حفاظتی عصاره هیدروالکلی گیاه پونه بیابانی (*Nepeta ispahanica* Boiss.) بر آسیب حاد کبدی القا شده با CCl_4 در موش‌های صحرائی نر: یک مطالعه تجربی

ایران پورابولی^۱, فهیمه فرزاد امیر ابراهیمی^{۲*}

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰۳/۲۷

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سوم شیمیایی از جمله تراکلرید کربن (CCl_4) موجب اختلال عملکرد کبد می‌شوند. در این راستا، اثر محافظتی کبدی آنتی‌اکسیدان‌ها در مطالعات پیشین تا حدودی مطالعه شده است. از آنجاییکه گیاهان از جمله گونه‌های *Nepeta* از منبع عمده آنتی‌اکسیدان‌ها هستند، مطالعه حاضر، با هدف بررسی اثر حفاظت کبدی عصاره هیدروالکلی *Nepeta ispahanica* در برابر آسیب حاد کبدی القا شده CCl_4 در موش‌های صحرائی نر انجام شد.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی، دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* و لگالون به موش‌های صحرائی نر به طور جداگانه خورانده شد و سپس آسیب حاد کبدی با تجویز خوارکی CCl_4 در پارافین مایع القا گردید. سپس بررسی فعالیت آنزیم‌های کبدی و میزان لیپید پراکسیداسیون در بافت کبد و پلاسمما و همچنین سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های سوبراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و مقدار گلوتاتیون (GSH) در بافت کبد مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: یافته‌های مطالعه نشان داد که تجویز ۱۰ روزه عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* با دوز ۵۰۰ mg/kg به طور معنی‌داری باعث کاهش فعالیت سرمی آنزیم‌های کبدی در مقایسه با گروه CCl_4 شد ($P < 0.01$). همچنین MDA بافت را به طور معنی‌داری کاهش ($P < 0.01$) و میزان SOD و CAT و GSH را افزایش داده ($P < 0.05$) و کبد را از آسیب‌های ناشی از CCl_4 محافظت کرد.

نتیجه‌گیری: بر اساس داده‌های مطالعه حاضر عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* اثر حفاظت نسبی روی آسیب کبدی القا شده با CCl_4 در موش‌های صحرائی نر داشته و این نقش احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در آن است.

واژه‌های کلیدی: آسیب حاد کبدی، لیپید پراکسیداسیون، CCl_4 , *Nepeta ispahanica*

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره پنجم، ص ۴۲۲-۴۱۰، مرداد ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، تلفن: +۹۸۳۴۳۲۸۱۲۵۵۴

Email: fahimeh.farzad95@yahoo.com

سلول می‌شود اشاره کرد. همچنین رادیکال‌های آزاد می‌توانند منجر به آلکیله شدن گروه‌های پروتئینی و دیگر ماکرومولکول‌های سلولی و حمله به اسیدهای چرب اشیاع گردند که باعث ایجاد آسیب کبدی می‌شود. آسیب به کبد باعث افزایش سطح آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آکالالین فسفاتاز (ALP)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و بیلی‌روبین می‌گردد که نشان دهنده آسیب کبدی می‌باشند^(۲، ۳).

امروزه، استفاده از درمان‌های دارویی متعدد برای درمان اختلالات کبدی با عوارض جانبی جدی همراه می‌باشند^(۱، ۷، ۸). بنابراین لازم است که درمان‌های دارویی جدیدتر برای درمان بیماری

مقدمه

تراکلرید کربن (CCl_4) یکی از انواع سموم کبدی می‌باشد، که در مطالعات مختلف بهمنظور القاء مدل‌های تجربی مورد استفاده قرار می‌گیرد^(۱). به صورت معمول، تراکلرید کربن توسط آنزیم‌های سیستم سم زدایی سیتوکروم P450 متابولیزه می‌شوند. این پاسخ باعث تولید چندین نوع رادیکال اکسیژن واکنشگر می‌شود^(۱-۳). در واقع، رادیکال‌های آزاد، میل ترکیبی بالایی برای واکنش با سایر بیومولکول‌ها دارند که می‌توانند منجر به تخریب بافتی و بروز انواع مختلفی از بیماری‌ها گردد^(۴-۶). از جمله اثرات رادیکال‌های آزاد می‌توان به القای پراکسیداسیون لیپیدها که منجر به آسیب غشای

^۱ دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

^۲ کارشناس ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران (نویسنده مسئول)

در گروههای مربوطه جهت القا آسیب حادکبدی، CCl_4 به نسبت ۵۰ درصد در پارافین مایع حل و با دوز $2/5 \text{ ml/kg}$ به موشها خورانده شد (۱۹).

گروههای حیوانی مورد مطالعه و روش تیماردهی:
در این مطالعه تجربی، ۳۰ سرموش صحرایی نر نژاد Wistar در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم از حیوانخانه مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان تهیه گردید. حیوانات در شرایط استاندارد دمای 24 ± 2 و ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند و قوانین اخلاقی مربوط به نگهداری و کار با این حیوانات در آزمایشگاه کاملاً رعایت شد. این مطالعه دارای کد اخلاق و کد تصویب (۲۳۶۷۶۷۹) از دانشگاه شهید باهنر کرمان میباشد. حیوانات مورد مطالعه به طور تصادفی به ۵ گروه ۶ تابی تقسیم شدند که شامل:

- کنترل (نرمال): روزانه $5/0$ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱۰ روز با روش گاواز دریافت کردند.
- التهابی: روزانه $5/0$ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱۰ روز با روش گاواز دریافت و سپس القا التهاب با خوراندن محلول تراکلرید کربن ($2/5 \text{ ml/kg}$) به نسبت ۵۰ درصد با پارافین مایع صورت گرفت.
- گروههای تیمار (۲ گروه): به ترتیب روزانه دوزهای 500 mg/kg از عصاره هیدروالکلی گیاه *N.ispahanica* به مدت ۱۰ روز با روش گاواز دریافت و سپس القا التهاب انجام شد.
- کنترل مثبت: روزانه 420 mg/kg Legalon به مدت ۱۰ روز با روش گاواز دریافت و سپس القا التهاب انجام شد.
- ۲۴ ساعت پس از القای التهاب در حالت ناشتا موشها با گاز CO_2 بیهوش شدند و خونگیری انجام شد. ضمناً نمونههای بافت کبد برای سنجش آنزیمی و لیپیدپراکسیداسیون در فریزر -80°C نگهداری شد.

روش سنجش آنزیم‌های کبدی و پارامترهای بیوشیمیایی سرم:

سرم نمونه‌های خون جمع‌آوری شده، توسط سانتریفیوژ (مدل ۵۴۳۰، شرکت سیگمه، کشور آلمان) با دور 320 rpm به مدت ۱۵ دقیقه جدا گردید و سنجش فاکتورهای سرمی (بیلی‌روبین، اوره، ALT، AST) به روش اسپکتروفوتومتری با کیت‌های شرکت پارس آزمون انجام شد.

روش سنجش میزان مالون دی آلدهید (MDA) در پلاسمما:

برای سنجش اندکس سنجش پراکسیداسیون لیپید (مالون دی آلدهید) از روش Kurtel و همکاران استفاده شد، در این روش حجم معینی از پلاسما با تری کلرواستیک اسید ۱۵ درصد، تیوباربیتویریک

کبد بویژه عواملی که از منابع طبیعی سرچشمه گرفته‌اند مورد ارزیابی قرار گیرد. گیاهان دارویی منابع بسیار خوبی از ترکیبات طبیعی مانند اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها هستند که در شرایط آزمایشگاهی خاصیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان داده شده و قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد و محافظت از کبد در مقابل آسیبهای ناشی از CCl_4 هستند (۱۴-۹). Nepeta (Lamiaceae) معروف به "Poone-sa"، دارای ۲۵۰ گونه است. از دیرباز گونه‌های مختلف آن‌ها در طب سنتی جهت درمان بیماری‌های متعددی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵). یکی از گونه‌های انديك *An* که *Nepeta ispahanica* بصورت خود رویش در ایران رشد می‌کند *Nepeta Boiss* (N.ispahanica) است که در برخی مطالعات بهمنظور بررسی خواص بیولوژیک آن مورد ارزیابی قرار گرفته است گونه‌های متعدد *Nepeta* دارای ترکیبات مختلفی متشکل از فلاونوئیدها، ترپنoidها و ترکیبات فنولیک می‌باشند که دارای خواص و اثرات درمانی در طیف وسیعی از جمله خواص ضد التهابی، ضد توموری، و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. درواقع این ترکیبات آنتی‌اکسیدانهای طبیعی بالقوه می‌باشند. در اثرات در مطالعات تجربی به تأیید رسیده است (۱۶-۱۸). علیرغم مطالعات مختلف بر روی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی گونه‌های *Nepeta*، بررسی اثرات حفاظتی عصاره هیدروالکلی گیاه *N.ispahanica* بر آسیب حاد کبدی القاشه با CCl_4 مورد مطالعه قرار نگرفته است. از این روش پژوهش حاضر اثر آنتی‌اکسیدانی و حفاظتی عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* بر درمان مسمومیت کبدی القاشه توسط تراکلرید کربن در موش‌های صحرایی بالغ بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

روش تهیه عصاره گیاهی:

بهمنظور تهیه عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica*، بخش‌های هوایی گیاه شامل برگ‌ها و سرشاخه‌ها و میوه‌ها در خردآدماه از منطقه ماهان در استان کرمان جمع‌آوری گردید و توسط دکتر میرتاج الدینی، گیاه شناس گروه زیست شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان، شناسایی و مورد تأیید قرار گرفت. سپس این بخش‌ها خشک و توسط آسیاب الکتریکی پودر شد، مقداری از این پودر به مدت ۲۴ ساعت در متانول 80 درصد خیسانده شد و به روش ماسرسایون عصاره گیری انجام شد (Chattopadhyay 1999). حلال عصاره حاصله با دستگاه SB1100 Rotary evaporator (مدل Eyela، کشور ژاپن) حذف و در نهایت در آون 40 درجه سانتی گراد خشک گردید. این عصاره در آب مقطر با دوزهای مورد نظر تهیه و به روش گاواز به موش‌ها خورانده شد.

روش القاء آسیب حاد کبدی:

۲۴۰ نانومتر در طی ۱ دقیقه، تعیین گردید و میزان کاهش جذب در دقیقه ارزیابی شد و میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین بافت محاسبه شد (۲۳).

سنجدش فعالیت SOD به روش Giannopolitis and Ries آنجام شد. در این روش، بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار، pH=۷، سدیم EDTA ۰/۱ مولار، متیونین ۱۳ میلی مولار، ریبوфلافوین ۷۵ میکرومولار و NBT ۰/۰۷۵ میکرومولار، به عصاره بافت اضافه شد و در معرض نور فلورسنت برای ۱۵ دقیقه قرار گرفت و سپس میزان جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر در مقابل بلانک خوانده شد. جذب گروههای شاهد و کنترل ۱۰۰ هم تعیین شد. میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین بافت محاسبه شد (۲۴).

روش سنجش پروتئین در بافت کبد:

سنجدش پروتئین در بافت کبد، به روش برادرفورد و با استفاده از معرف بیوره انجام و میزان جذب نمونهها در طول موج ۵۹۵ نانومتر در مقابل بلانک خوانده شد و بر اساس منحنی استاندارد BSA (آلبومین سرم گاوی) مقدار پروتئین تعیین شد (۲۵).

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها:

نرم‌افزار spss نسخه ۱۶ برای آنالیز داده‌ها استفاده و با نوچه به مستقل بودن گروه‌ها و نرمال بودن توزیع داده‌ها بر اساس آزمون کولموگروف - اسمیرنوف، مقایسه بین میانگین داده‌ها در گروه‌های مختلف توسط تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعییبی Tukey انجام و $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری محسوب می‌شود. داده‌ها به صورت انحراف معیار \pm میانگین گزارش می‌شود.

یافته‌ها

اثر تجویز خوراکی مقادیر مختلف (۳۰۰ و ۵۰۰ mg/kg)

عصاره هیدروالکلی Legalon و *N.isphahanica* (۴۲۰ mg/kg) بر سطح سرمی ALT

نتایج مطالعه نشان داد که در مقایسه گروه دارای آسیب حاد کبدی (دریافت کننده CCl₄) با گروه کنترل، افزایش معنی‌داری در سطوح سرمی ALT در گروه CCl₄ وجود داشت. تجویز ۱۰ روزه عصاره سبب کاهش معنی‌داری میزان ALT سرم در گروه‌های دریافت کننده دوز ۵۰۰ mg/kg و Legalon قبل از دریافت CCl₄ گردید (نمودار ۱).

اسید ۳۷۵ /۰ درصد و اسید کلریدریک ۲۵ /۰ درصد مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰ g سانتریفیوژ شد، سپس مایع رویی را جدا کرده و با بوتیل هیدروکسی تولوئن ۲ /۰ درصد (BHT) مخلوط کرده و مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری با دمای ۹۵ درجه قرار داده شد و سپس بلافالسله در آب سرد داده شد و میزان جذب آن را در طول موج ۵۳۲ نانومتر در مقابل بلانک خوانده و با در نظر گرفتن ضریب جذب مولی مقدار MDA محاسبه گردید (۲۰).

روش سنجش میزان MDA در بافت کبد:

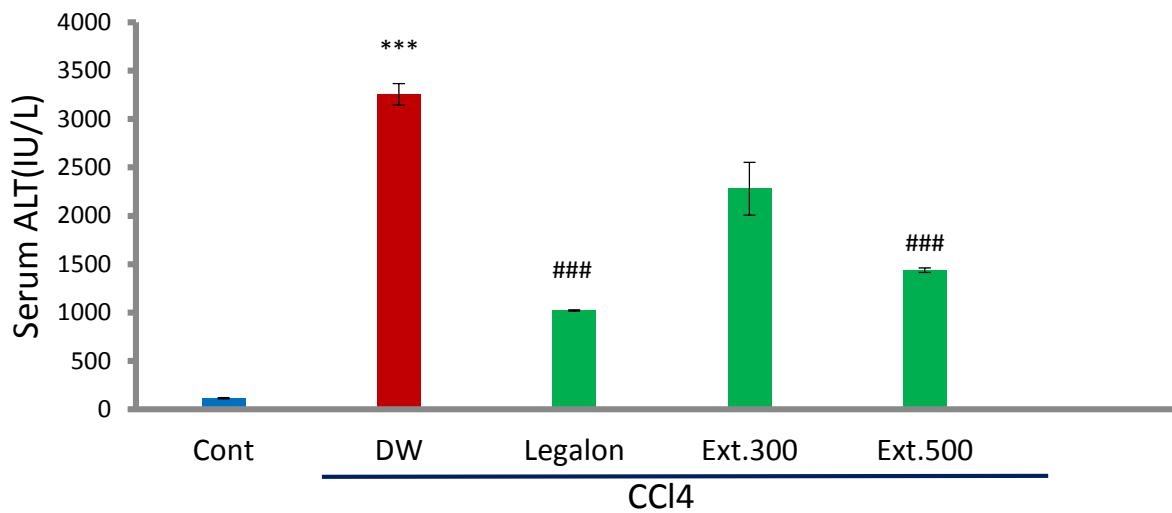
برای تعیین میزان اندکس سنجش پراکسیداسیون لیپید (MDA)، مقداری از بافت کبد در سوکروز هموژن شده و سپس طی دو مرحله سانتریفیوژ به مدت‌های ۱۰ دقیقه در g ۳۰ و ۱۰۰ در g ۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. حجم معینی از محلول رویی را با ۸/۱ SDS ۲۰ درصد، اسید استیک pH=۳/۵، TBA ۸/۰ درصد مخلوط کرده و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در بن ماری دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده، پس از سرد شدن و مخلوط کردن با TCA، سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. نانومتر در مقابل بلانک خوانده و با در نظر گرفتن ضریب جذب مولی، مقدار MDA به ازای هر گرم بافت تعیین شد (۲۱).

روش سنجش میزان گلوتاتیون (GSH) در بافت کبد:

برای تعیین میزان GSH، مقداری از بافت کبد در EDTA هموژن شده و سپس حجم معینی از محلول هموژن را با آب قطره و TCA مخلوط کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در g ۳۰۰۰ سانتریفیوژ کرده، مقدار معینی از محلول رویی را با بافر تربیس pH=۸/۹ و معرف‌المن (DTNB) مخلوط و سپس میزان جذب آن در طول موج ۴۱۲ نانومتر در مقابل بلانک خوانده و با در نظر گرفتن ضریب جذب مولی میزان GSH در هر گرم بافت تعیین شد (۲۲).

روش سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT):

مقداری از بافت کبد را در بافر فسفات ۰/۰۵ مولار pH=۷ هموژن شده، به مدت ۲ دقیقه در g ۷۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی برای سنجش مقدار پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی CAT و SOD به کار رفت. سنجش فعالیت CAT به روش Aebi انجام شد. فعالیت این آنزیم در بافت بر اساس توانایی آن برای تجزیه H2O2 در طول موج



نمودار (۱): اثر پیش تیمار با مقادیر مختلف (۴۲۰ mg/kg) Legalon و N.ispahanica عصاره هیدرولکلی در موش‌های صحرایی نر، پس از القا آسیب حاد کبدی با CCl₄. نتایج به صورت Mean±S.E.M نمایش داده شده است (n=6).

نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه DW + CCl₄ می‌باشد.

*** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد.

P < 0.001 ***

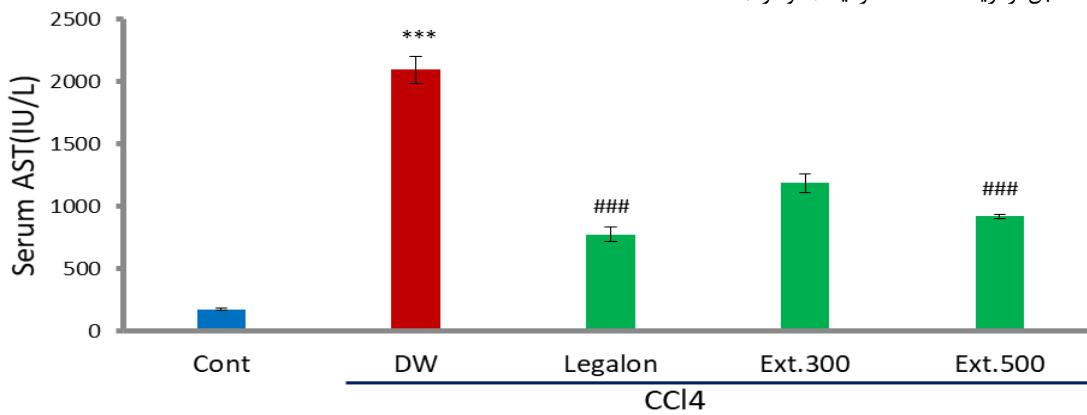
P < 0.05 #

P < 0.001 ***

آب مقطّر DW

اثر تجویز خوراکی مقادیر مختلف (۴۲۰ mg/kg) Legalon و N.ispahanica بر سطح سرمی AST

مقایسه سطح سرمی AST در گروه دارای آسیب حاد کبدی (دریافت کننده تراکلرید کرین) با گروه کنترل نشان دهنده افزایش معنی‌داری در گروه CCl₄ می‌باشد. تجویز ۱۰ روزه عصاره سبب کاهش معنی‌داری میزان AST سرم در گروه‌های دریافت کننده دوز ۵۰۰ mg/kg و Legalon قبل از دریافت CCl₄ گردید (نمودار ۲).



نمودار (۲): اثر پیش تیمار با مقادیر مختلف (۴۲۰ mg/kg) Legalon و N.ispahanica عصاره هیدرولکلی در موش‌های صحرایی نر، پس از القا آسیب حاد کبدی با CCl₄. نتایج به صورت Mean±S.E.M نمایش داده شده است (n=6).

نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه DW + CCl₄ می‌باشد.

*** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد.

P < 0.001 ***

P < 0.01 ##

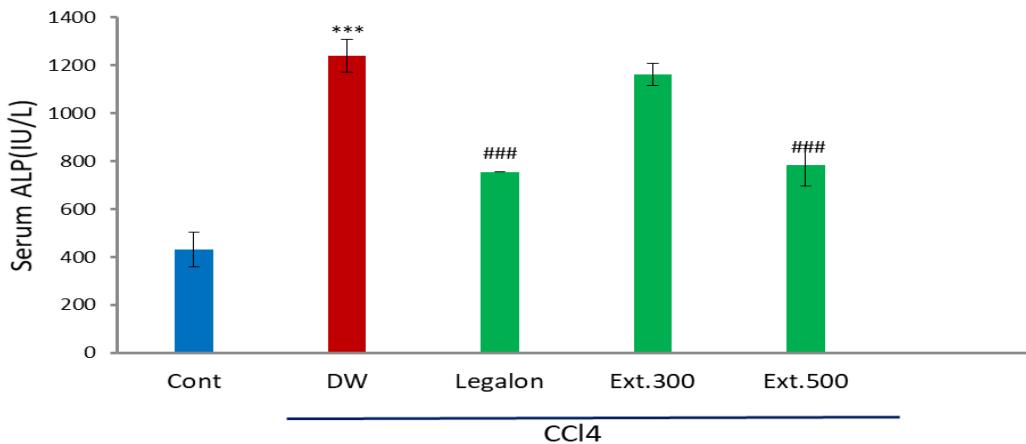
P < 0.05 #

P < 0.001 ***

آب مقطّر DW

اثر تجویز خوراکی مقادیر مختلف (۴۲۰ mg/kg) Legalon و *N.ispahanica* بر سطح سرمی ALP:

مقایسه سطح سرمی ALP در گروه دارای آسیب حاد کبدی (دربافت کننده تتراکلرید کربن) با گروه کنترل نشان دهنده افزایش معنی داری ALP در گروه CCl₄ می باشد. تجویز ۱۰ روزه عصاره سبب کاهش معنی داری میزان ALP سرم در گروه های دریافت کننده دوز ۵۰۰ mg/kg و قبلاً از دریافت CCl₄ گردید (نمودار ۳).

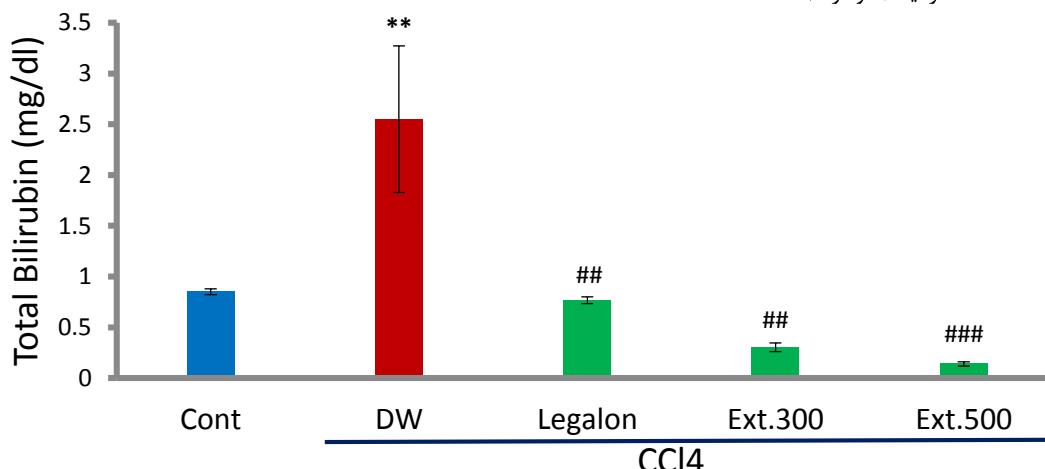


نمودار (۳): اثر پیش تیمار با مقادیر مختلف (۴۲۰ mg/kg) Legalon و *N.ispahanica* بر سطح سرمی ALP در موش های صحرایی نر، پس از القا آسیب حاد کبدی با CCl₄. نتایج به صورت Mean±S.E.M نمایش داده شده است (n=6).

نکته: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل می باشد.
DW: آب مقطر
 $P < 0.001$ ***
 $P < 0.01$ ##
 $P < 0.001$ ***

اثر تجویز خوراکی مقادیر مختلف (۴۲۰ mg/kg) Legalon و *N.ispahanica* بر سطح سرمی بیلریوبین:

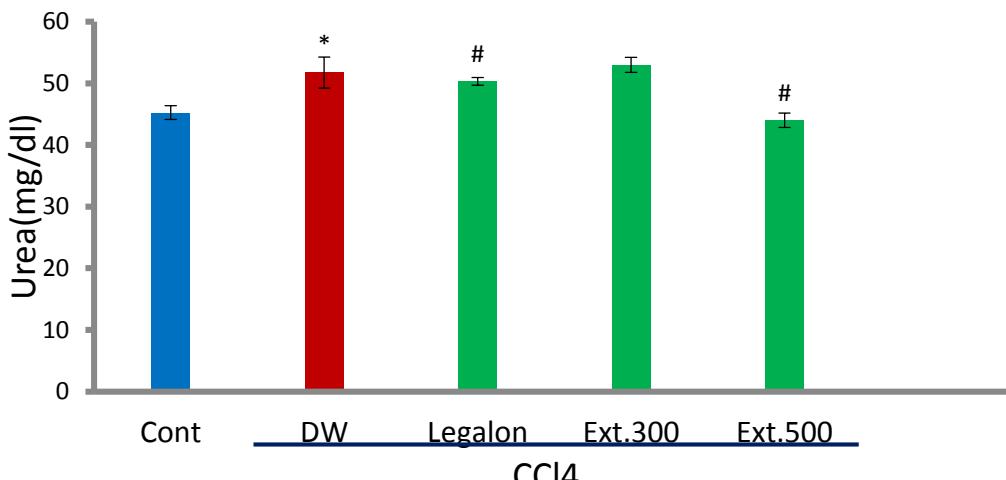
تجویز ۱۰ روزه عصاره سبب کاهش معنی داری میزان بیلریوبین سرم در گروه های دریافت کننده دوز های (۳۰۰، ۵۰۰ mg/kg) Legalon قبل از دریافت CCl₄ گردید (نمودار ۴).



نمودار (۴): اثر پیش تیمار با مقادیر مختلف (۴۲۰ mg/kg) Legalon و *N.ispahanica* بر سطح سرمی بیلریوبین در موش های صحرایی نر پس از القا آسیب حاد کبدی با CCl₄. نتایج به صورت Mean±S.E.M نمایش داده شده است (n=6).

نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه DW با گروه CCl4+DW می باشد.
 $P < 0.001 \text{ } \#\#\# \quad P < 0.01 \text{ } \#\#\# \quad P < 0.01 \text{ } \times\!\times$
 آب مقطر DW
 اثر تجویز خوراکی مقادیر مختلف (۴۲۰mg/kg) Legalon و N.ispahanica بر سطح سرمی اوره:

مقایسه سطح سرمی اوره در گروه دارای آسیب حاد کبدی (دربافت کننده تتراکلرید کربن) با گروه کنترل نشان دهنده افزایش معنی داری اوره در گروه CCl4 می باشد. تجویز ۱۰ روزه عصاره سبب کاهش معنی داری میزان اوره سرم در گروه های دریافت کننده دوز ۵۰۰ mg/kg و ۳۰۰ mg/kg Legalon قبل از دریافت CCl4 گردید (نمودار ۵).

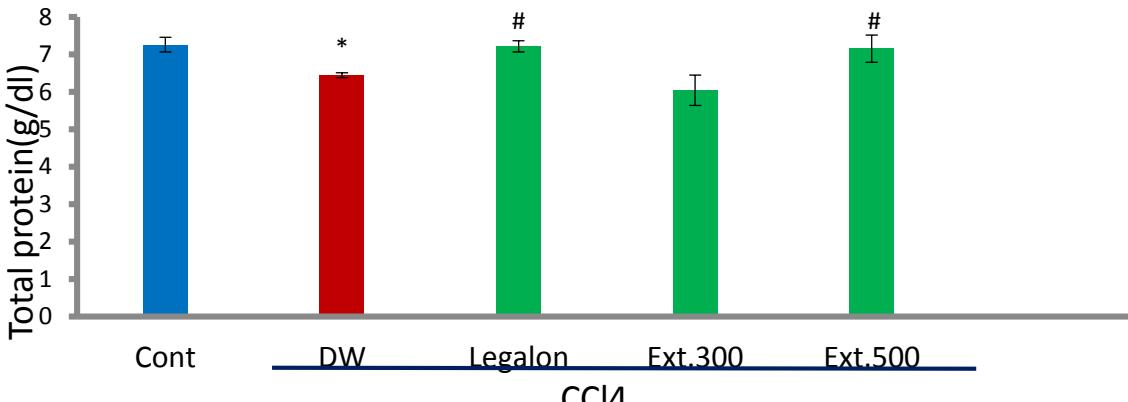


نمودار (۵): اثر پیش تیمار با مقادیر مختلف (۴۲۰mg/kg) Legalon و N.ispahanica عصاره هیدروالکلی بر سطح سرمی اوره در موش های صحرایی نر، پس از القا آسیب حاد کبدی با CCl4 نتایج به صورت Mean±S.E.M نمایش داده شده است. (n=6)

نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل می باشد.
 $P < 0.05 \text{ } \#\#\# \quad P < 0.05 \text{ } \times\!\times$
 آب مقطر DW

اثر تجویز خوراکی مقادیر مختلف (۴۲۰mg/kg) Legalon و N.ispahanica عصاره هیدروالکلی بر سطح سرمی پروتئین تام:

بر اساس نتایج مطالعه ما، تجویز ۱۰ روزه عصاره سبب افزایش معنی دار میزان پروتئین تام سرم در گروه های دریافت کننده دوز ۵۰۰ mg/kg و ۳۰۰ mg/kg Legalon قبل از دریافت CCl4 گردید (نمودار ۶).

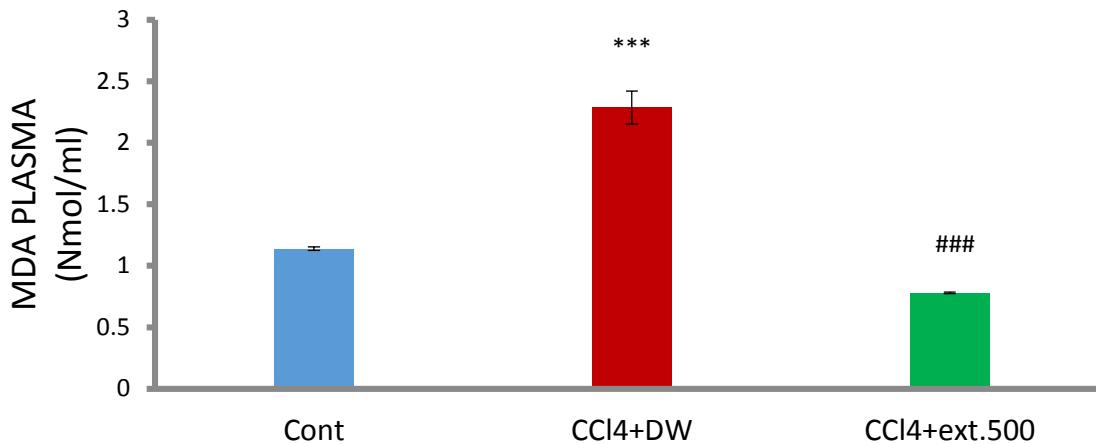


نمودار (۶): اثر پیش تیمار با مقادیر مختلف (۴۲۰mg/kg) Legalon و N.ispahanica عصاره هیدروالکلی بر سطح سرمی پروتئین تام در موش های صحرایی نر پس از القا آسیب حاد کبدی با CCl4 نتایج به صورت Mean±S.E.M نمایش داده شده است. (n=6)

« نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل می باشد. # نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه CCl₄ + DW می باشد. # P < 0.05 # P < 0.05 * آب مقطر DW

اثر تجویز خوراکی عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* (500 mg/kg) بر سطح پلاسمایی MDA

مقایسه سطح پلاسمایی MDA در گروه دارای آسیب حاد کبدی (دربافت کننده تتراکلرید کربن) با گروه کنترل نشان دهنده افزایش معنی داری در گروه CCl₄ می باشد. تجویز 10 روزه عصاره سبب کاهش معنی داری میزان MDA پلاسما در گروه تیمار شده با عصاره هیدروالکلی MDA در گروه CCl₄ می باشد. قبل از دربافت CCl₄ گردید (نمودار 7).

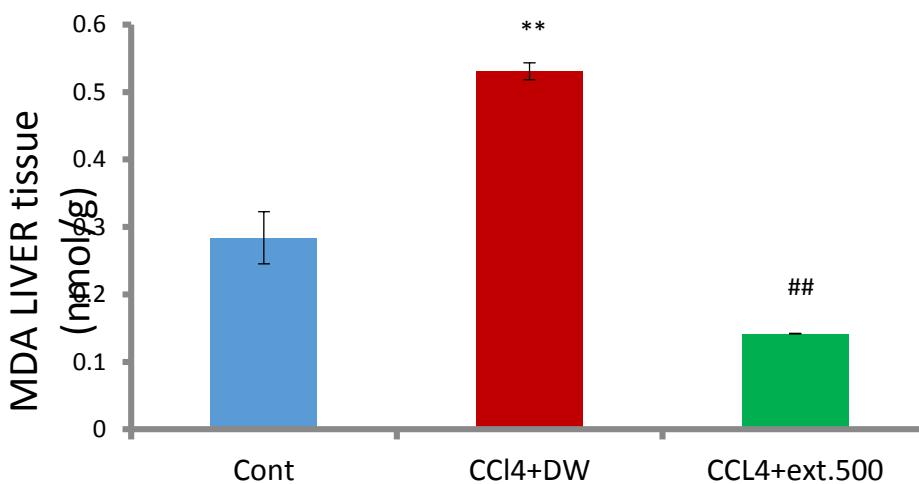


نمودار (7): اثر تجویز خوراکی عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* (500 mg/kg) بر سطح پلاسمایی MDA در موش های صحرایی نر پس از القا آسیب حاد کبدی با CCl₄. نتایج به صورت Mean±S.E.M نمایش داده شده است (n=6).

« نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل می باشد. # نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه CCl₄ + DW می باشد. # P < 0.001 #### P < 0.001 *** آب مقطر DW

اثر تجویز خوراکی عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* (500 mg/kg) بر میزان MDA در بافت کبد:

مقایسه میزان MDA در بافت کبد گروه دارای آسیب حاد کبدی (دربافت کننده تتراکلرید کربن) با گروه کنترل، نشان دهنده افزایش معنی داری در گروه دریافت کننده CCl₄ می باشد. تجویز 10 روزه عصاره سبب کاهش معنی داری میزان فعالیت آنزیم MDA در گروه های دریافت کننده عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* گردید (نمودار 8).



نمودار (8): اثر تجویز خوراکی عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* (500 mg/kg) بر میزان MDA در بافت کبد در موش های صحرایی نر، پس از القا آسیب حاد کبدی با CCl₄. نتایج به صورت Mean±S.E.M نمایش داده شده است (n=6).

نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل می باشد.

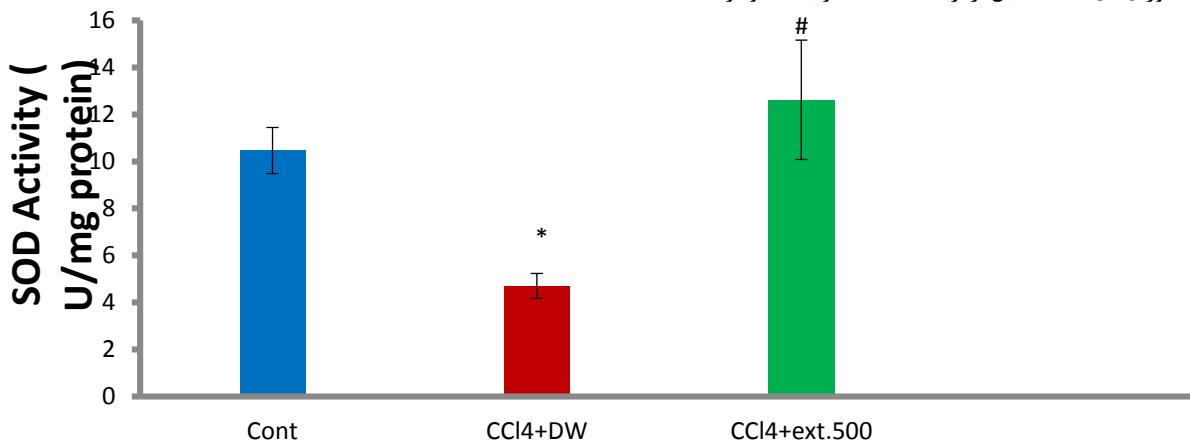
P < 0.01 ##

P < 0.01 **

آب مقطر DW

اثر تجویز خوراکی مقدار 500 mg/kg عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* بر میزان آنزیم SOD در بافت کبد:

مقایسه میزان فعالیت آنزیم SOD در بافت کبد گروه دارای آسیب حاد کبدی (دربافت کننده تراکلرید کربن) با گروه کنترل، نشان دهنده کاهش معنی داری SOD در گروه دریافت کننده CCl4 می باشد. تجویز عصاره سبب افزایش معنی داری میزان فعالیت آنزیم SOD در گروه های دریافت کننده دوز 500 mg/kg قبل از دریافت CCl4 گردید (نمودار ۹).



نمودار (۹): اثر تجویز خوراکی عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* بر میزان فعالیت آنزیم SOD در موش های صحرایی نر، پس از آسیب حاد کبدی با CCl4 نتایج به صورت Mean±S.E.M نمایش داده شده است (n=6).

نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل می باشد.

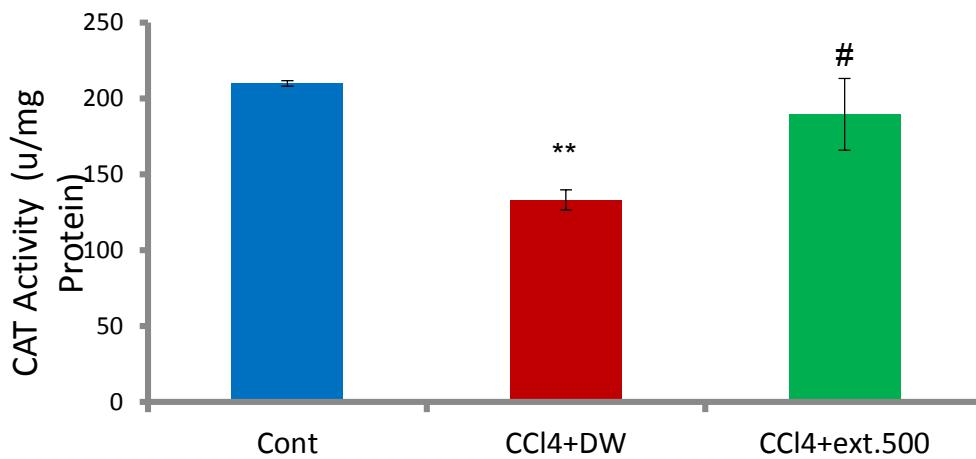
P < 0.05 #

P < 0.05 **

آب مقطر DW

اثر تجویز خوراکی مقدار 500 mg/kg عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* بر میزان آنزیم CAT در بافت کبد:

مقایسه میزان فعالیت آنزیم CAT در بافت کبد گروه دارای آسیب حاد کبدی (دربافت کننده تراکلرید کربن) با گروه کنترل، نشان دهنده کاهش معنی داری CAT در گروه دریافت کننده CCl4 می باشد. تجویز عصاره سبب افزایش معنی داری میزان فعالیت آنزیم CAT در اثر تجویز خوراکی عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* قبل از دریافت CCl4 گردید (نمودار ۱۰).



نمودار (۱۰): اثر تجویز خوراکی عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* بر میزان فعالیت آنزیم CAT در موش های صحرایی نر، پس از آسیب حاد کبدی با CCl4 نتایج به صورت Mean±S.E.M نمایش داده شده است (n=6).

نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل می باشد.

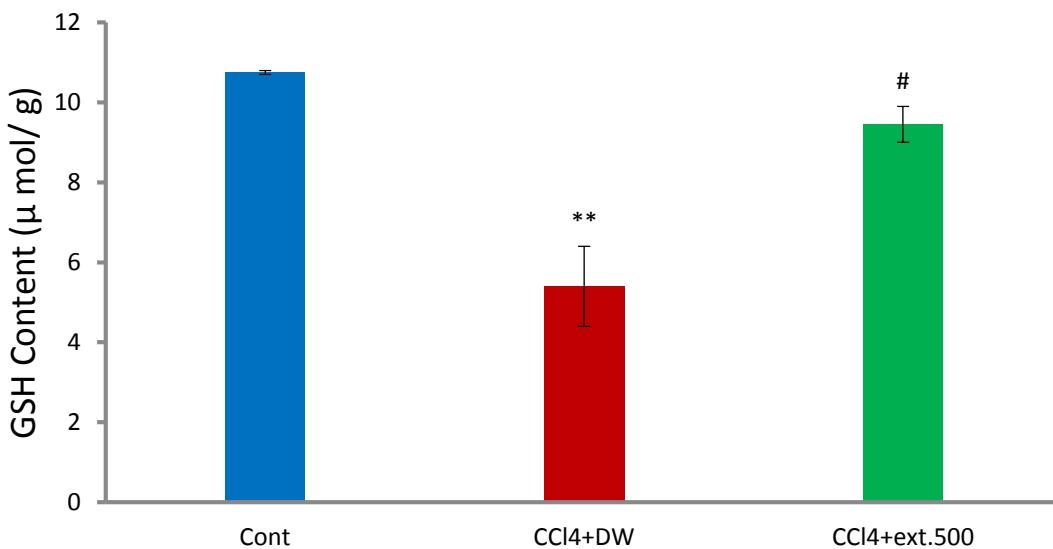
P < 0.05 #

P < 0.01 **

آب مقطر DW

اثر تجویز خوراکی عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* در بافت کبد:

مقایسه میزان GSH در بافت کبد گروه دارای آسیب حاد کبدی (دربافت کننده تتراکلرید کربن) با گروه کنترل، نشان دهنده کاهش معنی داری GSH در گروه دریافت کننده CCl₄ می باشد. عصاره سبب افزایش میزان GSH در اثر تجویز خوراکی عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* قبل از دریافت CCl₄ گردید (نمودار ۱۱).



نمودار (۱۱): اثر تجویز خوراکی عصاره هیدروالکلی *N.ispahanica* در موش های صحرایی نر،

پس از القا آسیب حاد کبدی با CCl₄. نتایج به صورت Mean±S.E.M نمایش داده شده است (n=6).

نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه DW با CCl₄ می باشد.

** نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل می باشد.

P < 0.05 #

P < 0.01 **

DW آب مقطر

در مطالعه حاضر نیز فعالیت آنزیم های ALP, ALT, AST در گروه تیمار شده با CCl₄ نسبت به گروه شاهد و کنترل افزایش معنی داری داشت که در پژوهش های قبل نیز نتایج مشابهی از آسیب کبدی ناشی از CCl₄ مشاهده شده بود (۲۷، ۲۸، ۳۰). بر اساس یافته های مطالعه مل، عصاره هیدروالکلی گیاه *N.ispahanica* در گروه های تیمار شده باعث کاهش فعالیت این آنزیم ها شده بود. این کاهش به موازات افزایش دوز مصرف عصاره گیاه مشاهده گردید و در مقایسه با گروه CCl₄ تفاوت معنی داری را نشان داد. بر این اساس می توان گفت که تأثیر عصاره گیاه *N.ispahanica* بر کاهش فعالیت این آنزیم ها نسبت به گروه دریافت کننده CCl₄ نشان دهنده ویژگی محافظت کبدی آن می باشد. میانگین غلظت پروتئین تام سرم و کبد، بیلی روبین و اوره در سرمه گروه های مورد مطالعه نشان می دهد که گروه CCl₄ دچار کاهش پروتئین تام، افزایش اوره و بیلی روبین نسبت به گروه شاهد شده اند. در گروه های آزمون تجربی با مصرف عصاره گیاه *N.ispahanica* boiss پس از پیش تیمار با

بحث

امروزه استفاده از داروهای با منشأ گیاهی و فاقد عوارض جانبی می تواند در درمان امراض کبد از جمله مسمومیت حاد کبدی در مقابل سوموم جلوگیری نماید (۲۶، ۲۷، ۲۸). لذا هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظت کبدی عصاره *N.ispahanica* boiss در موش های صحرایی نر بود. نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که تتراکلرید کربن، مسمومیت کبدی ایجاد می کند که منجر به افزایش آنزیم های شاخص کبدی در مقایسه با گروه شاهد می شود. با توجه به اینکه آنزیم های کبدی درون سلولی هستند می توان استنباط نمود که CCl₄ منجر به آسیب و تخریب سلول های کبدی شده است. بر اساس مطالعات پیشین آسیب کبدی ناشی از CCl₄ به دلیل شکسته شدن پیوند بین کربن و کلر و تولید رادیکال آزاد تری کلرومتبیل است که رادیکالی بسیار ناپایدار بوده و با ترکیبات غشای سلول و همچنین اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشبع است (۲۸، ۲۹).

در مطالعه حاضر دوز 300 mg/kg نتوانست تغییرات معنی داری در سطوح آنزیمی و نیز سطح سرمی توتال پروتئین و اوره ایجاد کند که این یافته می تواند مربوط به اثربخشی عصاره گیاه N.ispahanica در دوز های بالا باشد زیرا در دوز بالاتر ۵۰۰ mg/kg اثرات حفاظتی آن به اثبات رسید. لذا مطالعات بیشتری باید در زمینه بررسی اثربخشی عصاره گیاه N.ispahanica در دوز های پایین صورت گیرد که مکانیسم های مربوطه بیشتری را مورد بررسی قرار دهد.

بر اساس داده های مطالعه حاضر عصاره هیدروالکلی N.ispahanica در دوز ۵۰۰ mg/kg اثرات حفاظت نسبی روی آسیب کبدی القا شده با CCl₄ در موش های صحرایی نر را نشان داد که این اثرات حفاظتی بر روی آسیب کبدی احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در N.ispahanica است.

البته لازم به ذکر است، برای بررسی بیشتر این اثرات حفاظت کبدی که مربوط به چه ترکیباتی از گیاه است، بایستی بررسی های فارموکولوژیکی بیشتری در جهت جداسازی، خالص سازی و بررسی ترکیبات موجود در N.ispahanica انجام گیرد. لذا مطالعات بسیاری در جهت تأیید اثرات حفاظت کبدی N.ispahanica موردنیاز است.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، تیمار با عصاره هیدروالکلی گیاه N.ispahanica سبب کاهش فعالیت سرمی آنزیم های شاخص کبدی، اوره، بیلی روبین و افزایش پروتئین تام گردید. همچنین افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و کاهش پارامتر های استرس اکسیدانتیو به طور معنی دار سبب بهبود عملکرد کبد گردیده بود. از این رو می توان چنین اذعان نمود که احتمالاً وجود ترکیبات فلاونوئیدهای و پلی فنل ها با القای اثرات آنتی اکسیدانی مانع از تخریب بافت کبد در میان روش CCl₄ شده و اثر محافظت کبدی را ایفا می کنند. البته لازم به ذکر است، به منظور بررسی ترکیبات مؤثره مطالعات بیوشیمیابی و فارموکولوژیکی بیشتری موردنیاز است.

References

- Zarezade V, Moludi J, Mostafazadeh M, Mohammadi M, Veisi A. Antioxidant and hepatoprotective effects of Artemisia dracunculus against CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. Avicenna J Phytomed 2018;8(1): 51.
- Akram E, Olamafar S, Zaringhalam J, Rezazadeh S, Eidi M. Protective effect of Walnut (Juglans regia

CCl₄، افزایش چشمگیری در غلظت پروتئین تام و کاهش سطح سرمی بیلی روبین و اوره نسبت به گروه CCl₄ وجود داشت. در مطالعه ای هم راستا با پژوهش حاضر، نتایج نشان داد که روغن گیاه Nepeta cataria دارای نقش حفاظتی در مقابل آسیب کبدی القا شده در نتیجه استامینوفن شده بود (۳۱). همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره الکلی و آبی Nepeta nepetella در مطالعه Seladji و همکاران نشان داده شده است (۳۲).

بر اساس مطالعه zarrabi و همکاران، *Nepeta racemose* آنتی اکسیدانی از خود نشان می دهد که مرتبط با محتوای فنولیک و فلاونوئید این ترکیب است (۳۳). در مطالعه مشابهی که بر روی موش های صحرایی انجام گرفت در گروه های تیمار شده با عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک نسبت به شاهد تیمار شده با CCl₄ التهاب کمتری دیده شد. در واقع CCl₄ بافت کبد را ملتهب و دچار نکروز شده بود و پنیرک به دلیل دارا بودن ترکیبات آنتی اکسیدانی و فلاونوئیدی اثرات سمی CCl₄ را در کبد کاهش داده بود (۳۴). همچنین عصاره آبی و اتانولی برگ گیاه Vitex trifolia آسیب بافت کبدی ناشی از CCl₄ جلوگیری می کند، که منجر به کاهش توتال بیلی روبین و آنزیم های کبدی شده و در مقابل آسیب القا شده با CCl₄ در بافت کبد اثر حفاظتی دارد (۳۵). در مطالعه ای مشخص شد که عصاره هیدروالکلی ساقه های گیاه Capparis decidua سمتیت ناشی از CCl₄ در موش های صحرایی شده که به دلیل وجود ترکیباتی چون آلkaloidهای، فلاونوئیدهای، تانن ها، استرونول ها، ساپونین، گلیکوزیدهای سیانوژنیک و کومارین ها اجزای اصلی عصاره هستند که می توانند از آسیب بافت کبد در برابر CCl₄ جلوگیری کنند (۳۶). با توجه به نتایج مطالعات انجام شده بر روی گیاهان مختلف که وجود ترکیبات آنتی اکسیدانی آن ها به اثبات رسیده است، و با توجه به اثبات وجود ترکیبات ترپنوئید و فنولیک و خاصیت آنتی اکسیدانی در گونه های Nepeta (۱۷) می توان گفت که اثرات حفاظتی در N.ispahanica boiss گیاه CCl₄ می باشد. احتمالاً از طریق القای فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد.

- L.) extract against CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. Res Med 2011;35(2): 87-92.
- Jalali Ghassam B, Ghaffari H, Prakash H, Kini KR. Antioxidant and hepatoprotective effects of Solanum xanthocarpum leaf extracts against CCl₄-induced liver injury in rats. Pharm Biol 2014;52(8): 1060-8.

4. Abbasi M, Namjoo AR, Khamesipour F. Ethanol effects on histobiochemical parameters of suckling pups borned from alcoholic rat mothers. *Comp Clin Path* 2016;25(4): 833-9.
5. Ali H, Kabir N, Muhammad A, Shah MR, Musharraf SG, Iqbal N, et al. Hauthriwaic acid as one of the hepatoprotective constituent of *Dodonaea viscosa*. *Phytomedicine* 2014;21(2): 131-40.
6. Abbasi M, Namjoo A. Low dose effects of ethanol on suckling rats: Enzymes activity, histological alterations and growth parameters. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2013;15.
7. Toori MA, Joodi B, Sadeghi H, Sadeghi H, Jafari M, Talebianpoor MS, et al. Hepatoprotective activity of aerial parts of *Otostegia persica* against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Avicenna J Phytomed* 2015;5(3): 238.
8. Shafei Z, Abazari O, Divsalar A, Ghalandari B, Poursoleiman A, Saboury AA, et al. Effect of a Synthesized Amyl-Glycine1, 10-Phenanthroline Platinum Nitrate on Structure and Stability of Human Blood Carrier Protein, Albumin: Spectroscopic and Modeling Approaches. *J Fluoresc* 2017;27(5): 1829-38.
9. Azeem A, Mathew M, Nair C. Hepatoprotective effect of *Averrhoa carambola* fruit extract on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *Asian Pac J Trop Med* 2010;3(8): 610-3.
10. Gnanadesigan M, Ravikumar S, Inbaneson SJ. Hepatoprotective and antioxidant properties of marine halophyte *Luminetzeria racemosa* bark extract in CCL4 induced hepatotoxicity. *Asian Pac J Trop Med* 2011;4(6): 462-5.
11. Gupta RK, Hussain T, Panigrahi G, Das A, Singh GN, Sweety K, et al. Hepatoprotective effect of *Solanum xanthocarpum* fruit extract against CCl4 induced acute liver toxicity in experimental animals. *Asian Pac J Trop Med* 2011;4(12): 964-8.
12. Singhal KG, Gupta GD. Hepatoprotective and antioxidant activity of methanolic extract of flowers of *Nerium oleander* against CCl4-induced liver injury in rats. *Asian Pac J Trop Med* 2012;5(9): 677-85.
13. Abbasi M, Abazari OO. Probing the Biological evaluations of a new designed Palladium (II) complex using spectroscopic and theoretical approaches: Human Hemoglobin as a Target. *Arch Med Lab Sci* 2018;3(3).
14. Asadi A, Nezhad DY, Javazm AR, Khanicheragh P, Mashouri L, Shakeri F, et al. In vitro Effects of Curcumin on Transforming Growth Factor- β -mediated Non-Smad Signaling Pathway, Oxidative Stress, and Pro-inflammatory Cytokines Production with Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2019 19(1): 84-93.
15. Asadi Balsin Sharif Abadi S, Nasri S, Amin G, Bidaran S. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Nepeta mentoides* on pain in aerial parts in male mice. *J Jahrom Univ Med Sci* 2013;11(3): 1-9.
16. SAJADI S, Mehrabani M. Essential oil composition of *Nepeta ispananica* Boiss. 2003.
17. Süntar I, Nabavi SM, Barreca D, Fischer N, Efferth T. Pharmacological and chemical features of *Nepeta* L. genus: Its importance as a therapeutic agent. *Phytother Res* 2018;32(2): 185-98.
18. Dashtpeima A, Moshfe A, Manzoori L, Arefkhah N, Shahryari S, Mohseni M, et al. The Effect (s) of *Matricaria chamomilla* on *Leishmania major* Ulcers in Balb/c Mice. *Armaghane-danesh* 2015;20(2): 127-37.
19. Orhan DD, Orhan N, Ergun E, Ergun F. Hepatoprotective effect of *Vitis vinifera* L. leaves on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *J Ethnopharmacol* 2007;112(1): 145-51.
20. Kurtel H, Granger DN, Tso P, Grisham MB. Vulnerability of intestinal interstitial fluid to oxidant stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1992;263(4): G573-G8.

21. Jamall IS, Smith JC. Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation in the rat heart: a possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;80(1): 33-42.
22. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968;25: 192-205.
23. Aebi H. Methods of enzymatic analysis. Catalase 1983: 673-86.
24. Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 1977;59(2): 309-14.
25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72(1-2): 248-54.
26. Roozbehi S, Razmi N, Akbartabar Touri M. Hepatoprotective effects of *Bupleurum exalatum* extracts against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Armaghane-danesh* 2015;19(12): 1069-81.
27. Abazari O, Divsalar A, Ghobadi R. Inhibitory effects of oxali-Platin as a chemotherapeutic drug on the function and structure of bovine liver catalase. *J Biomol Struct Dyn* 2020 ;38(2): 609-15.
28. Talebanpourbayat Z, Aqababa H, Shojaiiefard MB. Protective Effects of Hydro-alcoholic Extract of *Apium Graveolens* on Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Sprague-Dawley male Rats. *J Fars Univ Med Sci* 2015;5(1): 102-10.
29. Aniya Y, Koyama T, Miyagi C, Miyahira M, Inomata C, Kinoshita S, et al. Free radical scavenging and hepatoprotective actions of the medicinal herb, *Crassocephalum crepidioides* from the Okinawa Islands. *Biol Pharm Bull* 2005;28(1): 19-23.
30. Soni B, Visavadiya NP, Madamwar D. Ameliorative action of cyanobacterial phycoerythrin on CCl₄-induced toxicity in rats. *Toxicology* 2008;248(1): 59-65.
31. Tan J, Li J, Ma J, Qiao F. Hepatoprotective effect of essential oils of *Nepeta cataria L.* on acetaminophen-induced liver dysfunction. *Biosci Rep*. 2019;39(8): BSR20190697.
32. Seladjı M, Bekhechi C, Beddou F, Hanane D, Bendimerad N. Antioxidant activity and phytochemical screening of *Nepeta nepetella* aqueous and methanolic extracts from Algeria. *J Appl Pharm Sci* 2014;4(2): 12.
33. Zarabi M, Asghari B, Maryamabadi A, Mohebbi G, Rashvand S. Phytochemical Properties and Inhibitory and Antioxidant Effects of the Decoction, Infusion and Hydro-Alcoholic Extract of *Nepeta Race-mosa* on α -Amylase and α -Glucosidase. *Iran South Med J* 2019;22(2): 90-105.
34. Terohid S, Mirazi M, Sarihi A. Study of hepatoprotective effect of *Malva neglecta L.* hydroethanolic leaf extract in male rat induced with carbon tetrachloride. *J Cell Tissue* 2015; 6(1): 31-42.
35. Manjunatha B, Vidya S. Hepatoprotective activity of *Vitex trifolia* against carbon tetrachloride-induced hepatic damage. *Indian J Pharm Sci* 2008;70(2): 241.
36. Ali S, Al-Amin T, Mohamed A, Gameel A. Hepatoprotective activity of aqueous and methanolic extracts of *Capparis decidua* stems against carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *J Pharmacol Toxicol* 2009;4(4): 167-72.

EVALUATION OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF NEPETA ISPahanica BOISS AGAINST ACUTE LIVER INJURY INDUCED BY CCl₄ IN MALE WISTAR RATS: AN EXPERIMENTAL STUDY

Iran Pouraboli¹, Fahimeh Farzad Amir Ebrahimi^{2}*

Received: 17 February, 2020; Accepted: 16 June, 2020

Abstract

Background & Aims: Chemical toxins such as carbon tetrachloride (CCl₄) cause liver dysfunction. In this regard, the hepatoprotective effect of antioxidants against these toxins has been studied previously. Since herbal agents, including Nepeta species, are the major source of antioxidants, the present study aimed to investigate the hepatoprotective effects of hydroalcoholic extract of Nepeta ispananica (N. ispananica) against acute liver injury induced by CCl₄ in male rats.

Materials & Methods: In this experimental study, different doses of hydroalcoholic extract of N. ispananica and Legalone were fed to male rats separately and then acute liver injury was induced by oral administration of CCl₄ in liquid paraffin. Liver enzyme activity and lipid peroxidation in liver and plasma, as well as the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione (GSH) in liver tissue, were evaluated.

Results: The findings indicated that the 10-day administration of hydroalcoholic extract of N. ispananica at dose of 500 mg/kg significantly decreased the serum activity of liver enzymes compared to the CCl₄ group and significantly decreased liver MDA and increased SOD, CAT, and GSH levels and protected the liver from CCl₄ injury.

Conclusion: According to the presented findings, hydroalcoholic extract of N. ispananica had a partial protection against CCl₄-induced liver injury in male rats and this role is probably due to the presence of phenolic and flavonoid compounds.

Keywords: Acute liver injury, Lipid peroxidation, Nepeta ispananica, CCl₄

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Tel: +983432812554

Email: fahimeh.farzad95@yahoo.com

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(5): 422 ISSN: 2717-008X

¹ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

² M.sc, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
(Corresponding Author)