

بهینه‌سازی ایجاد هایپر بیلی‌روبینی با فنیل هیدرازین در مدل حیوانی و بررسی اثرات شیر خشت در موش‌های مبتلا به هایپر بیلی‌روبینی

فائزه ولی‌پور^۱، جمشید مهرزاد^{۲*}، محمد آزادبخت^۳، حمیدرضا محمدی^۴، راحله ژبانی^۵، علی داوودی^۶، فرشته طالب‌پور امیری^۷

تاریخ دریافت ۱۴۰۱/۱۱/۰۲ تاریخ پذیرش ۱۴۰۱/۱۲/۲۰

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: امروزه شیر خشت به‌عنوان یک داروی گیاهی جهت درمان زردی نوزادان استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه، ایجاد هایپر بیلی‌روبینی با استفاده از ترکیب فنیل هیدرازین و بررسی اثرات شیر خشت بر سطح بیلی‌روبین خون در موش‌های مبتلا به هایپر بیلی‌روبینی می‌باشد. **مواد و روش کار:** در مطالعه مداخله‌ای- تجربی حاضر، ۷۰ میکرولیتر بر کیلوگرم فنیل هیدرازین به‌صورت صفاقی به موش سفید آزمایشگاهی از نژاد ویستار که ۱۵ روز از تولدشان گذشته بود، تزریق شد. موش‌ها پس از ابتلا به هایپر بیلی‌روبینی به سه گروه تقسیم‌بندی شدند. پس از ۴۸ ساعت، شیر خشت با دوزهای ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و توسط لوله‌های دهانی-حلقی در ۳ مرتبه به مدت ۱۰ روز به حیوانات خورانده شد. سپس در ساعات مختلف با خون‌گیری و اندازه‌گیری بیلی‌روبین تام سرم، منحنی تغییرات بیلی‌روبین تا ۴۸ ساعت بعد از اولین تزریق فنیل هیدرازین ترسیم گردید. همچنین، یک گروه هم به‌عنوان شاهد (موش‌های سالم) انتخاب شدند. تعداد موش‌ها در هر گروه ۱۰ عدد بود (۵ موش ماده و ۵ موش نر). از آمار توصیفی شامل میانگین و انحراف معیار برای توصیف داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که مقایسه میزان بیلی‌روبین پلاسما در روز صفر تا بعد از تزریق فنیل هیدرازین به‌طور معنی‌داری (تا ۶ mg/dl) افزایش یافته است ($p < 0/05$). تجویز خوراکی شیر خشت در هر سه دوز آزمایشی موجب کاهش معناداری در بیلی‌روبین موش‌های یرقانی در مقایسه با گروه شاهد گردید به ترتیبی که مقادیر تا ۰/۲ mg/dl، تا ۰/۴ mg/dl و حتی تا ۰ mg/dl گزارش شد ($p < 0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری: شواهد مطالعه حیوانی نشان داد که ترکیب فنیل هیدرازین توانایی کاربرد در ایجاد مدل حیوانی هایپر بیلی‌روبینی را داشته و شیر خشت اثرات هایپر بیلی‌روبینیک آن را تخفیف می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: یرقان فیزیوپولوژیک، فنیل هیدرازین، بیلی‌روبین، شیر خشت، داروهای گیاهی

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و سوم، شماره نهم، ص ۶۸۳-۶۷۶، آذر ۱۴۰۱

آدرس مکاتبه: نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه بیوشیمی، تلفن: ۰۹۱۵۰۰۳۷۶۱۳

Email: mehrzadjam@yahoo.com

^۱ دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه بیوشیمی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

^۲ استادیار، گروه بیوشیمی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

^۴ استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

^۵ دانشیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

^۶ دانشیار، گروه شیمی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

^۷ مرکز تحقیقات فناوری و فراورش مواد نو، گروه شیمی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

^۸ استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

^۹ مرکز تحقیقات طب سنتی و مکمل، پژوهشکده اعتیاد، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

^{۱۰} دانشیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

مقدمه

بیلی‌روبین از کاتابولیسم هم در سیستم رتیکولواندوتلیالی حاصل می‌شود. همچون افزایش تجزیه اریتروسیت‌های حاوی هموگلوبین نوزادی، اریتروپوز ناقص، افزایش کنژوگیشن، و همچنین چرخش انتروهپاتیک بیلی‌روبین که در هفته اول تولد نوزادان رخ می‌دهد، باعث بالا رفتن تولید بیلی‌روبین می‌گردد (۱، ۲).

افزایش بیلی‌روبین عامل اصلی یرقان نوزادی می‌باشد. یرقان در نوزادان دارای شیوع بالایی است به طوری که ۶۰ درصد نوزادان و ۸۰ درصد کودکان نارس، علائم بیماری را در هفته اول تولد خود نشان می‌دهند. یرقان در حقیقت رنگ‌دانه‌های زرد رنگ در پوست است که به دلیل انباشته شدن بیلی‌روبین غیرکونژوگه در پوست به وجود می‌آید و معمولاً زمانی دیده می‌شود که سطح سرمی بیلی‌روبین به بیش از $3-2 \text{ mg/dl}$ برسد. پیشگیری، تشخیص و مدیریت یرقان، هنوز به عنوان یک چالش باقی مانده است. مقدار تام بیلی‌روبین سرم نباید در ۹۶ ساعت ابتدایی تولد بیش از mg/dl ۲۰ باشد. پس از ۹۶ ساعت، نباید اجازه داد که مقدار بیلی‌روبین تام سرم به 25 mg/dl برسد زیرا در این مرحله سد خونی-مغزی در نوزاد در حال توسعه است. سطح ایمن بیلی‌روبین برای نوزاد زودرس با سن کمتر از ۳۰ هفته بارداری 12 mg/dl بوده و برای نوزاد در هفته ۳۱ تا ۳۶ بارداری این مقدار 15 mg/dl می‌باشد (۳).

در حال حاضر، بهترین راه‌های درمان این بیماری در نوزادان استفاده از فوتوتراپی (نوردرمانی) و تعویض خون می‌باشد که تعویض خون به عنوان راه آخر جهت کاهش سریع بیلی‌روبین مورد استفاده قرار می‌گیرد. راه دیگر درمان هایپر بیلی‌روبین استفاده از داروهای گیاهی مانند ترنجبین و شیرخشت می‌باشد (۴، ۵). شیرخشت‌مانی از گونه‌های جنس *Cotoneaster*، از خانواده گل سرخ به دست می‌آید (۶). اینمان، حاوی ترکیبات کربوهیدراتی فراوانی بوده که به صورت گسترده‌ای در طب سنتی برای درمان یرقان نوزادان مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج تحقیقات نشان داده است که همان گیاه شیرخشت قابلیت تنظیم ترشح صفرا و بیلی‌روبین را دارند (۷-۹).

مصرف ۳ روز شیرخشت به همراه نوردرمانی، برای درمان یرقان مؤثر است (۱۰). مصرف شیرخشت چه به صورت کامل و چه عصاره الکلی، قادر است در پایین آوردن یرقان نوزادان اثربخش باشد (۱۱). شیرخشت دارای جذب گوارشی در روده نیست و این موضوع می‌تواند منجر به اسهال اسموتیک در نوزاد گردد و تعداد

دفعات مدفوع را بیشتر کند. این مسئله می‌تواند دلیلی بر کاهش سطح بیلی‌روبین در نوزادان دارای زردی باشد (۱۲). همچنین، شیرخشت حاوی ترکیبات فنولیک است که دارای اثرات بسیار مؤثر آنتی‌اکسیدانی می‌باشند و می‌توانند از سلول‌های کبدی در برابر اکسیداتیواسترس محافظت نمایند. استفاده از این ترکیبات منجر به کاهش فعالیت آمینوترانسفرازها (آسپارات و آلانین ترانسفراز) و میزان کلی بیلی‌روبین در بدن موش می‌شود (۱۳). با توجه به وجود این ترکیبات در شیرخشت، می‌توان تا حدودی اثرات درمانی آن بر روی بیلی‌روبین را به این ترکیبات مربوط دانست.

در این مطالعه، هدف ایجاد شرایط هایپر بیلی‌روبینمیا در مدل حیوانی با استفاده از فنیل هیدرازین و بررسی اثرات شیرخشت گونه *Cotoneaster numularius* بر روی سطح بیلی‌روبین در این مدل حیوانی می‌باشد.

مواد و روش کار

این مطالعه مداخله‌ای-تجربی، روی نوزادان موش سفید آزمایشگاهی نژاد ویستار ۱۵ روزه با وزن ۲۰-۳۰ گرم انجام گرفت. نوزادان به همراه مادر در قفس در مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران (کد اخلاق: IR.MAZUMS.REC.1399.420) با درجه حرارت ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

برای تهیه استوکمان، گیاه شیرخشت *Cotoneaster numularius* از شمال خراسان تهیه گردید. نام علمی گیاه توسط گروه فارماکوکینوزی دانشگاه علوم پزشکی مازندران بررسی و تأیید گردید. در این پژوهش از محلولمان استفاده شد. مان گیاه در محیط آزمایشگاه در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شود. سپس به نسبت ۱ گیاه و ۱۰ آب دیونیزه مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه جوشانده و در نهایت بعد از سرد شدن فیلتر گردید.

سپس، برای ایجاد مدل آزمایشگاهی هایپر بیلی‌روبینمی بعد از تولد در موش‌ها، فنیل هیدرازین با دوز ۷۰ میکرولیتر بر کیلوگرم به صورت صفاقی ۲ نوبت به مدت یک روز به موش‌ها تزریق گردید (۱۴). تزریق فنیل هیدرازین در این دوره زمانی منجر به افزایش قابل توجه وابسته به دوز در غلظت بیلی‌روبین سرم در نوزادان موش‌ها می‌شود. جهت اندازه‌گیری بیلی‌روبین در ساعات ۴-۲۴-۴۸ پس از تزریق فنیل هیدرازین، نمونه‌گیری به عمل آمد. پس از تأیید ابتلاء موش‌ها به هایپر بیلی‌روبینمی، موش‌ها به ۳ گروه تقسیم

شده و شیر خشت با غلظت‌های ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ۳ بار در روز برای مدت ۱۰ روز خورانده می‌شد. همچنین، یک گروه نیز به‌عنوان گروه شاهد منفی (موش‌های سالم) انتخاب شد. تعداد موش‌ها در هر گروه ۱۰ عدد بود (۵ موش ماده و ۵ موش نر).

اندازه‌گیری بیلی‌روبین سرم:

جهت تعیین تأثیر شیرخشت در کاهش بیلی‌روبین از طریق گلیکوزیله شدن بیلی‌روبین به رت‌های گروه آزمون پس از تجویز عصاره در هر روز سه نوبت (صبح، عصر و شب) میزان بیلی‌روبین مستقیم و غیر مستقیم به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. خونگیری از رت‌ها در دو نوبت صورت گرفت. نوبت اول (۲۴ ساعت پس از تزریق فنیل هیدرازین) از گوشه چشم آنها جهت تأیید ایجاد هایپر بیلی‌روبینمیا و روز دهم مداخله از قلب رت‌ها جهت تأیید کاهش هایپر بیلی‌روبینمیا و تست‌های آنزیم کبدی (ALT و AST) استفاده شد.

نمونه‌های خونی گرفته شده از گروه‌های مختلف درون لوله آزمایش حاوی هپارین که با دقت بر چسب‌گذاری شده بود، ریخته شد. بعد از لخته شدن به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و بعد با استفاده از سمپلر سرم‌های جدا شده در لوله‌های برچسب زده شده ریخته و سر لوله‌ها مسدود گردید و تا قبل از اندازه‌گیری میزان بیلی‌روبین به فریز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد و تا زمان انجام آزمایش به‌صورت منجمد نگهداری شد.

ارزیابی بیلی‌روبین در سرم با استفاده از معرف دیازو انجام می‌شود بطوریکه بیلی‌روبین با معرف دیازو تولید کمپلکس BILI-AZO ارغوانی رنگ می‌کند که با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵۴۰ nm قابل ارزیابی است (۱۵).

در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ مورد تحلیل قرار گرفتند. از آمار توصیفی شامل میانگین و انحراف معیار برای توصیف داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج تهیه و فرمولاسیون شیرخشت:

عصاره‌مان شیرخشت به غلظت ۱- ۲/۵- ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش‌ها تهیه شد. پس از خوراندن عصاره گیاه به حیوانات، موش‌های مورد آزمایش هیچ گونه تغییر رفتاری و ظاهری از خود نشان ندادند. هم چنین تا انتهای دوره آزمایش نیز موش‌ها به‌صورت روزانه بررسی شدند و تا روز آخر سالم و سرحال بودند. به

این ترتیب تا غلظت ۵ mg/kg عصاره، سمیتی از گیاه مشاهده نشد.

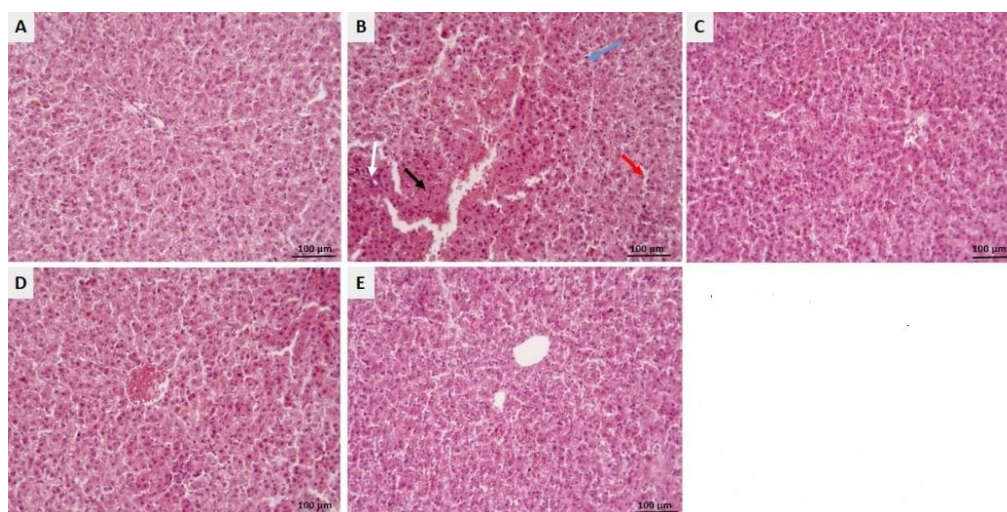
نتایج بررسی پاتولوژی کبد و آنزیم‌های کبدی:

پس از تجویز ۷۰ میلی‌گرم فنیل هیدرازین به موش‌های نوزاد، جهت بررسی تغییرات پاتولوژیکی بافت کبد و آنزیم‌های کبدی، کبد موش‌ها مورد تجزیه قرار گرفت.

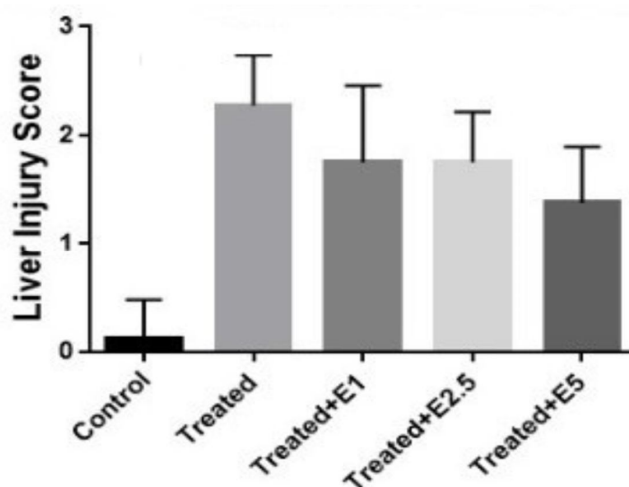
همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، گروه‌های درمان با شیر خشت کمترین میزان آسیب به بافت کبد را نشان دادند. در شکل A که نشان‌دهنده گروه کنترل می‌باشد، بافت کبد ساختاری نرمال دارد و سلول‌های هپاتوسیت در مسیر شعاعی قرار گرفتند و سینوزوئیدهای کبدی با سلول‌های کوپفر کاملاً نرمال می‌باشند. شکل B، ساختار لوبولی کاملاً از بین رفته است. هسته هپاتوسیت‌ها متراکم شده و معرف نکروز برخی از سلول‌های کبدی می‌باشد. سینوزوئیدها اتساع پیدا کرده و ورید مرکز لوبولی پر خون شده است. هم چنین افزایش تکثیر سلول‌های کوپفر مشاهده می‌شود. اما در گروه‌های تجویز شیرخشت مشاهده می‌شود که در ساختار لوبولی آن‌ها در مقایسه با گروه قبل که بدون تجویز شیرخشت می‌باشد بهبودی بیشتری مشهود است. هر چند بی‌نظمی در طناب‌های کبدی و اتساع سینوزوئیدها با اندکی پرخونی دیده می‌شود.

در بررسی نیمه کمی از نتایج هیستوپاتولوژی، نمودار ۱ نشان می‌دهد که در بررسی سیستم نمره‌دهی از مقاطع بافتی کبد موش‌های مورد مطالعه، میزان آسیب و نکروز سلول‌های کبدی در گروه دریافت‌کننده شیرخشت در مقایسه با گروه کنترل کاهش قابل توجه و معناداری دارد ($p < 0.01$). هم چنین نتایج حاصل از این مطالعات نشان داد که آسیب و تخریب سلول‌های کبدی در دوزهای بالاتر عصاره با توجه به اثرات محافظتی آن کمتر بود، هر چند این تفاوت‌ها معنادار نبودند.

نتایج مربوط به میزان آنزیم کبدی در هر چهار گروه کنترل و گروه‌های مداخله با غلظت‌های ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در جدول شماره ۱ آورده شد. نتایج آنزیم‌های کبدی نشان داد، در گروه تحت مداخله با غلظت ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم شیر خشت، آنزیم‌های کبدی در مقایسه با گروه ۲/۵ و ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم شیر خشت پایین‌تر بود. به عبارت دیگر، میزان آسیب کبدی در گروه با غلظت ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم شیر خشت کمتر بوده است و بیانگر دوز مؤثر شیر خشت در مدل حیوانی می‌باشد.



شکل (۱): ساختار بافت کبد در گروه‌های مختلف تیمار. A. گروه کنترل. بافت کبد ساختاری طبیعی دارد و سلول‌های هپاتوسیت در مسیر شعاعی قرار گرفته‌اند و سینوزوئیدهای کبدی با سلول‌های کوپفر کاملاً طبیعی می‌باشند. B. گروه تجویز فنیل هیدرازین. ساختار لوبولی کاملاً از بین رفته است. هسته هپاتوسیت‌ها متراکم شده و معرف نکروز برخی از سلول‌های کبدی می‌باشد. سینوزوئیدها اتساع پیدا کرده و ورید مرکز لوبولی پر خون شده است. هم چنین افزایش تکثیر سلول‌های کوپفر مشاهده می‌شود. گروه C تا E گروه‌های تیمار با شیرخشت. در ساختار لوبولی آن‌ها در مقایسه با گروه قبل که بدون تجویز شیرخشت می‌باشد بهبودی بیشتری مشهود است. هرچند بی‌نظمی در طناب‌های کبدی و اتساع سینوزوئیدها با اندکی پرخونی دیده می‌شود.



نمودار (۱): نمره آسیب کبدی

داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار در هر گروه می‌باشد.

Control: گروه کنترل

Treated: گروه مداخله تحت تزریق با فنیل هیدرازین

Treated + E1: گروه مداخله تحت درمان با شیر خشت ۱ میلی گرم بر کیلوگرم

Treated + E2.5: گروه مداخله تحت درمان با شیر خشت ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم

Treated + E5: گروه مداخله تحت درمان با شیر خشت ۵ میلی گرم بر کیلوگرم

جدول (۱): میانگین آنزیم‌های کبدی در هر چهار گروه تحت مطالعه

ALT (IU/L)	AST (IU/L)	گروه تحت مطالعه
۲۴/۶	۳۵/۳	کنترل
۲۴/۸	۳۵/۷	غلظت ۵ میلی گرم بر کیلوگرم شیر خشت
۳۰	۴۱/۳	غلظت ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم شیر خشت
۳۷/۴	۴۴/۱	غلظت ۱ میلی گرم بر کیلوگرم شیر خشت

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعات متعددی نشان داده شده است که همان گیاه شیر خشت در کاهش سطح بیلی‌روبین در نوزادان مؤثر بوده و این تأثیر ۳۶ ساعت بعد از تجویز به حداکثر خود می‌رسد (۷، ۱۶، ۱۷). طبق طب سنتی ایران، مان موجب تحریک ترشح صفرا از کبد و کیسه صفرا می‌شود که بدین ترتیب موجب کاهش سطح بیلی‌روبین در سرم می‌گردد. علاوه بر این، اصلی‌ترین ترکیبمان، مانیتول است که دارای اثرات درمانی می‌باشد (۷، ۱۸). این ترکیب می‌تواند نقش مهمی در مکانیزم کتوناستر در کاهش زردی نوزادان داشته باشد. در مطالعه حاضر، از عصاره گیاه شیرخشت، برای درمان زردی در موش‌های تازه متولد شده استفاده گردید. براساس یافته‌های این پژوهش، این گونه قادر است به خوبی میزان بیلی‌روبین را در نوزاد موش کنترل نموده و در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری را در سطح سرمی ایجاد نماید.

جهت افزایش سطح سرمی بیلی‌روبین در موش‌ها از ماده فنیل هیدرازین استفاده شد. فنیل هیدرازین یک ترکیب شیمیایی اکسیدانت واجد خواص همولایتیکی است که معمولاً به‌عنوان یک واسط شیمیایی در صنایع به کار برده می‌شود (۱۹). این ترکیب در برخی قارچ‌های خوراکی نیز یافت می‌شود و مصرف آن دارای عوارض جانبی متعددی مانند کم خونی همولایتیک، اختلالات عروقی، کبدی، کلیوی و غیره و همچنین بروز بدخیمی‌ها و ناهنجاری‌های ژنتیکی می‌باشد (۱۹، ۲۰). نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از فنیل هیدرازین به صورت معناداری در آنزیم‌های کبدی اختلال ایجاد می‌نماید و موجب تخریب بافت کبد می‌شود. استفاده از عصاره‌مان گیاه شیرخشت، توانست به خوبی از اثرات تخریبی فنیل هیدرازین جلوگیری به عمل آورد. این موضوع نشان می‌دهد که گیاه شیرخشت با دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم در نوزادان موش مبتلا به هایپر بیلی‌روبینمیا در مقایسه با دوز ۲/۵ و ۱ میلی گرم بر کیلوگرم به‌طور مؤثرتری عمل می‌کند و بدین

ترتیب شیر خشت با دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم نوزاد رت دارای اثرات محافظتی بر روی کبد می‌باشد.

مکانیزم اثر عصاره‌مان شیرخشت کاملاً مشخص نشده است زیرا دارای ترکیبات بسیار پیچیده‌ای می‌باشد. در مطالعات داروشناسی مدرن مشخص شده است که ترکیبات اسیدهای فرار می‌توانند فعالیت‌های آنزیم‌های ALT و AST کبدی را که در کبد آسیب دیده موش تولید می‌شود آنتاگونیست نمایند و بدین ترتیب از کبد در برابر آسیب بیشتر محافظت می‌کنند (۲۱). گیاه شیرخشت دارای روغن‌های فرار به‌صورت مونو و بی‌سیکلیک مونوترپن^۱ در ترکیبات خود می‌باشد (۲۲) که ممکن است در تعدیل آنزیم‌های کبدی عمل کرده باشند. با تحریک آنزیم‌های کبدی، میزان بازجذب، اتصال و ترشح کبدی بیلی‌روبین بالا می‌رود (۲۳) که در مطالعه حاضر نیز پس از تجویز فنیل هیدرازین این نتایج به دست آمد و استفاده از شیرخشت با کاهش آنزیم‌های کبدی، موجب کاهش سطح بیلی‌روبین سرم گردید.

مطالعات در زمینه استفاده از گیاه شیرخشت بر روی مدل حیوانی بسیار محدود می‌باشد و اغلب مطالعات در زمینه تأثیرمان شیرخشت بر روی زردی نوزادان تازه متولد شده می‌باشد. نتایج به دست آمده از تمام مطالعات پیشین حاکی از اثرگذار بودن این گیاه در درمان زردی می‌باشد. در یک مطالعه دو گروه نوزاد (هر گروه ۱۰۰) به‌طور تصادفی انتخاب شد. گروه اول شامل نوزادانی بود که دچار زردی بودند و روزانه عصاره‌مان گرفته شده از گیاه شیرخشت به همراه نوردرومانی دریافت نمودند. گروه دوم به‌عنوان کنترل تنها نوردرومانی دریافت کردند و به جای قطره شیرخشت، آب دریافت نمودند. نتایج نشان داد که استفاده از قطره گیاهی شیرخشت مدت زمان کاهش بیلی‌روبین به ۱۰ میلی‌گرم را به‌صورت قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد (۲۴).

در دو مطالعه با روش‌های مشابه، اثر شیرخشت (به‌صورت قطره خوراکی) در مقایسه با نوردرومانی برای درمان زردی نوزادان مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که استفاده از شیرخشت

^۱ mono- and bicyclic monoterpenes

هیدرازین کاهش دهد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه براساس طرح مصوب در کمیته اخلاق معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران (کد طرح: ۷۱۰۹) و کد اخلاق (IR.MAZUMS.REC.1399.420) می باشد. نویسندگان مقاله لازم می دانند از زحمات پرسنل دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور، پرسنل خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی مازندران و همچنین معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تشکر و قدردانی نمایند.

می تواند عوارض و بستری شدن نوزادان را کاهش داده و میزان ابتلاء به زردی را در نوزدان تازه متولد شده بکاهد (۹، ۲۴).

البته برخی مطالعات عدم تأثیر گیاه شیرخشت را در درمان زردی نشان داده اند و استفاده از عصاره شیرخشت در نوزادان مبتلا به هایپر بیلی روبینمیا نتوانست تأثیر چندانی بر روی سطح بیلی روبین داشته باشد که در تطابق با یافته های مطالعه حاضر نمی باشد (۲۵).

نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب فنیل هیدرازین جهت ایجاد هایپر بیلی روبینمیا مناسب بوده و شیرخشت قادر بوده غلظت بیلی روبین پلاسما را در موش های دچار هایپر بیلی روبینمیا با فنیل

References:

- Maisels MJ, McDonagh AF. Phototherapy for neonatal jaundice. *N Engl J Med* 2008;358(9):920-8.
- Stevenson DK, Vreman HJ, Wong RJ, editors. Bilirubin production and the risk of bilirubin neurotoxicity. *Seminars in perinatology*; 2011: Elsevier.
- Watchko J, Maisels M. Jaundice in low birthweight infants: pathobiology and outcome. *Arch Dis Child* 2003;88(6):F455-F8.
- Maamouri G, Boskabadi H, Mafinejad S, Bozorgnia Y, Khakshur A. Efficacy of oral zinc sulfate intake in prevention of neonatal jaundice. *Iran J Neonat* 2014;4(4):11-6.
- Tarhani F, Momennasab M, Delfan B, Zendeckar A, Zaman M. A study of oral Taranjabin effects on reducing neonat's hyperbilirubinemia. *Yafte* 2004;6(3):55-9.
- Dickoré WB, Kasperek G. Species of *Cotoneaster* (Rosaceae, Maloideae) indigenous to, naturalising or commonly cultivated in Central Europe. *Willdenowia* 2010;40(1):13-45.
- Azadbakht M, Pishva N, Alinejad F. Effect of Manna from *Cotoneaster discolor* on infant Jaundice (effect on blood bilirubin level). *J Med Plants* 2005;4(14):36-44.
- Fakhri M, Davoodi A, Hamzegardeshi Z, Farhadi R, Mousavinasab N, Keshtkar A, et al. Is *cotoneaster manna* improving the treatment of neonatal jaundice? *Bangladesh J Pharmacol* 2018;13(2):168-78.
- Fakhri M, Farhadi R, Mousavinasab SN, Yosefi SS, Hosseinimehr SJ, Azadbakht M. Effect of natural products on jaundice in Iranian neonates. *Jundishapur J Nat Pharmaceu Prod* 2019;14) 1.(
- Mansouri M, Ghotbi N, Bahadorbeigi L. Evaluation of the preventive effects of purgative manna on neonatal icterus in Sanandaj. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci* 2012;17(2).
- Ghotbi F. [Surveying the effect of *cotoneaster* spp. [shir khesht] on neonatal jaundice]. *Res Med* 2006;30(4):353-61.
- Yin J, Wennberg RP, Miller M. Induction of hepatic bilirubin and drug metabolizing enzymes by individual herbs present in the traditional Chinese medicine, yin zhi huang. *Dev Pharmacol Therapeut* 1993;20:186-94.
- Saravanan R, Viswanathan P, Pugalandi KV. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. *Life Sci* 2006;78(7):713-8.
- Memisoglu A, Kolgazi M, Yaman A, Bahadir E, Sirvanci S, Yeğen BÇ, et al. Neuroprotective effect of erythropoietin on phenylhydrazine induced hemolytic hyperbilirubinemia in neonatal rats. *Neurochem Res* 2017;42:1026-37.

15. Ebbesen F. Determination of serum bilirubin concentration during phototherapy of newborns and in vitro: results compared by the direct spectrometric method and the diazo method. *Clin Chem* 1977;23(4):695-9.
16. Ameli Z, Assarroudi A, Akrami R. Effect of bilineaster drop on neonatal hyperbilirubinemia. *Evid Based Care* 2017;6(4):66-73.
17. Rafieian-Kopaei M, Khoshdel A, Kheiri S, Shemian R. Cotoneaster: A safe and easy way to reduce neonatal jaundice. *Journal Clin Diagn Res* 2016;10(4):SC01.
18. Fakhri M, Davoodi A, Parviz M, Sadeghi Ghadi Z, Mousavinasab SN, Farhadi R, et al. Characterization and HPLC analysis of manna from some Cotoneaster species. *Int J Pharm Sci Res* 2017;8(12):5360-6.
19. Berger J. Phenylhydrazine haematotoxicity. *J Appl Biomed* 2007;5(3):125-30.
20. Shukla P, Yadav NK, Singh P, Bansode F, Singh R. Phenylhydrazine induced toxicity: a review on its haematotoxicity. *Int J Basic Appl Med Sci* 2012;2(2):86-91.
21. Gao Q, Zhao X, Yin L, Zhang Y, Wang B, Wu X, et al. The essential oil of *Artemisia capillaris* protects against CCl₄-induced liver injury in vivo. *Revista Brasileira Farmacognosia* 2016;26:369-74.
22. Ridlon JM, Harris SC, Bhowmik S, Kang D-J, Hylemon PB. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes* 2016;7(1):22-39.
23. Bosek P, Nakano M. Hepatoprotective effect of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on CCl₄-induced liver damage in rats. *Physiol Res* 2003;52(4):461-6.
24. Monsef A, Eghbalian F, Rahimi N. Comparison of purgative manna drop and phototherapy with phototherapy treatment of neonatal jaundice: A randomized double-blind clinical trial. *Osong Pub Health Res Persp* 2019;10(3):152.
25. Farhat A, Mohammadzadeh A, Amir M, Ramezani M. Effect of cotoneaster tricolor pojkark manna on serum bilirubin levels in neonates. *Int J Pharmacol* 2006;2(4):455-8.

OPTIMIZING THE CREATION OF HYPERBILIRUBINEMIA WITH PHENYLHYDRAZINE IN AN ANIMAL MODEL AND INVESTIGATING THE EFFECTS OF COTONEASTER ON BLOOD BILIRUBIN IN RATS WITH HYPERBILIRUBINEMIA

Faezeh Valipour¹, Jamshid Mehrzad^{2*}, Mohammad Azadbakht^{3,4}, Hamidreza Mohammadi⁵, Rahele Zhiani^{6,7}, Ali Davoodi^{8,9}, Fereshteh Talebpour Amiri¹⁰

Received: 22 January, 2023; Accepted: 11 March, 2023

Abstract

Background & Aims: Currently, cotoneaster is used as the herbal medicine to treat jaundice in neonates. The aim of this study was to create hyperbilirubinemia by phenylhydrazine and investigate the effects of cotoneaster on blood bilirubin levels in the rats with hyperbilirubinemia.

Materials & Methods: In the present experimental-interventional study, 70 µ/kg of phenylhydrazine was injected intraperitoneally to 15 days old Wistar rats. The rats with hyperbilirubinemia were divided to three groups. 48 hours later, cotoneaster with doses of 1, 2.5 and 5 mg/kg was fed to the animals through oropharyngeal tubes in 3 times for 10 days. Then, by taking blood and measuring total serum bilirubin at different hours, the curve of bilirubin changes was drawn up to 48 hours of the first injection of phenylhydrazine. Also, one group was selected as a control (healthy mice). 10 rats were selected in each group (5 females and 5 males). Descriptive statistics including mean and standard deviation were used for data analysis.

Results: The results showed the comparison of plasma bilirubin levels on day 0 and after phenylhydrazine injection increased significantly (up to 6 mg/dl) ($p < 0.05$). The oral administration of cotoneaster in all three experimental doses caused a significant decrease in bilirubin in jaundiced rats compared to the control group, in such a way that the values were up to 0.2 mg/dl, up to 0.4 mg/dl and even up to 0 mg/dl reported ($p < 0.05$).

Conclusion: Animal study evidence showed the compound of phenylhydrazine has the ability to be used in creating an animal model of hyperbilirubinemia, and clay milk reduces its hyperbilirubinemic effects.

Keywords: Physiological jaundice, Phenylhydrazine, Bilirubin, Cotoneaster, Herbal medicines

Address: Faculty of pharmacy, Mazandaran university of medical sciences, Sari, Iran

Tel: +989150037613

Email: mehrzadjam@yahoo.com

SOURCE: STUD MED SCI 2022; 33(9): 683 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2022 Studies in Medical Sciences

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ Biochemistry Ph.D. student, Department of biochemistry, Neyshabur branch, Islamic azad university, Neyshabur, Iran

² Assistant professor, Department of biochemistry, Neyshabur branch, Islamic azad university, Neyshabur, Iran (corresponding author)

³ Professor, Department of pharmacognosy, faculty of pharmacy, Mazandaran university of medical sciences, Sari, Iran

⁴ Medicinal plants research center, Mazandaran university of medical sciences, Sari, Iran

⁵ Associate professor, medicinal plants research center, Mazandaran university of medical sciences, Sari, Iran

⁶ Associate professor, Department of chemistry, Neyshabur branch, Islamic azad university, Neyshabur, Iran

⁷ New Materials Technology and Processing Research Center, Department of Chemistry, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

⁸ Assistant professor, Department of pharmacognosy, faculty of pharmacy, Mazandaran university of medical sciences, Sari, Iran

⁹ Traditional and complementary medicine research center, addiction institute, Mazandaran university of medical sciences, Sari, Iran

¹⁰ Associate professor, Department of anatomy, school of medicine, Mazandaran university of medical sciences, Sari, Iran