Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Protective effect of *Phlomis cancellata* hydroalcoholic extract on acute acetaminophen-induced hepatotoxicity in male rats

Halime Ajam[1], Maryam Tehranipour[1]*, Farahnaz Molavi[1]

ABSTRACT

Background and Aims: Acetaminophen is a common anti-analgesic and antipyretic medication that in high doses leads to liver and kidney necrosis in humans and animals. *Phlomis cancellata*, from the mint family, is a plant that has antioxidant properties. In the present study, the hepatoprotective effect of *Phlomis cancellata* hydroalcoholic extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats was investigated.

Materials and Methods: In this study, 36 male rats were divided into six groups, each including six rats: control group, negative control group, and positive control group (receiving silymarin at a dose of 200 mg/kg) and three experimental groups. All groups, except the control group, were treated with acetaminophen at a dose of 400 mg/kg body weight, and the treatment groups of 1, 2, and 3 received a hydroalcoholic extract of *Phlomis cancellata* (at 200, 500, and 1,000 mg/kg body weight), respectively. After 24 h, all rats were anesthetized and blood was drawn from the heart to examine albumin and bilirubin, and liver enzymes of (ALP, AST, and ALT). Sections of the liver were removed for histological studies. The collected data was analyzed in Minitab software (version 16). The findings were compared using post hoc Tukey and one-way ANOVA tests.

Results: The results indicated that in the treatment and positive control groups, the amount of liver enzymes decreased significantly compared to the negative control group ($P<0.001$). Histopathologically, necrosis and lymphocytic infiltration were reduced in the groups receiving *Phlomis cancellata* extract and silymarin.

Conclusion: Hydroalcoholic extract of *Phlomis cancellata* had a protective role in improving acute acetaminophen-induced hepatotoxicity.

Keywords: Acetaminophen, Antioxidant, Hepatotoxicity, *Phlomis cancellata*

Citation: Ajam H, Tehranipour M, Molavi F. [Protective effect of Phlomis cancellata hydroalcoholic extract on acute acetaminophen-induced hepatotoxicity in male rats]. J Birjand Univ Med Sci. 2022; 29(3): 207-217. [Persian]

DOI https://www.doi.org/10.34785/bums024.2023.003

Received: June 4, 2022 **Accepted:** November 12, 2022

[1] Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

***Corresponding author:** Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
Tel: +985138435050 Fax: +985138435050 E-mail: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

مقاله اصیل پژوهشی

بررسی اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی *Phlomis cancellata* در مسمومیت حاد کبدی ناشی از استامینوفن در موش‌های صحرایی نر

حلیمه عجم[۱]، مریم طهرانی پور[۱]*، فرحناز مولوی[۱]

چکیده

زمینه و هدف: استامینوفن یک داروی متداول ضد درد و ضد تب است که در دوزهای بالا منجر به نکروز کبدی و کلیوی در انسان و حیوان می‌گردد. گیاه *Phlomis cancellata*، از خانواده نعناییان، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است. در تحقیق حاضر، اثر محافظت کبدی عصاره هیدروالکلی *Phlomis cancellata* در مسمومیت کبدی ناشی از استامینوفن در رت بررسی شده است.

روش تحقیق: در این مطالعه ۳۶ رت نر، در ۶ گروه ۶ تایی شامل: گروه کنترل، گروه کنترل منفی، گروه کنترل مثبت (دریافت‌کننده سیلیمارین با دوز mg/kg ۲۰۰). به تمام گروه‌ها به جز کنترل، استامینوفن با دوز ۴۰۰ میلی گرم برکیلوگرم وزن بدن داده شدو گروه‌های درمان ۱، ۲ و ۳ به‌ترتیب (دوز های mg/kg ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰) از عصاره هیدروالکلی *Phlomis cancellata* را دریافت کردند. پس از ۲۴ ساعت، تمام رت‌ها بی‌هوش شده و از قلب جهت ارزیابی آلبومین و بیلی‌روبین و آنزیم‌های کبدی (ALP، AST و ALT) خون‌گیری شد. بخشی از کبد جهت مطالعات بافتی نمونه‌برداری شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار Minitab نسخه۱۶ آنالیز شدند. داده‌ها با آزمون one- way ANOVA و آزمون تعقیبی توکی با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته‌ها: بر اساس نتایج، در گروه‌های درمان و کنترل مثبت میزان آنزیم‌های کبدی نسبت به گروه کنترل منفی کاهش معنی‌داری داشته است (P<۰/۰۰۱). از نظر هیستوپاتولوژیک نیز، نکروز و ارتشاح لنفوسیتی در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره *Phlomis cancellata* و گروه سیلیمارین کاهش یافته بود.

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی *Phlomis cancellata* در بهبود مسمومیت حاد کبدی ناشی از استامینوفن نقش محافظتی دارد.

واژه‌های کلیدی: استامینوفن، آنتی‌اکسیدان، مسمومیت کبدی، *Phlomis cancellata*

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۱؛ ۲۹ (۳): ۲۰۷-۲۱۷.

دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۴ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۲۱

[۱] گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

***نویسنده مسئول:** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

آدرس: مشهد- دانشگاه آزاد اسلامی- واحد مشهد- دانشکده علوم- گروه زیست شناسی

تلفن: ۰۵۱۳۸۴۳۵۰۵۰ نمابر:۰۵۱۳۸۴۳۵۰۵۰ پست الکترونیکی: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

مقدمه

آسیب کبدی ناشی از دارو[1] (DILI) عارضه‌ای معمول در میان مشاهدات بالینی در بیماران مبتلا به اختلالات کبدی می‌باشد (۱). بروز زردی به همراه افزایش ترانس‌آمینازها در بیمار مبتلا به مسمومیت کبدی ناشی از دارو با مرگ‌ومیر ۱۰٪ همراه است (۲). آسیب کبدی ناشی از دارو یک علت عمده بیماری کبدی حاد و مزمن است و شدت این آسیب از تغییرات غیر اختصاصی در ساختار کبد تا نارسایی حاد کبد، سیروز و سرطان کبد متغیر است (۳). بیش از ۵۰ درصد موارد نارسایی حاد کبد منتج از مسمومیت کبدی ناشی از دارو است که در این میان داروی استامینوفن نقش مهمی دارد؛ به‌طوری که امروزه از آن به‌عنوان یک علت اصلی نارسایی حاد کبد یاد می شود. با این حال مرگ‌ومیر بیماران مبتلا به نارسایی حاد کبد ثانویه به دارو در مسمومیت با سایر داروها (غیر از استامینوفن) نیز شایع است (۴). استامینوفن[2]، N-استیل-p آمیوفتل (APAP)، یا پاراستامول[3] به‌عنوان یک داروی ضد درد و ضد تب استفاده می‌شود. اتانول، تیواستامید، استامینوفن و تتراکلریدکربن از جمله ترکیباتی هستند که پس از ورود به بدن به‌وسیله سیستم سم‌زدایی سیتوکروم P450 متابولیزه می‌شوند که محصول متابولیزه آن‌ها، باعث آسیب به بافت‌های مختلف بدن به‌خصوص کبد می‌شود (۵). مطالعات نشان می‌دهند که فلاونوئیدها و ترکیبات فنولیک در گیاهان دارای اثرات بیولوژیکی متعددی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، مهارکننده رادیکال‌های آزاد و اثرات ضدالتهابی می‌باشند (۶).

گیاه گوش‌بره (*Phlomis cancellata*)، گیاهی پایا و یک ساله است که پراکنش چشم‌گیری در مراتع استان خراسان، گلستان و مازندران دارد (۷). این جنس گونه‌ای معطّر و از نظر شیمیایی منحصر به فرد است. از این گیاه در طب سنتی ایران استفاده می‌شود. *Phlomis cancellata* گونه‌ای غالب در مناطق شمال شرق ایران است. این گونه سمی نیست و شکل زندگی همی‌کریپتوفیت[4] دارد (۸). بسیاری از سرده‌های این تیره در پزشکی مدرن و سنتی استفاده می‌شوند به‌طوری‌که تعدادی از گونه‌های آن در درمان بیماری‌های مرتبط با سیستم گوارشی مانند نفخ شکم و سوء هاضمه مورد استفاده قرار می‌گیرند. هم‌چنین درمان عفونت‌ها و تقویت بدن از دیگر مصارف پزشکی این گروه به شمار می‌آید (۹). ترکیبات موجود در گیاهان این تیره به طور عمده شامل؛ فلاونوییدها و ترکیبات پلی‌فنولی می‌باشند. هم‌چنین این گیاهان به‌طور سنتی در درمان اختلالات عصبی مثل افسردگی اضطراب و کم‌خوابی و افزایش حافظه استفاده می‌شوند (۱۰، ۹).

با توجه به گستردگی مصرف استامینوفن و نظر به سمی بودن سوء مصرف این داروی متداول در اثر آسیب کبدی و کلیوی که می‌تواند منجر به مرگ شود، دستیابی به راهکارهای مناسب برای پیشگیری و کاهش مسمومیت‌های احتمالی ناشی از مصرف استامینوفن کاملاً ضروری به نظر می‌رسد. استفاده از پتانسیل گیاهان دارویی به علت ارزان بودن و دردسترس بودن و نداشتن عوارض جانبی می‌تواند مفید باشد. با توجه به موارد فوق هدف از این مطالعه بررسی اثرات حفاظتی عصاره گیاه گوش‌بره بر مسمومیت حاد کبدی ناشی از مصرف استامینوفن در رت می‌باشد.

روش تحقیق

این مطالعه آزمایشگاهی در سال ۱۴۰۰ در گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شد. در این تحقیق از ۳۶ سر موش صحرایی نر با محدوده وزنی ۵۰ ±۲۵۰ گرم استفاده شد. موش‌ها در اتاق حیوانات با حرارت ۱۰± ۲۳ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. تمامی مراحل آزمایش برای تمامی گروه‌های مورد بررسی در شرایط کاملاً یکسان انجام گرفت. حیوانات ضمن دسترسی مداوم به آب و غذا امکان تطابق با محیط برایشان فراهم شد.

در طول انجام مراحل آزمایش کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده و مقاله دارای کد اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1400.123 از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی مشهد است.

گیاه گوش‌بره با نام علمی *Phlomis cancellata* از اطراف مشهد جمع‌آوری شده و پس از تأیید کارشناس و اخذ کد هرباریوم

[1] Drug-induced liver injury
[2] Acetaminophen
[3] Paracetamol
[4] Hemicryptophyte

E-1343 FUMH، به‌وسیله دستگاه سوکسله عصاره هیدروالکلی آن تهیه شد. برگ‌ها در حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد در سایه خشک شده و توسط آسیاب مکانیکی به‌صورت پودر در آمدند. سپس با اتانول ۱۰۰ درصد مخلوط شد. برای تهیه عصاره هیدروالکلی از مخلوط الکل و آب مقطر به‌عنوان حلال استفاده شد. مخلوط حاصله در دستگاه سوکسله قرار داده شد و عصاره به‌دست آمده توسط دستگاه روتاری خشک شد. در زمان آزمایش که در سه روز متوالی صورت گرفت، رت‌ها به‌طور تصادفی به ۶ گروه ۶ تایی تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل: در روز اول ساعت ۸ صبح و ۱۶ نیم سی‌سی حلال (سرم فیزیولوژیکی) را از طریق گاواژ دریافت کردند؛ سپس این گروه به مدت ۲۴ ساعت ناشتا نگه داشته شد. در روز دوم، ساعت ۸ صبح تزریق خوراکی حلال صورت گرفت و سپس ۲ ساعت بعد از تزریق و ساعت ۱۶ نیز گاواژ حلال صورت گرفت.

۲- گروه کنترل منفی: در روز اول ساعت ۸ صبح و ۱۶ نیم سی‌سی حلال را از طریق گاواژ دریافت کردند. سپس این گروه به مدت ۲۴ ساعت ناشتا نگه داشته شد. در روز دوم، صبح ساعت ۸ تزریق خوراکی حلال صورت گرفت. پس از آن، ۲ ساعت بعد از تزریق به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن استامینوفن به‌صورت خوراکی در نیم سی‌سی حلال دریافت کردند و ساعت ۱۶ نیز گاواژ حلال صورت گرفت.

۳- گروه کنترل مثبت: در روز اول ساعت ۸ صبح و ۱۶ نیم سی‌سی حلال به همراه سیلیمارین را از طریق گاواژ دریافت کردند. سپس این گروه به مدت ۲۴ ساعت ناشتا نگه داشته شد. در روز دوم، صبح ساعت ۸ تزریق خوراکی حلال و سیلیمارین صورت گرفت. سپس ۲ ساعت بعد از تزریق به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن استامینوفن به‌صورت خوراکی در نیم سی‌سی حلال دریافت کردند و ساعت ۱۶ نیز گاواژ حلال و سیلیمارین صورت گرفت.

۴، ۵ و۶- گروه های تیمار ۴، ۵ و۶: در روز اول ساعت ۸ صبح و ۱۶ بعد از ظهر به میزان نیم سی‌سی حلال به همراه عصاره گوش‌بره با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را از طریق گاواژ دریافت کردند. سپس این گروه به مدت ۲۴ ساعت ناشتا نگه داشته شد. در روز دوم، صبح ساعت ۸ تزریق خوراکی حلال و به همراه عصاره گوش بره با دوزهای ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم صورت گرفت (۱۱). سپس ۲ ساعت بعد از تزریق به میزان ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن استامینوفن به‌صورت خوراکی در نیم سی‌سی حلال دریافت کردند و ساعت ۱۶ نیز گاواژ حلال و به همراه عصاره گوش‌بره با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم صورت گرفت.

پس از گذشت ۲۴ ساعت از تزریق استامینوفن رت‌ها بیهوش شده و نمونه خون از قلب آن‌ها جهت اندازه‌گیری ALP[1]، GOT[2] و GPT[3] گرفته شد. هم‌چنین بخشی از بافت کبدی جهت مطالعات هیستوپاتولوژیکی برداشته شد. نمونه‌های خون برای اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی، توسط لوله هپارینه به آزمایشگاه تشخیص طبی انتقال یافت و توسط دستگاه اتو انالایزر ارزیابی شدند. تمامی فاکتورها از جمله آنزیم‌های کبدی و آلبومین و بیلی‌روبین در آزمایشگاه تشخیص طبی بررسی گردیدند. نمونه‌های بافت کبد در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و پس از طی مراحل آب‌گیری و آب‌دهی بلوک‌های پارافینی از آن‌ها تهیه و توسط میکروتوم برش‌گیری گردید. سپس برش‌ها با رنگ هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی و لام‌ها فیکس شده و توسط میکروسکوپ تغییرات بافتی در گروه‌های مختلف بررسی گردید. تحلیل آنزیم‌های کبدی با آزمون واریانس یک طرفه one way-ANOVA و تست تعقیبی Tukey با استفاده از نرم‌افزار Minitab ۱۶ انجام شد. نتایج به‌صورت انحراف معیار±میانگین متوسط و سطح معنادار در محدوده اطمینان ۹۵ درصد بیان شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی فاکتورهای خونی و آنزیم‌های کبدی در گروه‌های آزمایش شده در جدول ۱ و نمودار ۱، ۲ و ۳ آمده است.

[1] Alkaline Phosphatase
[2] Aspartate Aminotransferase
[3] Alanine Amino Transferase

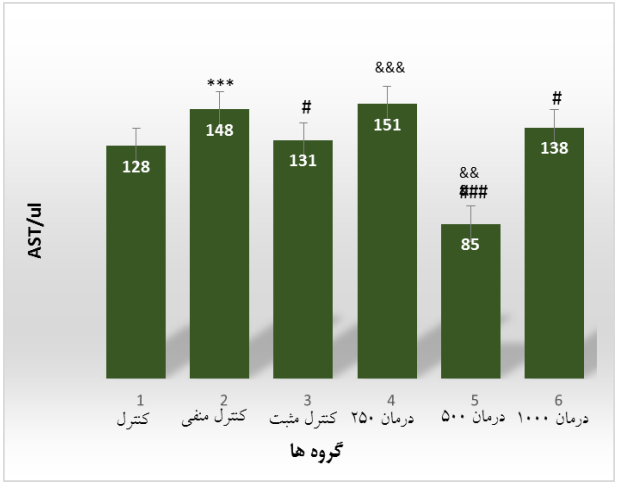
جدول ۱- میانگین فاکتورهای بیوشیمیایی سرم (آلبومین و بیلی‌روبین) در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

متغیر / گروه	آلبومین (mg/dl)	بیلی‌روبین توتال (mg/dl)	بیلی‌روبین مستقیم (mg/dl)
کنترل	۳/۳±۰/۱	۰/۷±۰/۰۱	۰/۲±۰/۰۱
کنترل منفی	۱/۹۷±۰/۱	۰/۹±۰/۰۱	۰/۲±۰/۰۱
کنترل مثبت	۱/۸±۰/۱	۰/۷۲±۰/۰۱	۰/۱۵±۰/۰۱
درمان ۱	۲/۱±۰/۱	۰/۶±۰/۰۱	۰/۱۲±۰/۰۱
درمان ۲	۳/۱±۰/۱	۰/۶±۰/۰۱	۰/۱۳±۰/۰۱
درمان ۳	۳/۲±۰/۱	۰/۷±۰/۰۱	۰/۱۵±۰/۰۱

مقایسه نتایج آلبومین نشان می‌دهد در گروه کنترل منفی میانگین نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشته است (P<۰/۰۰۱). مقایسه گروه‌های تجربی (القای مسمومیت + عصاره) و کنترل مثبت با گروه کنترل منفی نیز تغییراتی را نشان می‌دهد. به‌طوری‌که گروه کنترل مثبت نسبت به کنترل منفی کاهش چشم‌گیری را نشان می‌دهد که معنی‌دار نیست. در حالی‌که در گروه‌های درمان همگی افزایش معنی‌داری را در سطح سرمی آلبومین نسبت به کنترل منفی نشان می‌دهند.

مقایسه نتایج بیلی‌روبین توتال نشان می‌دهد، در گروه کنترل منفی میانگین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است (P<۰/۰۰۱). مقایسه گروه‌های تجربی (القای مسمومیت + عصاره) و کنترل مثبت با گروه کنترل منفی نیز تغییراتی را نشان می‌دهد. به‌طوری‌که، گروه کنترل مثبت و گروه‌های درمان همگی افزایش معنی‌داری را در سطح سرمی بیلی‌روبین توتال نسبت به کنترل منفی نشان می‌دهند (P<۰/۰۰۱). همچنین مقایسه تک‌تک درمان با کنترل مثبت نشان داد که گروه درمان با دوز ۲۵۰ و ۵۰۰ نسبت به کنترل مثبت کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۰۱) را نشان می‌دهد. این در حالی است که کاهش در گروه درمان با دوز ۱۰۰۰ نسبت به گروه کنترل مثبت معنی‌دار نیست.

مقایسه نتایج آنزیم‌های کبدی در نمودار ۱، ۲ و ۳ مشخص شده است.



نمودار ۱- مقایسه میانگین AST در گروه‌های مورد مطالعه.

داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار نشان داده شده است

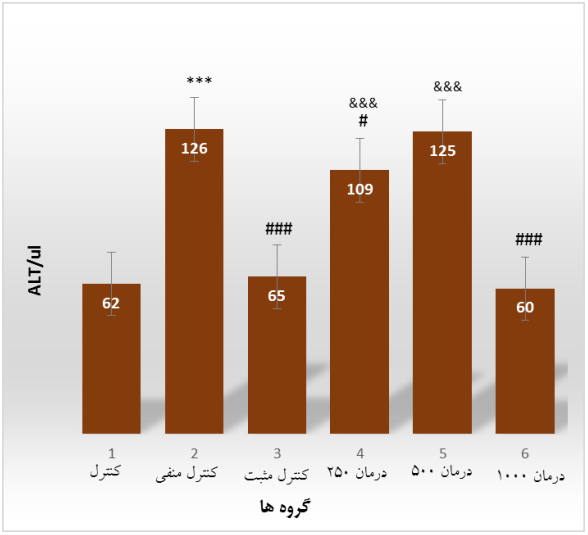
*** (P<۰/۰۰۱) نمایانگر مقایسه کنترل با کنترل منفی

###,# (P<۰/۰۰۱) و (P<۰/۰۵) نمایانگر مقایسه تک‌تک گروه‌های درمانی و کنترل مثبت با کنترل منفی

&&& (P<۰/۰۰۱) نمایانگر مقایسه تک‌تک گروه‌های درمانی با کنترل مثبت

نتایج نشان می‌دهد در گروه کنترل منفی میانگین ALT نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است (P<۰/۰۰۱). مقایسه گروه‌های (القای مسمومیت + عصاره) و کنترل مثبت با گروه کنترل منفی نیز تغییراتی را نشان می‌دهد. به‌طوری که گروه کنترل مثبت نسبت به کنترل منفی کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) را نشان داد. همچنین در گروه‌های درمان، گروه درمان با دوز ۲۵۰ (P<۰/۰۰۱) و گروه درمان با دوز ۱۰۰۰ در مقایسه با کنترل منفی کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) را نشان داد. ولی مقایسه گروه درمان با

کنترل منفی با وجود نشان دادن کاهش، معنی‌دار نبود. همچنین مقایسه تک‌تک گروه درمان با کنترل مثبت نشان داد که گروه‌های درمان با دوز ۲۵۰ و ۵۰۰ نسبت به کنترل مثبت افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۰۱). گروه درمان با دوز ۱۰۰۰ نسبت به کنترل مثبت کاهش چشم‌گیری را نشان داد که معنی‌دار نبود.



نمودار۲- مقایسه میانگین ALT در گروه‌های مورد مطالعه.

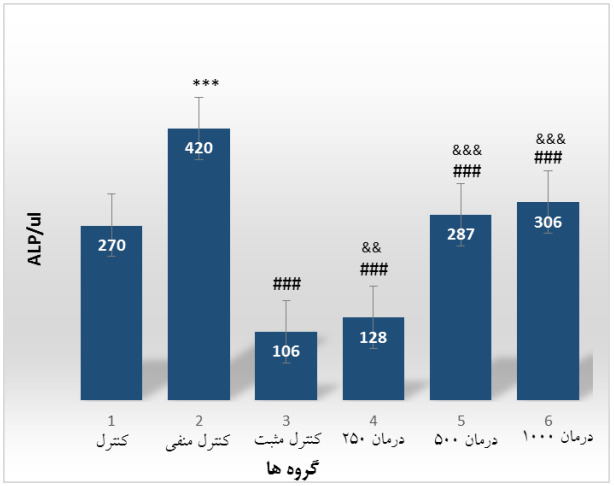
داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار نشان داده شده است

*** (P<۰/۰۰۱) نمایانگر مقایسه کنترل با کنترل منفی

#,### (P<۰/۰۰۱) و (P<۰/۰۵) نمایانگر مقایسه تک‌تک گروه‌های درمانی و کنترل مثبت با کنترل منفی

&&& (P<۰/۰۰۱) نمایانگر مقایسه تک‌تک گروه‌های درمانی با کنترل مثبت

نتایج نشان می‌دهد در گروه کنترل منفی میانگین ALP نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است (P<۰/۰۰۱). مقایسه گروه‌های (القای مسمومیت + عصاره) و کنترل مثبت با گروه کنترل منفی نیز همگی کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۱). همچنین مقایسه تک‌تک درمان با کنترل مثبت همگی افزایشی را نشان داد. به‌طوری که افزایش در گروه‌های درمان با دوز ۲۵۰ و دوز ۱۰۰۰ معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) و در گروه درمان با دوز ۵۰۰ معنی‌داری (P<۰/۰۱) نسبت به کنترل مثبت مشاهده شد.



نمودار ۳- مقایسه میانگین ALP در گروه‌های مورد مطالعه.

داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار نشان داده شده است

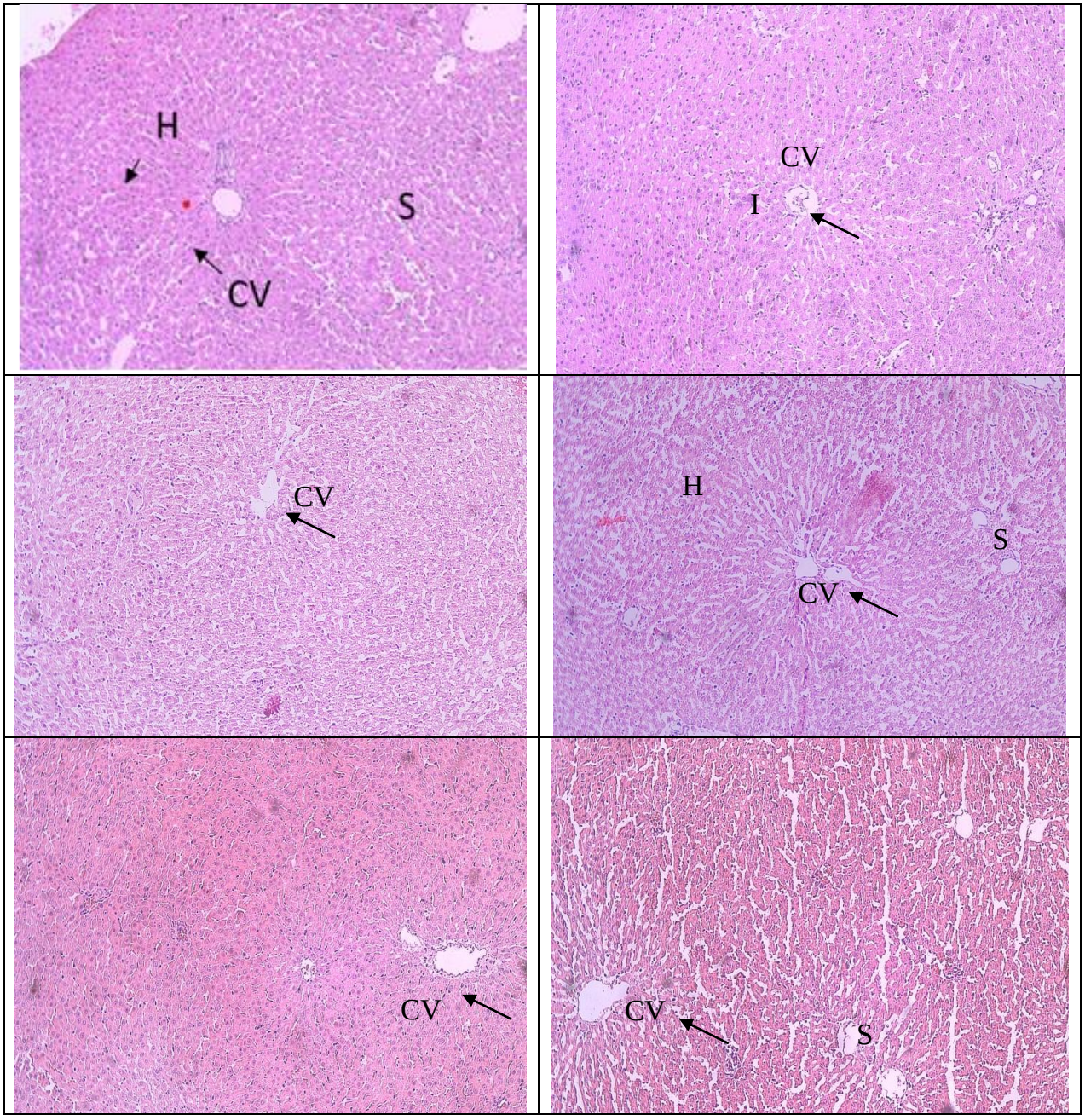
*** (P<۰/۰۰۱) نمایانگر مقایسه کنترل با کنترل منفی

(P<۰/۰۰۱) نمایانگر مقایسه تک‌تک گروه‌های درمانی و کنترل مثبت با کنترل منفی

&&& (P<۰/۰۰۱) نمایانگر مقایسه تک‌تک گروه‌های درمانی با کنترل مثبت

در تصویر شماره ۱، تغییرات آسیب شناسی بافتی تمامی گروه‌ها مقایسه گردیده است. در مشاهدات ریزبینی بافت کبد موش‌های گروه اول (کنترل) ساختار بافت کبدی سالم و طبیعی مشاهده شد. نمونه‌های بافتی کبد موش‌های گروه دوم که بدون درمان بودند تغییرات دژنراتیو متوسط تا شدید به همراه ارتشاح تک هسته‌ای‌ها و پرخونی مشاهده گردید. کبد موش‌های گروه سوم که ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن عصاره گوش‌بره دریافت کردند، تغییرات دژنراتیو متوسط به همراه ارتشاح تک هسته‌ای مشاهده گردید.

در نمونه‌های بافتی کبد موش‌های گروه های سوم و چهارم دریافت کننده دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره گوش‌بره در مقایسه با گروه‌های دوم و سوم، کاهش بسیار قابل ملاحظه‌ای در آسیب بافتی به همراه ارتشاح تک هسته‌ای‌ها و در نمونه‌های بافتی (D&E)، پرخونی مشاهده گردید. کبد موش‌های گروه ششم که سیلیمارین دریافت کردند آسیب بافتی در مقایسه با گروه اول که شاهد است بسیار خفیف داشتند که حاکی از توانایی بالای سیلیمارین در حفاظت کبدی است.



تصاویر- اثر عصاره گوش‌بره بر نمای ریزبینی کبد موش‌های صحرایی مورد آزمایش (هماتوکسیلین -ائوزین)درشت‌نمایی x۱۰۰۰

چپ بالا: کبد موش‌های صحرایی شاهد سالم- راست بالا: کنترل منفی- چپ وسط: کنترل مثبت- راست وسط: گروه درمان با دوز ۲۵۰، راست پایین: گروه درمان با دوز ۱۰۰۰ و چپ پایین: گروه درمان با دوز ۵۰۰

ورید مرکزی=CV، سینوزوئید=S، هپاتوسیت=H، التهاب اطراف ورید مرکزی=I

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز استامینوفن در موش‌های صحرایی باعث افزایش معنی‌داری در سطوح آنزیم‌های کبدی آسپارتات امینوترانسفراز (AST[1]) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT[2]) و آلکالین فسفاتاز (ALP[3])، که نشانه آسیب کبدی القا شده توسط استامینوفن است می‌شود. فرآیندهای پیام‌رسانی درون سلولی استامینوفن که منجر به مسمومیت کبدی می‌شود، با تولید بیش از حد NAPQI[4] توسط مصرف بیش از حد استامینوفن همراه است که باعث کاهش GSH[5] در سیتوپلاسم، شبکه اندوپلاسمی و میتوکندری که منجر به استرس اکسیداتیو میتوکندری می‌شود (۱۲، ۱۱). این امر باعث اختلال در چرخه کربس و عملکرد بتا اکسیداسیون، کاهش ATP و باز شدن منافذ میتوکندریایی که منجر به انتقال پروتئین‌های میتوکندریایی مانند فاکتور القا کننده آپوپتوز (AIF) و اندونوکلئاز G (Endo G) به هسته می‌شود. این پدیده منجر به تکه‌تکه شدن DNA هسته‌ای و در نهایت موجب نکروز سلولی می‌شود. علاوه بر آن گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) ناشی از NAPQI مسیرهای سیگنال‌دهی JNK را فعال می‌کند که در پی آن مسیرهای سیگنالینگ Nrf2، p53، آدیپونکتین و FGF21 برای مقابله با استرس و آسیب سلولی فعال می‌شوند (۱۴، ۱۳).

تجویز عصاره هیدروالکلی گیاه گوش‌بره در گروه‌های تجربی تحت درمان نشان داد که عصاره این گیاه قادر به کاهش مؤثری در تغییرات مقادیر سرمی AST،ALT وALP می‌باشد؛ به‌طوری که میزان آلبومین و بیلی‌روبین توتال در گروه‌های درمانی ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم گوش بره به مقادیر گروه کنترل رسیده است. در مقایسه مقادیر آنزیم‌های کبدی گروه درمانی عصاره گوش بره ۱۰۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مقادیر گروه کنترل نزدیک‌تر است که با مطالعات به‌دست آمده با سایر گیاهان هم‌خوانی دارد (۱۶، ۱۵). مشخص شده است که جنس *Phlomis* به واسطه برخورداری از ترکیبات فنولی مختلف، توانسته است نقش بسیار مهمی در ایجاد خواص آنتی‌اکسیدانی داشته باشد (۱۷). نتایج تحقیقات متعدد نشان می‌دهد که فعالیت‌های مختلفی برای *Phlomis* به‌عنوان ضد التهاب، ضد دیابت، ضد اکساینده، ضد جهش‌زایی، پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد، ضد میکروب، ضد حساسیت، ضد سرطان، حفاظت‌کننده سیستم عروقی، درمان بیماری‌های مختلف مانند زخم معده و هموروئید وجود دارد (۱۹، ۱۸).بنابراین احتمالاً این گیاه از طریق اثرات ضد التهابی خود توانسته بر آنزیم‌های کبدی اثرات مثبتی داشته باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد در مواردی مانند آنزیم AST گروه درمانی دوز ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بهتر از کنترل مثبت پاسخ داده است و اختلاف معنی‌داری داشته است. در مورد آنزیم ALT گروه تجربی درمانی دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از گروه کنترل مثبت بیشتر توانسته کاهش ایجاد کند. این داده‌ها مشخص می‌کند که گاهی عصاره گیاه بهتر از دارو می‌تواند مسمومیت کبدی را مهار کند.

مطالعات نشان می‌دهند که فلاونوئیدها و ترکیبات فنولیک در گیاهان دارای اثرات بیولوژیکی متعددی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، مهارکننده رادیکال‌های آزاد و اثرات ضد التهابی می‌باشند (۲۲– ۲۰).

در بررسی خورسندی و همکارانش تأثیر محافظتی عصاره زردچوبه با دوزهای ۲۰۰ ، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر سمیت کبدی ناشی از استامینوفن کاهش معنی‌داری را در افزایش حاد AST،ALT و ALP ایجاد کرد (۲۳). در این رابطه مطالعه قبلی نشان داد که استفاده از عصاره ریشه گیاه موتان[6] می‌تواند از آسیب سلولی توسط دوز توکسیک استامینوفن جلوگیری به‌عمل آورد. مطالعات نشان داد که این اثر رفع مسمومیتی عصاره ریشه گیاه موتان ناشی از جلوگیری از تخلیه مخازن گلوتاتیون توسط استامینوفن و مهار فعالیت هیدروکسیلازهای وابسته به سیتوکروم 450P سلول‌های کبدی است (۲۴). بنابراین در این تحقیق نیز با توجه به اثرات قوی، مهار اثر سمی استامینوفن توسط عصاره گیاه گوش‌بره احتمالاً این اثر مربوط به ترکیبات آنتی‌اکسیدانی پلی فنلی

[1] Alanine Amino Transferase
[2] Aspartate Aminotransferase
[3] Alkaline Phosphatase
[4] N-acetyl-p-benzoquinoneimine
[5] Glutathione
[6] Mutan

و فلاونویید، آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، استرول و تنین موجود در عصاره گوش‌بره است که قادر به افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌های کبدی است. مطالعات نشان داده که دوزهای حاد مواد سمی و برخی از داروها مانند استامینوفن یا مصرف طولانی مدت بعضی مواد و داروها می‌تواند موجب تولید مقادیر بالایی از رادیکال‌های فعال شود که این رادیکال‌ها قادرند بر سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی غلبه نمایند و موجب آسیب‌های کبدی شوند که با نتایج این تحقیق هم خوانی دارد (۲۷– ۲۵). از طرفی آسیب کبدی ایجاد شده باعث ایجاد تغییرات بافتی می‌گردد که در نتیجه نکروزه شدن سلول‌ها می‌باشد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ماکروفاژها در پاسخ به آسیب بافتی، فعال شده و میانجی‌های سمی آزاد می‌کنند. از جمله میانجی‌های بسیار سمّی و فعال می‌توان فاکتور نکروز دهنده الفا و اینترلوکین‌ها را نام برد. همچنین نشان داده شد که تجمع این سلول‌ها و ترشح میانجی‌های سمّی در مناطقی که هنوز نکروز نشده‌اند در ایجاد سمّیت کبدی نقش داشته و در واقع باعث تشدید نکروز کبدی می‌گردند (۲۸). نتایج هیستوپاتولوژی رت‌ها، حاکی از التهاب در ساختار لبول‌های کبدی بود به نحوی که ترشح سلول‌های تک هسته‌ای در اطراف ورید مرکزی مشاهده گردید. که در گروه کنترل منفی در ساختار لبول کبدی در اطراف ورید مرکزی التهاب به صورت تجمع تک هسته‌ای و بی‌نظمی در آرایش صفحات سلول کبدی (رشته رمارک) اتساع ورید مرکزی و سینوزوئیدهای آن، پرخونی سینوزوئید، اتساع سینوزوئید، اتساع و بزرگ شدن ناحیه پورتال، پرخونی عروق پروتال، پرخونی رگ مرکزی، دژنراسیون هپاتوسیت ها نکروز پارانشیم کبد دیده شد .در گروه‌های تجربی ساختار لبول کبد در مقایسه با گروه کنترل منفی، التهاب به‌صورت تجمع تک هسته‌ای در اطراف ورید مرکزی مشاهده نشد (اثر حفاظتی عصاره)، سینوزوئیدها متسع و پر از التهاب نمی‌باشند. بی‌نظمی کمتری در صفحات سلول کبدی (رشته رمارک) مشاهده می‌شود. اتساع و بزرگ شدن ناحیه پورتال و پرخونی عروق پروتال مشاهده نشد. دژنراسیون هپاتوسیت‌ها و پرخونی رگ مرکزی و نکرور پارانشیم کبد مشخص نبود .یک مکانیسم احتمالی در رابطه با اثرات مفید عصاره گیاه گوش بره بر تغییرات بافتی کبدی، می‌تواند ناشی از حضور آلکالوئیدها، فلانوئیدها و ترکیبات پلی فنولی طبیعی موجود در برگ این گیاه و با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا باشد (۲۹). Serteser و همکاران نشان دادند ویژگی ضدالتهاب و آنتی‌اکسیدانی روزاکنینا در بهبود آسیب کبدی مهم می‌باشد، به علت اینکه میوه روزاکنینا حاوی سطوح بالای مواد آنتی‌اکسیدانی است که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و محتوی ویتامین C سرم را بهبود می‌بخشد. به همین دلیل مصرف این گیاه اثرات حفاظتی بر بافت‌های بدن اعمال نموده و در جهت کاهش استرس اکسیداتیو عمل می‌کند (۳۰).

با توجه به مطالب بیان شده و تطابق نتایج مطالعات بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژی این مطالعه تجربی، احتمالاً عصاره هیدروالکلی گیاه گوش بره به‌دلیل داشتن مواد پلی فنلی مانند فلاونوئیدها با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا، تعامل با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، جلوگیری از تولید رادیکال‌های آزاد و واکنش با آن‌ها، کاهش انتشار سایتوکاین‌های التهابی و کاهش فعالیت سلول‌های التهابی از ایجاد و تخریب بافتی و پیشرفت آن به آسیب کبد جلوگیری می‌کند.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر مشخص گردید که گیاه گوش‌بره با کاهش زیست نشانگرهای سرمی ناشی از آسیب کبد و نیز کاهش آسیب بافتی، عملکرد این اندام را در موش‌های صحرایی دچار مسمومیت کبدی با استامینوفن بهبود بخشیده است، این پدیده احتمالاً از طریق فعالیت ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی عصاره اعمال می‌شود. در گروه‌های درمانی با عصاره گوش بره آنزیم‌های کبدی نسبت به گروه کنترل منفی کاهش یافته که نشانه محافظت در برابر مسمومیت کبدی ناشی از استامینوفن می‌باشد.

تقدیر و تشکّر

این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی Phlomis cancellata در مسمومیت حاد کبدی ناشی از استامینوفن در موش‌های صحرایی نر" در مقطع کارشناسی‌ارشد در سال ۱۴۰۰ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد مشهد (دانشکده علوم پایه) اجرا شده است. بدین‌وسیله از مدیریت

گروه زیست‌شناسی سرکار خانم دکتر بالانژاد به‌خاطر همکاری‌های بی‌دریغشان تشکر می‌شود.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1- Yoon E, Babar A, Choudhary M, Kutner M, Pyrsopoulos N. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: a comprehensive update. J Clin Transl Hepatol. 2016; 4(2): 131-42. DOI: 10.14218/JCTH.2015.00052

2- Fontana R J. Acute liver failure including acetaminophen overdose. Med Clin North Am. 2008; 92(4): 761-94. DOI: 10.1016/j.mcna.2008.03.005

3- Ebrahimi Daryani N, Taher M, Shirzad S. Drug induced liver injury: a review article. Govaresh. 2011; 15(4), 293-302. [Persian] URL: http://www.govaresh.org/index.php/dd/article/view/519.

4- Chang C, Schiano T. Review article: drug hepatotoxicity. Aliment Pharmacol Ther. 2007; 25: 1135-51. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2007.03307.x

5- Yao HT, Yang YC, Chang CH, Yang HT, Yin MC. Protective effects of (–)-epigallocatechin-3-gallate against acetaminophen-induced liver injury in rats. Biomedicine. 2015; 5(3): 16–21. DOI: 10.7603/s40681-015-0015-8

6- Asgari S, Ansari Samani R, Deris F, Shahinfard N, Salimi M, Mortazaei S, et al. Antioxidant activity and the lowering effect of hydroalcoholic extract of Allium hirtifolium boisson some haemostatic factors in hypercholesterolemic rabbits. J Mazandaran Univ Med Sci. 2012; 22(91): 40-8. [Persian] URL: http://jmums.mazums.ac.ir/article-1-1396-en.html

7- Shanmugam S, Manikandan K, and Rajendran K. Ethnomedicinal survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes and jaundice among the villagers of sivagangai district. Tamilnadu. Ethnobotanical Leaflets. 2009; 13: 189-94. https://opensiuc.lib.siu.edu/ebl/vol2009/iss1/22/

8- Erfanian M B, Memariani F, Atashgahi Z, Mesdaghi M, Saeedi M,Darrudi M, Ejtehadi H. Unpalatable plants induce a species-specific associational effect on neighboring communities. Sci Rep. 2021; 11(1): 1-11. DOI: 10.1038/s41598-021-93698-4

9- Naghibi F, Mosaddegh M, MohammadiMotamed M, Ghorbani A. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. Iran J Pharm Res. 2022; 4(2): 63-79 [Persian]. doi: 10.22037/ijpr.2010.619.

10- Adams M, Gmünder F, Hamburger M. Plants traditionally used in age related brain disorders: a survey of ethnobotanical literature. J Ethnopharmacol. 2007; 113(3): 363-81. DOI: 10.1016/j.jep.2007.07.016

11- James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. Drug Metab Dispos. 2003; 31(12): 1499-506. DOI: 10.1124/dmd.31.12.1499

12- Jaeschke H, Xie Y, McGill MR. Acetaminophen-induced liver injury: from animal models to humans. J Clin Transl Hepatol. 2014; 2(3): 153–161. DOI: 10.14218/JCTH.2014.00014

13- Yan M, Huo Y, Yin S, & Hu H. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. Redox Biol. 2018; 17: 274–83. DOI: 10.1016/j.redox.2018.04.019

14- Xie W, Wang M, Chen C, Zhang X, Melzig MF. Hepatoprotective effect of isoquercitrin against acetaminophen-induced liver injury. Life Sci. 2016; 152: 180–9. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.04.002

15- Devi, N. and R. Sangeetha. Acute and Sub-Acute Toxicity Assessment of the Hydroalcoholic Extract of Madhuca Longifolia Leaves in Wistar Rats. J Herbs Spices Med Plants. 2019; 25(3): 287-97. DOI: https://doi.org/10.1080/10496475.2019.1611687

16- Janghel V, Patel P, Chandel SS. Plants used for the treatment of icterus (jaundice) in Central India: A review. Ann Hepatol. 2019; 18(5): 658-672. DOI: 10.1016/j.aohep.2019.05.003

17- Taherkhani M, Masoudi S, Rustaiyan A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oil of iranian xanthogalum purpurascens. nashrieh shimi va mohandesi shimi iran. 2013; 31(3): 59-64 [Persian]. URL: https://www.nsmsi.ir/article_6988.html?lang=en

18- Lia M, Shanga X, Jia Z, Zhanga R. Phytochemical and Biological Studies of Plants from the Genus Phlomis. Chem. Biodivers. 2010; 7(2): 283-301. DOI: 10.1002/cbdv0200800136

19- Limem-Ben Amor I, Boubaker J, Ben Sgaier M, Skandrani I, Bhouri W, Neffati Aet al. Phytochemistry and biological activities of Phlomis species. J Ethnopharmacol. 2009; 125(2): 183-202. DOI: 10.1016/j.jep.2009.06.022

20- Jannu V, Baddam PG, Boorgula AK, Jambula SR. A review on hepatoprotective plants. Int J Drug Devel Res. 2012; 4(3): 1-8. https://www.itmedicalteam.pl/articles/a-review-on-hepatoprotective-plants-100747.html

21- Dias MC, Pinto DC, Silva AM. Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. Molecules, 2021. 26(17): 5377. DOI: 10.3390/molecules26175377

22- Syahputra RA, Harahap U, Dalimunthe A, Nasution MP, Satria D. The Role of Flavonoids as a Cardioprotective Strategy against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Review. Molecules. 2022; 27(4): 1320. DOI: 10.3390/molecules27041320

23- Khorsandi LS, Taheri mobarakeh M, Kalantari H. The protective effects of Curcuma longa extract on acetaminophen-induced acute hepatotoxicity in mice. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2007; 6(4): 219-26. [Persian] URL: http://journal.rums.ac.ir/article-1-382-en.htm

24- El-Agamy DS, Makled MN, Gamil NM. Protective effects of BML-111 against acetaminophen-induced acute liver injury in mice. J Physiol Biochem. 2014; 70(1): 141–9. DOI: 10.1007/s13105-013-0288-x

25- El Morsy EM, Kamel R. Protective effect of artichoke leaf extract against paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. Pharm Biol. 2015; 53(2): 167–73. DOI: 10.3109/13880209.2014.913066

26- James E. hepatoprotective effects of methanol extract of acanthus montanus (Acanthaceae) leaves on acetaminophen induced liver injury in rats. Pharmacology OnLine, 2020. 1: 248-60. https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2020/vol1/PhOL_2020_1_A026_Uroko.pdf

27- Li H, Liu Y, Li J, Liu Y, Dong L, Yin Y, et al. Mannan- binding lectin attenuates acetaminophen- induced hepatotoxicity by regulating CYP2E1 expression via ROS- dependent JNK/SP1 pathway. Eur J Immunol, 2019; 49(4): 564-75. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201847830

28- Dadkhah A, Fatemi F, Alipour M, Ghaderi Z, Zolfaghari F, Razdan F. Protective effects of Iranian Achillea wilhelmsii essential oil on acetaminophen-induced oxidative stress in rat liver. Pharm Biol. 2015; 53(2): 220–7. DOI: 10.3109/13880209.2014.913298

29- Harput US, Calis I, Saracoglu I, Donmez AA, Nagatsu A. Secondary metabolites from Phlomis syriaca and their antioxidant activities. Turk J Chem. 2006; 30: 383-90. https://journals.tubitak.gov.tr/chem/vol30/iss3/12/

30- Serteser A, Kargıolu M, Gök v, Arslan D. Antioxidant properties of some plants growing wild in Turkey. Grasas y aceites. 2009; 60 (2): 147-54. DOI: 10.3989/gya.086208. https://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/559