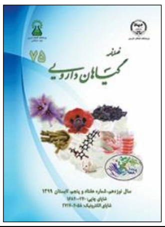


فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.ir

پژوهشکده گیاهان دارویی
جهاد دانشگاهی

مقاله تحقیقاتی

بررسی اثرات محافظت‌کنندگی عصاره آبی گلنار (*Punica granatum* L. var. *pleniflora*) در سمیت کبدی ناشی از تترا کلرید کربن در موش‌های صحرایی

سینا عندلیب[۱]، نگار ملکی‌نژاد[۱]، محمد کمالی‌نژاد[۲]، مهدی توکلی‌زاده[۳]، مریم نوبرانی[۱]، سونیا شهبازی زنجان مسکن[۱]، محمدرضا اسکندری[۱،*]

[۱] گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

[۲] گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۳] گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

اطلاعات مقاله

گل‌واژگان:
گلنار
آنتی‌اکسیدان
پلی فنل
تترا کلرید کربن
فلاونوئید
محافظت کبدی

چکیده

مقدمه: گلنار (*Punica granatum* var. *pleniflora*) از خانواده انار یا Puniaceae می‌باشد که به عنوان گل انار غیرمثمر شناخته می‌شود. **هدف:** در مطالعه کنونی، اثرات محافظت‌کنندگی کبدی عصاره آبی گلنار در سمیت کبدی القاء شده توسط تترا کلرید کربن (CCl_4) در موش‌های صحرایی نر و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی برون‌تن (*in vitro*) و درون‌تن (*in vivo*) این عصاره بررسی شد. خواص آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد در برون‌تن، به روش DPPH و اندازه‌گیری پلی فنل و فلاونوئید نیز ارزیابی شد. **روش بررسی:** سمیت کبدی بوسیله تتراکلرایدکربن القا شد و حیوان‌های مورد آزمایش سه دوز مختلف عصاره را به صورت خوراکی دریافت کردند. **نتایج:** در انتهای آزمایش غلظت سرمی مارکرهای آسیب کبدی شامل: آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، گاما گلوتامیل ترانسفراز (GGT)، بیلی‌روبین و پروتئین تام خون در حیواناتی که توسط تتراکلرایدکربن مسموم شده بودند، توسط عصاره کاهش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). علاوه بر این، در بخش درون‌تن عصاره توانست استرس اکسیداتیو کبدی ایجاد شده توسط تتراکلرایدکربن را کاهش دهد که با افزایش گلوتاتیون (GSH) و کاهش لیپیدپراکسیداسیون کبدی مشخص می‌شود ($P < ۰/۰۰۱$). در عین حال، این عصاره توانست وزن نسبی کبد را که در اثر مسمومیت با این سم کبدی افزایش یافته بود، بهبود ببخشد ($P < ۰/۰۰۱$). **نتیجه‌گیری:** به عنوان نتیجه‌گیری می‌توان گفت که بخشی از اثر محافظت‌کنندگی عصاره آبی گلنار در برابر آسیب کبدی ناشی از تتراکلرایدکربن، می‌تواند بواسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره باشد.

مخففها: APG، عصاره آبی گلنار؛ CCl_4، تترا کلرید کربن؛ ALT، آلانین آمینوترانسفراز؛ AST، آسپارتات آمینوترانسفراز؛ ALP، آلکالین فسفاتاز؛ GGT، گاما گلوتامیل ترانسفراز؛ GSH، گلوتاتیون احیاء

* نویسنده مسؤول: eskandarimr@zums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۶ تیر ۱۳۹۸؛ **تاریخ دریافت اصلاحات:** ۱۳ آبان ۱۳۹۸؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۸ دی ۱۳۹۸

doi: 10.29252/jmp.19.75.188
© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]

۱. مقدمه

کبد یکی از اندام‌های حیاتی بدن انسان می‌باشد که مهم‌ترین مرکز متابولیسم در بدن بوده و عمل سم‌زدایی ترکیبات خارجی، داروها و سموم را به عهده دارد. همچنین مواد مختلفی که از طریق دستگاه گوارش جذب بدن می‌شوند، در وهله نخست وارد کبد شده و متابولیسم عبور اول کبدی بر روی آنها انجام می‌گیرد. در اکثر موارد، طی عمل سم‌زدایی، فعال‌سازی متابولیکی توسط آنزیم‌های سیتوکروم P450 میکروزوم‌های کبدی باعث ایجاد متابولیت های ثانویه سمی و فعال می‌شود که این مواد می‌توانند موجب آسیب بافت‌های مختلف مخصوصاً کبد شوند [۱]. به همین دلیل کبد همواره در معرض تماس بالا با سموم و متابولیت‌های سمی آنها بوده و احتمال آسیب کبدی بسیار بالا می‌باشد. تتراکلریدکربن از جمله مواد شیمیایی است که بعد از ورود به بدن توسط آنزیم‌های سیستم سم‌زدایی سیتوکروم P450متابولیزه می‌شود. متابولیسم تتراکلریدکربن از طریق آنزیم‌های متابولیزه کننده داروها در رتیکولوم اندوپلاسمیک، باعث تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود [۳، ۲]. در طی متابولیسم تتراکلرید کربن دو ترکیب سمی شامل تری کلرومتیل و پراکسی تری کلرومتیل تولید می‌شوند که موجب صدمات حاد کبدی از جمله سیروز و نکروز می‌شوند [۴]. رادیکال‌های آزاد حاصل از تتراکلریدکربن، با تخریب غشاء هپاتوسیت‌ها، سبب افزایش فعالیت ترانس‌آمینازهای ALT و AST و همچنین افزایش غلظت بیلی‌روبین و سایر فاکتورهای سمیت کبدی می‌شوند که میزان این تغییرات، شدت آسیب‌های کبدی را نشان می‌دهد [۵]. بنابراین مدل تجربی آسیب کبدی که توسط تتراکلریدکربن القاء می‌شود، به صورت گسترده‌ای برای ارزیابی خاصیت محافظت‌کنندگی کبدی داروهای مختلف شیمیایی و گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

امروزه گرایش به مصرف داروهای گیاهی و استفاده از این داروها در پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف در سطح جهان و بخصوص ایران به طور چشمگیری افزایش یافته است [۶]. انار یکی از این گیاهان داروئی می‌باشد که به علت اثرات مفید آن در درمان انواع بیماری‌ها، تاریخچه‌ای طولانی در طب سنتی ایران دارد. انار از تیره Punicaceae و جنس Punica تنها جنس این خانواده است. از اختصاصات این گروه از گیاهان این است که برگ‌هایی ساده، به سه فرم متقابل، منفرد و گل‌های نر- ماده دارند. کاسه گل آنها شامل ۱ تا ۸ قطعه کاسبرگ چرمی و پیوسته به تخمدان است. جام گل آنها قرمز یا صورتی و مرکب از قطعات درشتی است که در آغاز حالت چین خورده دارند، ولی پس از شکفتن کامل، صاف می‌شوند. تعداد پرچم‌های آنها زیاد و میوه آنها نیز نوعی سته مخصوص، دارای پوست چرمی و محتوی دانه‌های سخت و محصور در یک بخش آبدار است. انار امروزه به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌اش در پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف از جمله: بیماری‌های التهابی و سرطان دارای اهمیت بسزایی می‌باشد [۸، ۷]. یافته‌ها نشان می‌دهند بخش‌های مختلف این گیاه از جمله میوه انار حاوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی فوق‌العاده‌ای می‌باشد [۱۱- ۹]. فلاونوئیدهای موجود در این گیاه توانایی پیشگیری از اکسیداسیون لیپوپروتیین‌ها با دانسیته پایین را دارند از این رو دارای خاصیت آنتی‌آرتروزنیک و ضدپرفشاری خون می‌باشد [۱۲].

گیاه *Punica granatum* واریته *pleniflora* که به نام گلنار شناخته می‌شود، گونه خاصی از انار می‌باشد که در ایران فقط در شهرستان داراب استان فارس و برخی از نقاط استان اصفهان به عمل می‌آید. این گونه خاص انار، درختچه‌ای است که گل‌های آن تبدیل به میوه نمی‌شوند و از این حیث با انار متفاوت می‌باشد. گل‌های این درختچه به نام گلنار مشهور می‌باشند که در طب سنتی و در حال حاضر نیز توسط عوام

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]

به عنوان ترمیم‌کننده جوش‌های صورت و پیشگیری از چین و چروک پوست مورد مصرف قرار می‌گیرد. مطالعات علمی بسیار محدودی بر روی خواص فارماکولوژیک گلنار انجام گرفته و ترکیبات فعال موجود در آن، مورد بررسی و مطالعه دقیق قرار نگرفته است. ولی مشخص شده که گل‌های میوه انار معمولی (گلنار) دربردارند ترکیبات گوناگونی می‌باشند شامل: آپیژنین، کاتشین، تریسین، روتین، پومگراناتات، اسید گالیک، اسید الاژیک، اسید اورولیک، اسید مازلینیک و دائوکوسترول [۱۴، ۱۳].

محتوای تام پلی‌فنلی و فلاونوئیدی فراکسیون‌های مختلف گل‌های گلنار اندازه‌گیری شده و خواص ضدمیکروبی آنها به اثبات رسیده است [۱۵]. همچنین در طی یک مطالعه بالینی که در بیماران دیابتی انجام گرفت، دهانشویه سنتی گلنار توانست ژنژویت را در این بیماران درمان کند [۱۶]. در عین حال، عصاره آبی و الکلی این گیاه به طور موفقیت‌آمیزی در درمان استئوماتیت آفتی عود کننده (RAS) مورد استفاده قرار گرفت [۱۷]. با توجه به وجود پلی‌فنلی‌ها و فلاونوئیدی‌ها در گلنار و همچنین اثرات آنتی‌اکسیدانی بخش‌های مختلف گیاه انار، انتظار داریم گلنار نیز دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی بوده و به همین دلیل این گیاه می‌تواند اثرات محافظت‌کنندگی کبدی قوی داشته باشد. ولی با این حال، تاکنون هیچ‌گونه تحقیقی در مورد اثرات محافظت‌کنندگی کبدی گلنار و اثرات آنتی‌اکسیدانی گلنار انجام نگرفته است. بنابراین در مطالعه کنونی، اثرات محافظت‌کنندگی کبدی عصاره آبی گل‌های گلنار در موش‌های صحرایی نر که توسط تتراکلریدکربن دچار سمیت کبدی شده بودند، مورد ارزیابی قرار گرفت. علاوه بر این، اثرات آنتی‌اکسیدانی برون‌تن (*in vitro*) و درون‌تن (*in vivo*) این عصاره نیز سنجیده شد. در عین حال، در تحقیق فعلی از ترکیب گیاهی سیلی‌مارین (silymarin) به عنوان ترکیب استاندارد گیاهی که دارای خاصیت حفاظت کنندگی بالای کبدی می‌باشد، استفاده شد. خار مریم (*Silybum marianum*) یک گیاه دارویی خوراکی است که از دیرباز در درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. سیلی‌مارین به عنوان گرادیانت فعال این گیاه، ترکیبی از مولکول‌های مختلف پلی‌فنلی بوده و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی می‌باشد. این ترکیب در پیشگیری و درمان اختلالات مختلف کبدی مورد استفاده گسترده‌ای داشته و توسط سازمان WHO به عنوان یک درمان مناسب برای درمان بیماری‌های کبدی درنظر گرفته شده است [۱۸].

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. روش انجام آزمایش‌های برون‌تن (in vitro)

۱.۱.۲. عصاره‌گیری

گیاه گلنار از مزارع منطقه داراب تهیه و با شماره‌ی هرباریومی ۸۰۱۶ در دانشکده‌ی داروسازی شهید بهشتی به ثبت رسید. برای تهیه عصاره آبی گل‌های گلنار از روش خیساندن (maceration) استفاده شد [۱۹]. بدین‌شکل که ۱۰۰ گرم از گلنار را پودر می‌کنیم و حدود یک لیتر آب به آن اضافه می‌کنیم. سپس آن را روی بن‌ماری ۶۰ درجه سانتی گراد می‌گذاریم تا به صورت غیرمستقیم حرارت داده شده و آب موجود در آن به صورت آرام و تدریجی طی ۴ تا ۵ روز تبخیر شود. عصاره به دست آمده به صورت محلول بسیار غلیظ و عسلی شکل تغلیظ خواهد شد. با این روش ۱۰ گرم عصاره به دست آمد.

۲.۱.۲. اندازه‌گیری میزان محتوای پلی‌فنلی

محتوای پلی‌فنل‌ها با متد رنگ سنجی فولین سیوکالتو اندازه‌گیری می‌شود [۲۰]. ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت از عصاره را با ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو ۵۰ درصد و ۱۶/۳ میکرولیتر آب به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس ۶۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد به آنها اضافه شد. بعد از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق،

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]

جذب در nm ۷۶۵ اندازه‌گیری و در مقایسه با منحنی استاندارد گالیک اسید، مقدار پلی‌فنول به صورت معادل گرمی گالیک اسید در گرم پودر خشک در مرحله انتهایی عصاره گیری بیان می‌شود. منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر گالیک اسید رسم شدند. مقدار محتوای فنلی تام عصاره به صورت میلی گرم اکی واالان گالیک اسید در گرم عصاره بیان می‌شود که از منحنی استاندارد به دست آوردیم.

۲.۱.۳. *اندازه‌گیری میزان محتوای فلاونوئیدی*

میزان فلاونوئید با روش رنگ‌سنجی آلومنیوم کلراید سنجش شد [۲۱]. µl ۵۰۰ عصاره همراه با µl ۱۵۰ سدیم نیتریت، به مدت ۵ دقیقه انکوبه و سپس به آن µl ۱۵۰ آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد اضافه کرده و ۶ دقیقه انکوبه شد. سپس به آن سود ۱ مولار اضافه و بعد از مخلوط نمودن کامل، جذب در مقابل بلانک در طول موج nm ۵۱۰ خوانده می شود. میزان کل فلاونوئید در عصاره به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین بیان می‌شود. منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر کوئرستین رسم شد. درنهایت مقدار تام فلاونوئید عصاره به صورت میلی‌گرم اکی والان کوئرستین در گرم عصاره بیان می‌شود که از منحنی استاندارد به دست آمد.

۲.۱.۴. *اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH*

جهت تهیه‌ی محلول استاندارد ۲و۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، ۰/۰۰۴۰ گرم از پودر DPPH را توسط ترازوی آنالیتیکال وزن کرده و سپس DPPH وزن شده در بالن ژوژه‌ی ۱۰۰ سی‌سی به حجم می‌رسد (غلظت برابر است با ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر). لازم به ذکر است محلول تهیه شده از DPPH همواره در طول کار در محیط تاریک و در یخچال نگهداری می‌شود. برای آزمون DPPH به ۱ سی‌سی از هر یک از رقت‌های تهیه شده از محلول‌های عصاره و ماده ی آنتی‌اکسیدان استاندارد (BHT)، ۳ سی‌سی محلول DPPH اضافه شد. سپس جذب محلول‌های حاصل همراه با محلول کنترل و بلانک پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-vis در طول موج nm ۵۱۷ اندازه‌گیری شد. در هر مورد درصد مهار رادیکال آزاد DPPH از طریق فرمول مربوطه محاسبه شد. جهت اندازه‌گیری میزان جذب هر یک از نمونه ها، بلانک و کنترل ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر توسط حلال مربوطه کالیبره شد و تمامی آزمایش‌ها برای هر یک از رقت ها حداقل ۳ بار انجام شد [۲۲].

۲.۲. *روش انجام آزمایش‌های درون‌تن (in vivo)*

در این تحقیق از ۴۲ سر موش‌های صحرایی Sprague–Dawley نر که در محدوده وزنی ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم بودند، استفاده شد. موش‌های صحرایی در شرایط استاندارد و در حیوان‌خانه دانشکده داروسازی زنجان نگهداری شدند (کد اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زنجان: ZUMS.REC.۱۳۹۴.۲۵). تمام آزمایش‌ها بر اساس توصیه‌های کمیته اخلاق بر روی حیوانات در دانشکده داروسازی زنجان انجام شد. حیوانات در یک اتاق با سیکل ۱۲ ساعته روشنایی–تاریکی نگهداری شدند. در این تحقیق، از عصاره آبی گلنار با دوزهای ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز و به صورت خوراکی استفاده شد. زیرا در مورد گلنار تاکنون مطالعه حیوانی انجام نگرفته، به همین دلیل از تحقیقات حیوانی قبلی که در مورد عصاره میوه انار انجام گرفته بود، به دلیل شباهت و قرابت در پروفایل ترکیبات، الگوبرداری و حداکثر دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه انتخاب شد [۲۳]. در عین حال، برای اطمینان از عدم وجود سمیت این دوز در موش‌های صحرایی، یک گروه آزمایشی

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]

هم در نظر گرفته شده که حیوانات نرمال، عصاره با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه را به صورت خوراکی دریافت کردند.

۲,۱,۲. القای مدل سمیت کبدی توسط تتراکلریدکربن

در این آزمایش جهت القای مدل سمیت کبدی توسط تتراکلریدکربن [۲۴]، ابتدا موش‌های صحرایی را به صورت تصادفی در ۷ گروه ۶ تایی تقسیم و گروه‌بندی به شکل زیر انجام گرفت:

گروه ۱- در این گروه حیوانات نرمال، روزانه به مدت ۵ روز، آب مقطر به میزان ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به صورت خوراکی و همچنین ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم پارافین مایع به صورت زیر جلدی در روزهای دوم و سوم دریافت کردند.

گروه ۲- در این گروه حیوانات نرمال، با هدف بررسی عدم سمیت عصاره، روزانه به مدت ۵ روز، عصاره با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی و همچنین ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم پارافین مایع به صورت زیر جلدی در روزهای دوم و سوم دریافت کرده‌اند.

گروه ۳- در این گروه با هدف القا مدل سمیت کبدی در حیوانات، تجویز ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم تتراکلریدکربن به صورت خوراکی روزانه به مدت ۵ روز و تزریق ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم تتراکلریدکربن به صورت زیرجلدی در روزهای دوم و سوم انجام گرفت.

گروه ۴- در این گروه حیوانات علاوه بر دریافت تتراکلریدکربن به میزان ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم، پنجاه میلی گرم بر کیلوگرم سیلی‌مارین به عنوان ترکیب استاندارد گیاهی که دارای خاصیت حفاظت‌کنندگی بالای کبدی می‌باشد [۲۵] ، به صورت خوراکی و به مدت ۵ روز و تزریق ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم تتراکلریدکربن به صورت زیرجلدی در روزهای دوم و سوم انجام گرفت.

گروه ۵، ۶ و ۷- سمیت در این گروه‌ها همانند گروه دوم القا شده و علاوه بر سم، عصاره آبی گلنار با دوزهای ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی به مدت ۵ روز و تزریق ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم تتراکلریدکربن به صورت زیرجلدی در روزهای دوم و سوم انجام گرفت. مدت انجام آزمایش ۵ روز بوده و در روز ششم از سینوس پشت کره چشم تمامی موش‌ها خون‌گیری شد و سرم به دست آمده جهت انجام بررسی فاکتورهای خونی، تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۳.۲. روش‌های اندازه‌گیری فاکتورهای خونی

۳,۱,۲. اندازه‌گیری میزان فعالیت آمینوترانسفرازها ALT، AST، ALP، GGT و پروتئین تام

روش اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم‌ها به روش فتومتریک مشخص شده در IFCC (فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی) و با استفاده از کیت‌های استاندارد تشخیصی ALT، AST، ALP و GGT شرکت ایرانی پارس آزمون و طبق پروتکلی که در بروشور کیت نوشته شده بود، با دستگاه اتو آنالایزر Mindray BS-200 ساخت کشور آمریکا انجام شد [۲۶].

۳,۲,۲. اندازه‌گیری میزان بیلی‌روبین تام

میزان بیلی‌روبین غیرکونژوگه را می‌توان از تفاوت میزان بیلی روبین توتال و مستقیم تعیین نمود. روش آزمایش به صورت modified Evelyn-Malloy می‌باشد. در این آزمایش اسید سولفونیک با سدیم نیتریت واکنش می‌دهد و دیازوتایزد سولفونیک اسید تشکیل می‌شود. در حضور سیتریماید بیلی‌روبین کونژوگه و غیرکونژوگه با دیازوتایزد سولفونیک اسید برای تشکیل آزوبیلی روبین واکنش می‌دهند [۲۷].

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]

۳.۳.۲. اندازه‌گیری پارامترهای استرس اکسیداتیو

در این مطالعه جهت اندازه گیری میزان دو شاخص مهم مرتبط با استرس اکسیداتیو یعنی گلوتاتیون و لیپید پراکسیداسیون، موش‌های صحرایی را بیهوش کرده و پس از باز کردن حفره‌ی شکمی، کبد حیوان سریعاً خارج شده و در بافر مانیتول شست و شو داده شد. سپس بوسیله‌ی قیچی بخش‌هایی از بافت کبدی را تکه تکه کرده و تا روز انجام آزمایش‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

۴.۳.۲. اندازه‌گیری پروتئین بافت کبدی

میزان پروتئین کبدی که برای یکنواخت کردن نتایج فاکتورهای کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرد، توسط روش برادفورد و با استفاده از دستگاه میکرو پلیت ریدر Infinite M 200 شرکت TECAN ساخت کشور سوئیس اندازه‌گیری شد [۲۰].

۵.۳.۲. اندازه‌گیری میزان گلوتاتیون احیاء (GSH) در بافت کبد

برای اندازه‌گیری میزان گلوتاتیون احیا از معرف DTNB استفاده شد. در این تحقیق ابتدا ۲ میلی‌لیتر محلول هموژن شده‌ی کبد با ۰/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۵ درصد وزنی—حجمی و با ۲ میلی‌لیتر متانول مخلوط شد. نمونه‌ی حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در ادامه به ۱/۶ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۴۰۰ میکرولیتر DTNB ۰/۱ مولار، ۱/۶ میلی‌لیتر محلول Tris ،EDTA و ۳ میلی‌لیتر متانول اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از هم زدن، جذب نمونه در طول موج ۴۱۲ نانومتر، توسط دستگاه میکرو پلیت ریدر Infinite M 200 شرکت TECAN ساخت کشور سوئیس اندازه‌گیری شد. غلظت گلوتاتیون بر حسب میکروگرم در هر میلی‌گرم پروتئین بافت کبد محاسبه شد [۲۸].

۶.۳.۲. اندازه گیری میزان لیپید پراکسیداسیون در بافت کبد

جهت اندازه‌گیری میزان لیپید پراکسیداسیون میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) بافت کبد به عنوان مارکر لیپید پراکسیداسیون اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، در این روش به ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون بافت کبد، ۱/۵ میلی‌لیتر سدیم دودسیل، ۱/۱ میلی‌لیتر استیک اسید ۱۰ درصد، ۱/۵ میلی‌لیتر TBA (حل شده در سدیم هیدروکساید ۰/۱ مولار) اضافه شد. سپس این مخلوط به مدت یک ساعت در حمام آب با دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بلافاصله نمونه به مدت ۵ دقیقه در معرض سرما قرار گرفت. درنهایت به نمونه ۱/۵ میلی‌لیتر n- بوتانول اضافه شد. نمونه‌ی نهایی به شدت هم زده شد. نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شد. درنهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر توسط توسط دستگاه میکرو پلیت ریدر Infinite M 200 شرکت TECAN ساخت کشور سوئیس محاسبه و بر اساس میکروگرم در هر میلی‌گرم پروتئین بافت کبد بیان شد [۲۹].

۷.۳.۲. نسبت اندازه وزن کبد به وزن موش صحرایی

یک بار، در روز اول کار با موش‌ها و یک بار در روز آخر، قبل از بیهوش کردن، موش‌ها وزن شدند. در روز آخر، پس از خارج کردن کبد از بدن موش‌ها، کبدها وزن شده و نسبت وزن کبد به وزن موش‌ها به دست آمد.

۴.۲. آنالیز آماری

نتایج برحسب انحراف معیار ± میانگین (Mean ± SD) گزارش شده‌اند. همه‌ی آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS مدل ۱۷ انجام شد. آزمون‌های آماری مورد استفاده

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]

شامل آزمون one-day ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey بودند. حد معناداری به صورت $P < ۰/۰۵$ تعریف شده است.

۳. نتایج

۱.۳. محتوای پلی‌فنولی تام و فلاونوئیدی تام

بر اساس جذب‌های به دست آمده از غلظت‌های مختلف گالیک اسید، نمودار کالیبراسیون گالیک اسید رسم و محتوای پلی‌فنولی تام عصاره محاسبه شد که برابر بود با: ۶/۱۶ ± ۸۳/۶۳ (میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره). محتوای فلاونوئیدی تام نیز بر اساس جذب‌های به دست آمده از غلظت‌های مختلف کوئرستین و رسم نمودار کالیبراسیون کوئرستین به دست آمد که برابر بود با: ۰/۹۸ ± ۲۷/۰۱ (میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره). نتایج فوق به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده است.

۲.۳. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره براساس IC_{50} به دست آمده از آزمایش DPPH به دست آمد که برابر بود با: ۲/۹۸ ± ۱۰۳/۴۲ ماکروگرم در میلی‌لیتر که به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده است.

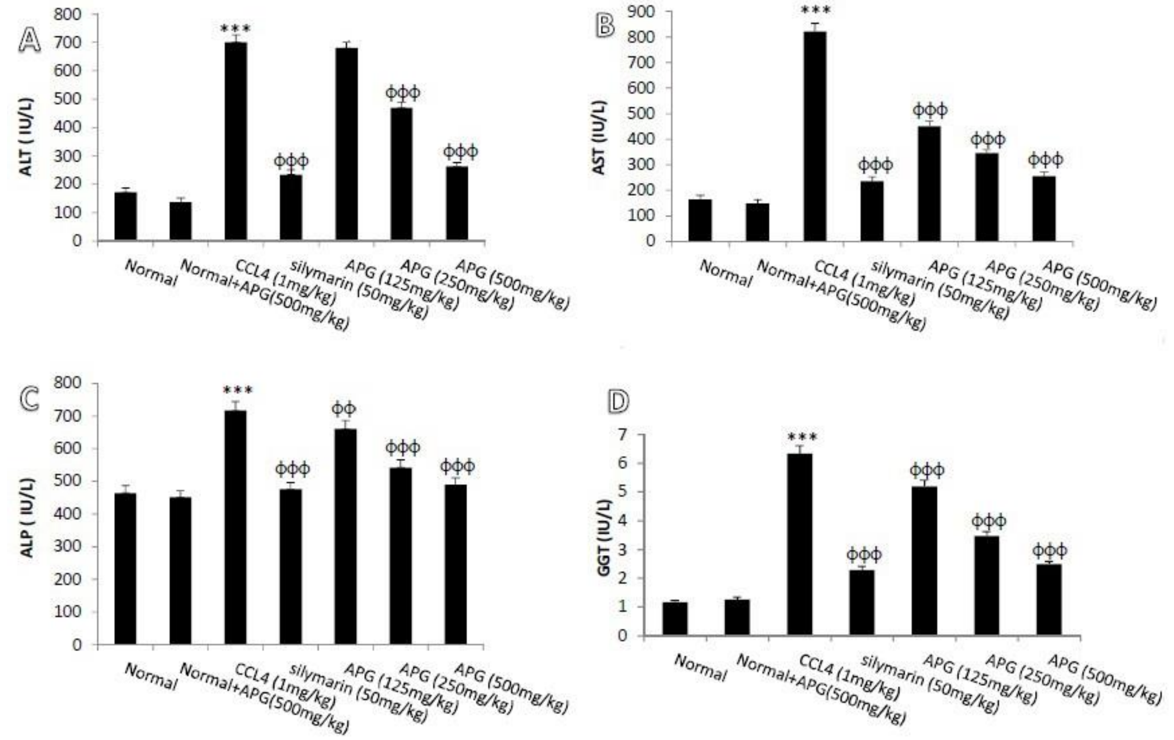
۳.۳. میزان سرمی AST، ALT، ALP و GGT

با توجه به آنالیز داده‌های حاصل از شکل ۱، در گروه نرمال دریافت‌کننده عصاره با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، نسبت به گروه نرمال اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. درنتیجه دوز بالای این عصاره فاقد اثرات سمی است. در گروه سمی نسبت به گروه نرمال، افزایش معنی‌دار مقادیر ALT، AST، ALP و GGT مشاهده شد. گروه دریافت کننده سیلی‌مارین در مقایسه با گروه سمی، توانست به خوبی مقادیر فاکتورهای سمیت کبدی را به طرز معناداری کاهش دهد. در عین حال، گروه‌های سمی دریافت‌کننده‌ی عصاره نسبت به گروه سمی توانستند به خوبی این مقادیر را به طرز معنی‌داری کاهش دهند. در مورد تمامی فاکتورهای سمیت، گروه سمی دریافت‌کننده عصاره با دوز۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، با گروه دریافت‌کننده سیلی‌مارین اختلاف معنی داری نداشت. بنابراین گروه سمی دریافت‌کننده عصاره با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثر مشابه گروه دریافت‌کننده سیلی مارین دارد. با توجه به این نتایج بهترین نتیجه را در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده نمودیم.

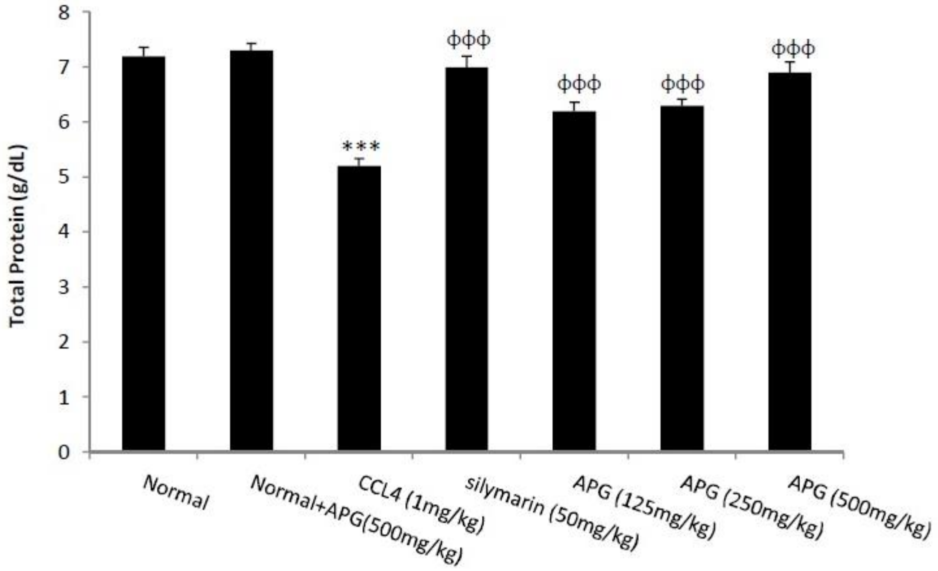
۴.۳. میزان سرمی پروتئین تام

با توجه به آنالیز داده‌های حاصل از شکل ۲، در گروه نرمال دریافت‌کننده عصاره با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، نسبت به گروه نرمال اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در نتیجه دوز بالای این عصاره فاقد اثرات سمی است. در گروه سمی نسبت به گروه نرمال، کاهش معنی‌دار مقدار پروتئین تام مشاهده شد. گروه دریافت‌کننده سیلی‌مارین در مقایسه با گروه سمی، توانست به خوبی مقدار پروتئین تام را به طرز معنی‌داری افزایش دهد. گروه‌های سمی دریافت‌کننده‌ی عصاره نسبت به گروه سمی توانستند به خوبی مقدار پروتئین تام را به طرز معنی‌داری افزایش دهند. در گروه‌های سمی دریافت‌کننده عصاره با افزایش دوز، مقدار پروتئین تام نیز افزایش پیدا کرد. گروه سمی دریافت‌کننده عصاره با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، با گروه دریافت‌کننده سیلی‌مارین اختلاف معنی‌داری نداشت. بنابراین گروه سمی دریافت‌کننده عصاره با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثر مشابه گروه دریافت‌کننده سیلی‌مارین دارد. با توجه به این نتایج بهترین نتیجه را در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده نمودیم.

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]



شکل ۱. میزان تغییرات ALT، AST، ALP و GGT در گروه‌های مختلف. *** نشانگر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه نرمال (P < ۰/۰۰۱)، ϕϕ نشانگر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه سمی (P < ۰/۰۱) و ϕϕϕ نشانگر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه سمی (P < ۰/۰۰۱) می‌باشند. نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده است. عصاره آبی گلنار (APG)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، گاما گلوتامیل ترانسفراز (GGT).



شکل ۲. میزان تغییرات پروتئین تام در گروه‌های مختلف. *** نشانگر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه نرمال (P < ۰/۰۰۱) و ϕϕϕ نشانگر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه سمی (P < ۰/۰۰۱) می‌باشند. نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده است. عصاره آبی گلنار (APG).

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]

۵.۳. سطح سرمی بیلی روبین تام

با توجه به آنالیز داده‌های حاصل از شکل ۳، در گروه نرمال دریافت‌کننده عصاره با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، نسبت به گروه نرمال اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. درنتیجه دوز بالای این عصاره فاقد اثرات سمی است. در گروه سمی نسبت به گروه نرمال، افزایش معنی‌دار مقدار بیلی روبین تام مشاهده شد. گروه دریافت‌کننده سیلی‌مارین در مقایسه با گروه سمی، توانست به خوبی مقدار بیلی‌روبین تام را به طرز معنی‌داری کاهش دهد. گروه‌های سمی دریافت کننده‌ی عصاره نسبت به گروه سمی توانستند به خوبی مقدار بیلی‌روبین تام را به طرز معنی‌داری کاهش دهند. در گروه های سمی دریافت‌کننده عصاره با افزایش دوز، مقدار بیلی روبین تام نیز کاهش پیدا کرد. همه گروه‌های سمی دریافت کننده عصاره، با گروه دریافت‌کننده سیلی‌مارین اختلاف معنی داری داشتند. این به این معنی است که عصاره در این سه دوز ضعیف تر از سیلی‌مارین اثر کرده است.

۶.۳. میزان گلوتاتیون احیاء در بافت کبد

با توجه به آنالیز داده‌های حاصل از شکل ۴، در گروه نرمال دریافت‌کننده عصاره با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، نسبت به گروه نرمال افزایش معنی‌دار مقدار گلوتاتیون احیا مشاهده شد که می‌تواند بواسطه اثر آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره باشد. در گروه سمی نسبت به گروه نرمال، کاهش معنی‌دار مقدار گلوتاتیون احیا مشاهده شد. گروه دریافت کننده سیلی‌مارین در مقایسه با گروه سمی، توانست به خوبی مقدار گلوتاتیون احیا را به طرز معنی‌داری افزایش دهد. گروه های سمی دریافت‌کننده‌ی عصاره نسبت به گروه سمی توانستند به خوبی مقدار گلوتاتیون احیا را به طرز معناداری افزایش دهند. در گروه‌های سمی دریافت‌کننده عصاره با افزایش دوز، مقدار گلوتاتیون احیا نیز افزایش پیدا کرد. گروه سمی دریافت‌کننده عصاره با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، با گروه دریافت‌کننده سیلی‌مارین اختلاف معنی‌داری نداشت. بنابراین گروه سمی دریافت‌کننده عصاره با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثر مشابه گروه دریافت‌کننده سیلی‌مارین دارد.

۷.۳. میزان لیپید پراکسیداسیون در بافت کبد

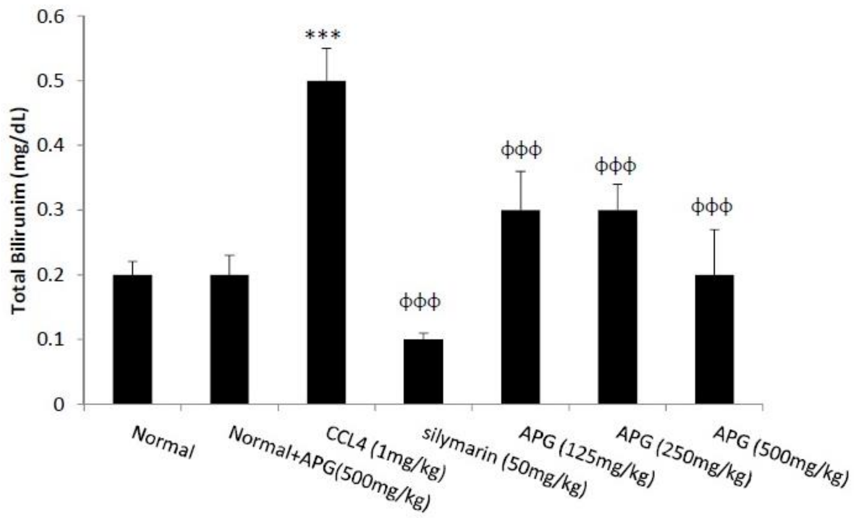
با توجه به آنالیز داده‌های حاصل از شکل ۵، در گروه نرمال دریافت‌کننده عصاره با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، نسبت به گروه نرمال اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. درنتیجه دوز بالای این عصاره فاقد اثرات سمی است. در گروه سمی نسبت به گروه نرمال، افزایش معنی‌دار مقدار لیپید پراکسیداسیون مشاهده شد. گروه دریافت‌کننده سیلی‌مارین در مقایسه با گروه سمی، توانست به خوبی مقدار لیپید پراکسیداسیون را به طرز معنی‌داری کاهش دهد. گروه‌های سمی دریافت‌کننده‌ی عصاره نسبت به گروه سمی توانستند به خوبی مقدار لیپید پراکسیداسیون را به طرز معنی‌داری کاهش دهند. در گروه‌های سمی دریافت‌کننده عصاره با افزایش دوز، مقدار لیپید پراکسیداسیون نیز کاهش پیدا کرد. گروه سمی دریافت‌کننده عصاره با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، با گروه دریافت‌کننده سیلی‌مارین اختلاف معنی داری نداشت. بنابراین گروه سمی دریافت‌کننده عصاره با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثر مشابه گروه دریافت‌کننده سیلی مارین دارد.

۸.۳. نسبت وزن کبد به وزن موش صحرایی

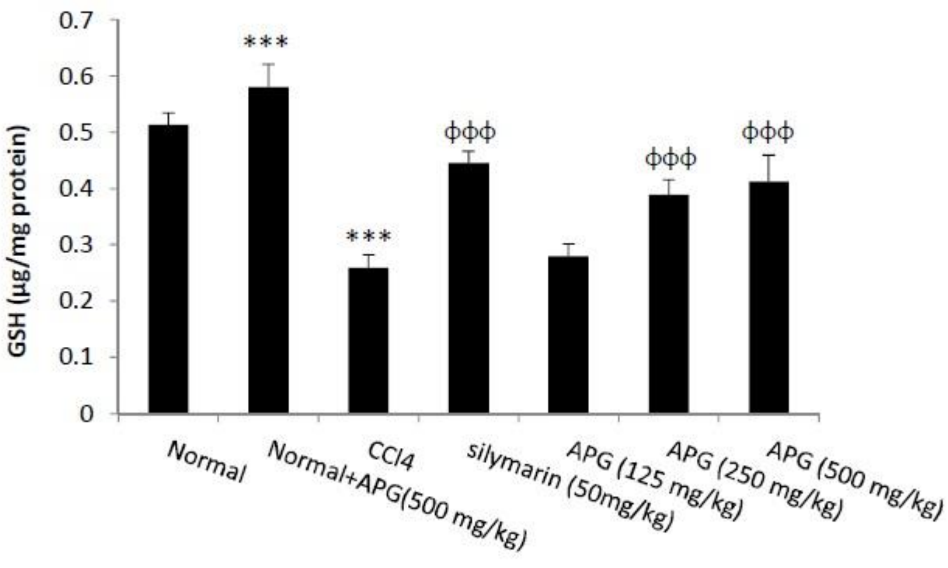
با توجه به آنالیز داده‌های حاصل از شکل ۶، در گروه نرمال دریافت‌کننده عصاره با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، نسبت به گروه نرمال اختلاف معناداری مشاهده نشد. در گروه سمی نسبت به گروه نرمال، نسبت وزن کبد به وزن موش به طور معنی‌داری افزایش یافت. گروه دریافت‌کننده سیلی‌مارین در مقایسه با گروه سمی، توانست به خوبی نسبت وزن کبد به وزن موش را به طور معنی‌داری کاهش دهد. گروه‌های

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]

سمی دریافت‌کننده‌ی عصاره نسبت به گروه سمی توانستند به خوبی نسبت وزن کبد به وزن موش را به طور معنی‌داری کاهش دهند. در گروه‌های سمی دریافت‌کننده عصاره با افزایش دوز، نسبت وزن کبد به وزن موش کاهش پیدا کرد. گروه سمی دریافت‌کننده عصاره با دوز ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، با گروه دریافت‌کننده سیلی‌مارین اختلاف معنی داری نداشت. بنابراین دو گروه سمی دریافت‌کننده عصاره با دوز ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانسته‌اند اثر مشابه گروه دریافت‌کننده سیلی‌مارین داشته باشند.

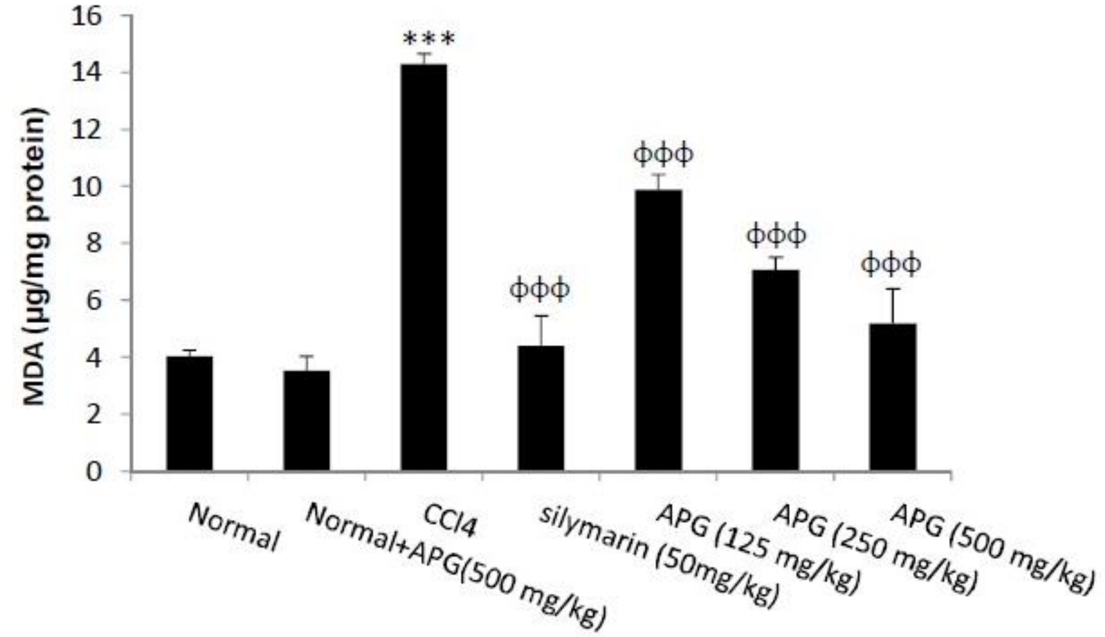


شکل ۳. میزان تغییرات بیلی‌روبین تام سرمی در گروه‌های مختلف. *** نشانگر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه نرمال (P < ۰/۰۰۱) و ϕϕϕ نشانگر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه سمی (P < ۰/۰۰۱) می‌باشند. نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده است. عصاره آبی گلنار (APG).

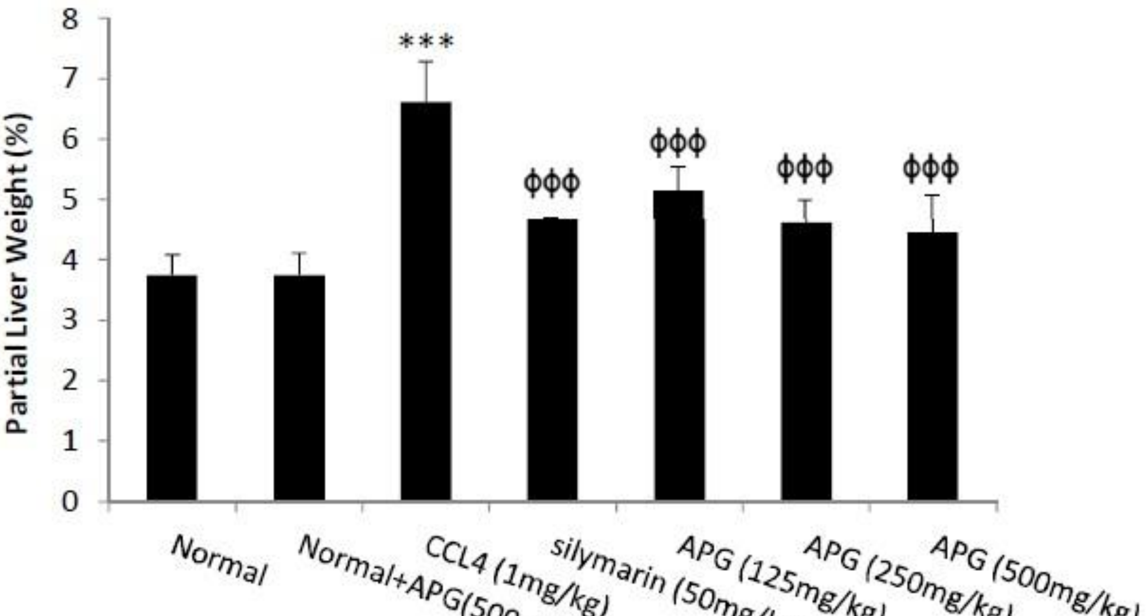


شکل ۴. میزان تغییرات گلوتاتیون احیاء در گروه‌های مختلف. *** نشانگر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه نرمال (P < ۰/۰۰۱) و ϕϕϕ نشانگر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه سمی (P < ۰/۰۰۱) می‌باشند. نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده است. عصاره آبی گلنار (APG) و گلوتاتیون احیاء (GSH).

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]



شکل ۵. میزان تغییرات لیپید پراکسیداسیون در گروه‌های مختلف. مالون دی‌آلدئید (MDA) به عنوان مارکر لیپید پراکسیداسیون نمایش داده شده است. *** نشانگر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه نرمال (P < ۰/۰۰۱)، و ϕϕϕ نشانگر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه سمی (P <۰/۰۰۱) می‌باشند. نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده است. عصاره آبی گلنار (APG).



شکل ۶. وزن نسبی کبد به وزن موش (درصد). *** نشانگر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه نرمال (P < ۰/۰۰۱) و ϕϕϕ نشانگر تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه سمی (P < ۰/۰۰۱) می‌باشند. نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده است. عصاره آبی گلنار (APG).

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]

۴. بحث

یکی از وظایف مهم کبد، متابولیسم و دفع مواد خارجی است که وارد بدن می‌شوند. این فرآیند معمولاً منجر به تولید رادیکال‌های آزاد و متابولیت‌های فعال می‌شود که درنهایت می‌تواند به آسیب کبدی منجر شود. با عنایت به اینکه داروهای شیمیایی محدودی برای درمان بیماری‌های کبدی وجود دارد، ضرورت توجه به عوامل محافظت‌کننده کبدی که از عوامل طبیعی و گیاهی استخراج می‌شوند، امری ضروری به نظر می‌رسد. به همین دلیل، ارزیابی خواص محافظت‌کننده کبدی عصاره‌های گیاهی که قادر به محافظت و ترمیم کبد باشند، بسیار مهم و ارزشمند می‌باشد.

از زمان‌های دور داروهای گیاهی به علت داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی که به علت وجود فنل‌ها و پلی‌فنل ها، در درمان بیماری‌ها و نارحتی‌های مختلف کبدی به صورت گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند [۳۱، ۳۰]. به همین دلیل در مطالعه کنونی، اثرات محافظت‌کننده کبدی عصاره آبی گل‌های گلنار که یکی از گیاهان ارزشمند در طب سنتی ایران محسوب می‌شود، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به علت مطالعات محدودی که در مورد خواص آنتی‌اکسیدانی برون‌تن (*in vitro*) و درون‌تن (*in vivo*) این گیاه انجام شده، این فاکتورها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

در طی دهه‌های اخیر، مدل حیوانی موش صحرایی که با تتراکلریدکربن مسموم شده، به صورت گسترده‌ای برای بررسی مکانیسم‌های آسیب‌های کبدی حاد و مزمن مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳۲]. بر این اساس آسیب کبدی ناشی از تتراکلریدکربن به عنوان یک مدل قابل اعتماد و سیستم مطمئن برای ارزیابی محافظت کنندگی کبدی عوامل مختلف کاربرد فراوانی دارد. سم تتراکلریدکربن در کبد متابولیزه شده و رادیکال بسیار خطرناک‌تری کلرومتیل و برخی از متابولیت‌های فعال را تولید می‌کند. این رادیکال‌های آزاد درنهایت از طریق سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 اکسیژناز به رادیکال پراکسی‌تری کلرومتیل تبدیل می‌شوند که با بر هم زدن تعادل طبیعی رادیکال‌های آزاد و دفاع آنتی‌اکسیدان بدن منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب کبدی می‌شود. لیپیدپراکسیداسیون به عنوان یکی از عواقب استرس اکسیداتیو منجر به آسیب غشاء سلول‌های کبدی می‌شود. همزمان گلوتاتیون به عنوان مهم‌ترین دفاع آنتی‌اکسیدان بدن تخلیه شده و غلظت آن به شدت دچار کاهش می‌شود [۳۳].

نتایج به دست آمده از این مطالعه، در دو بخش برون‌تن و درون‌تن سنجیده شد. ابتدا محتوی پلی‌فنلی و محتوی فلاونوئیدی و اثرات آنتی‌اکسیدانی گل‌های گلنار سنجیده و مشخص شد که این گیاه دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار خوب و قابل قبولی می‌باشد. فاکتورهای خونی آسیب کبدی شامل فاکتورهای AST، ALT، GGT، ALP، بیلی‌روبین تام و پروتئین تام نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره‌ی آبی گلنار در تمامی فاکتورهای ذکر شده، سبب خاصیت محافظت‌کنندگی از کبد شد که بخشی از این اثرات احتمالاً به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی مواد موجود در عصاره آبی گلنار است. این خاصیت وابسته به دوز بوده و با افزایش دوز دریافتی عصاره نتایج بهتری مشاهده شد. در ادامه‌ی مطالعه، نسبت وزن کبد به وزن بدن موش صحرایی و نیز اثرات محافظت‌کنندگی کبدی عصاره بر فاکتورهای کبدی شامل گلوتاتیون احیاء و لیپیدپراکسیداسیون کبدی در سمیت ناشی از تتراکلرید کربن، اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده نشان دادند که این عصاره اثرات محافظت‌کنندگی خود را به صورت مستقیم در بافت کبد اعمال می‌نماید. همچنین عصاره در دوزهای مصرفی به تنهایی فاقد اثرات سمت کبدی بودند. مسأله جالب توجه دیگر این بود که در اکثر فاکتورهای بررسی شده، اثرات بالاترین دوز عصاره گلنار یعنی دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشابه گروه دریافت‌کننده سیلی‌مارین بود. این بدین‌معنی است که در اکثر فاکتورها، از لحاظ قدرت محافظت‌کنندگی

[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188] [DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1] [Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]

کبد، این دوز عصاره با داروی استاندارد محافظت‌کنندگی کبدی یعنی سیلی‌مارین دارای اثرات یکسانی می‌باشد. اثرات محافظت‌کنندگی کبدی گلنار می‌تواند توسط مکانیسم‌های مختلفی توجیه شود نظیر: اثرات آنتی‌اکسیدانی و القای مکانیسم‌های ترمیمی سلول‌های کبدی. همچنین می‌توان گفت که این گیاه احتمالاً سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 را که مسئول متابولیسم تتراکلریدکربن به رادیکال‌های آزاد می‌باشند، مهار کرده و یا رادیکال‌های آزادی را که مسئول آسیب سلول‌های کبدی می‌باشند، خنثی می‌کند.

مطالعات انجام گرفته در مورد اثرات محافظت‌کنندگی کبدی گل‌های انار معمولی نشان داد که عصاره الکلی گل‌های انار دارای آنتی‌اکسیدانی بالایی بوده و می‌تواند سمیت کبدی ناشی از فریک نیتریلو تری استات (Fe-NTA) را در موش‌های سوری کاهش دهد [۳۴]. در عین حال، عصاره متانولی گل‌های انار معمولی توانست سمیت کبدی ناشی از کادمیوم را در موش‌های صحرایی بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش دهد [۳۵]. ولی در مورد اثرات محافظت‌کنندگی کبدی گلنار تاکنون مطالعه‌ای انجام نگرفته و با توجه به اینکه این گیاه به صورت انحصاری در ایران وجود دارد، نتایج تحقیق کنونی می‌تواند زمینه‌ساز مطالعات بعدی در زمینه تولید و فرآوری این گیاه جهت استفاده در پیشگیری و درمان بیماری‌های کبدی باشد.

به عنوان نتیجه‌گیری می‌توان گفت که گلنار دارای موادی است که می‌تواند خاصیت محافظت‌کنندگی کبدی داشته و در پیشگیری و درمان سمیت‌های کبدی ناشی از داروها و مواد شیمیایی و همچنین در درمان بیماری‌های کبدی مؤثر باشد. همچنین پیشنهاد می‌شود که اثر حفاظت‌کنندگی کبدی عصاره در انسان‌ها مورد بررسی قرار گرفته و استفاده از فرآورده‌های این گیاه در رژیم غذایی افراد با ریسک بالا و مستعد بیماری‌های کبدی صورت پذیرد. همچنین مطالعات کینتیکی در جهت یافتن بهترین روش تجویز عصاره و فراکسینه کردن عصاره آبی گلنار به منظور شناسایی ترکیبات مؤثر این گیاه که دارای خاصیت محافظت‌کنندگی کبد هستند، انجام گیرد. درنهایت مطالعات بیشتر برای یافتن مکانیسم‌های سلولی و مولکولی این گیاه که مسئول اثرات محافظت‌کنندگی کبدی هستند، پیشنهاد می‌شود.

مشارکت نویسندگان

مشارکت نویسنده مسئول مقاله به عنوان مجری مطالعه شامل پایه‌ریزی تحقیق و نگارش محتوای مقاله، نویسنده اول، مسؤولیت جمع‌آوری داده‌های خام، نویسنده دوم، انجام عمده کارهای عملی، نویسنده سوم، تبیین مبانی نظری تحقیق و عصاره‌گیری، نویسنده چهارم، مشاوره در کارهای گیاهی، نویسنده پنجم، آنالیز آماری و نویسنده ششم، کمک در نگارش مقاله بود.

تضاد منافع

در این مطالعه تضاد منافع وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی زنجان (کد طرح: A-12-501-28) به انجام رسیده است.

منابع

1. Almazroo OA, Miah MK and Venkataramanan R. Drug Metabolism in the Liver. *Clin. Liver. Dis*. 2017; 21: 1-20.

2. Zhou Y, Peng C, Zhou Z and Huang K. Ketoconazole pretreatment ameliorates carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]

by suppressing inflammation and oxidative stress. *J. Toxicol. Sci.* 2019; 44: 405-14.

3. Chang WC, Hung CT, Chen YS, Hsueh CC, Hou CW and Lay HL. Amelioration of carbon tetrachloride-induced hepatic injury by emulsified Antrodia extract. *Iran. J. Basic. Med. Sci*. 2018; 21: 230-5.

4. Wahid A, Hamed AN, Eltahir HM and Abouzied MM. Hepatoprotective activity of ethanolic extract of Salix subserrata against CCl4-induced chronic hepatotoxicity in rats. *BMC. Complement. Altern. Med*. 2016; 16: 263.

5. Hozzein WN, Al-Khalaf AA, Mohany M, Al-Rejaie SS, Ali DMI and Amin AA. The potential protective effect of two actinomycete extracts against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2019; 26: 3834-47.

6. Heidari H, Kamalinejad M, Noubarani M, Rahmati M, Jafarian I, Adiban H and Eskandari MR. Protective mechanisms of Cucumis sativus in diabetes-related modelsof oxidative stress and carbonyl stress. *Bioimpacts* 2016; 6: 33-9.

7. Sharma P, McClees SF and Afaq F. Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update. *Molecules* 2017; 22: 177.

8. Danesi F and Ferguson LR. Could Pomegranate Juice Help in the Control of Inflammatory Diseases? *Nutrients* 2017; 9: 958.

9. Bar-Ya'akov I, Tian L, Amir R and Holland D. Primary Metabolites, Anthocyanins, and Hydrolyzable Tannins in the Pomegranate Fruit. *Front. Plant. Sci.* 2019; 10: 620.

10. Wu Y, Zhu CP, Zhang Y, Li Y and Sun JR. Immunomodulatory and antioxidant effects of pomegranate peel polysaccharides on immunosuppressed mice. *Int. J. Biol. Macromol*. 2019; 137: 504-11.

11. Jamshidzadeh A, Abbasian M, Rezaeian Mehrabadi A and Niknahad H. Hepatoprotective Effect of Pomegranate (Punica Granatum) Fruit Juice and Seed Extracts against CCL4-Induced Toxicity. *Iran. J. Pharma. Sci.* 2012; 8: 181-7.

12. Asgary S, Keshvari M, Sahebkar A and Sarrafzadegan N. Pomegranate Consumption and Blood Pressure: A Review. *Curr. Pharm. Des*. 2017; 23: 1042-50.

13. Wang R. Wang W, Wang L, Liu R, Ding Y and Du L. Constituents of the flowers of Punica granatum. *Fitoterapia* 2006; 77: 534-7.

14. Yang YX, Yan FL and Wang X. Chemical constituents from Punica granatum flowers. *J. Chinese. Medicinal. Materials* 2004; 37: 804-7.

15. Mahboubi A, Asgarpanah J, Sadaghiyani PN and Faizi M. Total phenolic and flavonoid content and antibacterial activity of *Punica granatum* L. var. pleniflora flowers (Golnar) against bacterial strains causing foodborne diseases. *BMC. Complement. Altern. Med*. 2015; 15: 366.

16. Sedigh-Rahimabadi M, Fani M, Rostami-Chijan M, Zarshenas MM and Shams M. A Traditional Mouthwash (*Punica granatum* var pleniflora) for Controlling Gingivitis of Diabetic Patients: A Double-Blind Randomized Controlled Clinical Trial. *J. Evid. Based. Complementary Altern. Med*. 2017; 22: 59-67.

17. Gavanji S, Larki B and Bakhtari A. The effect of extract of Punica granatum var. pleniflora for treatment of minor recurrent aphthous stomatitis. *Integr. Med. Res*. 2014; 3: 83-90.

18. Hellerbrand C, Schattenberg JM., Peterburs P, Lechner A and Brignol R. The potential of silymarin for the treatment of hepatic disorders. *Clinical. Phytoscience.* 2016; 2: 7.

19. Shirazi FH, Piri M, Keshavarz S, GholamiS, Hosseini SH, Noubarani M, Andalib S, Kamalinejad M, Adiban H and Eskandari MR.

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]

Olive fruit (*Olea europapaea* L.): Chemopreventive effect in the rat model of hepatocellular carcinoma. *PharmaNutrition* 2018; 6: 207-14.

20. Gholami S, Hosseini MJ, Jafari L, Omidvar F, Kamalinejad M, Mashayekhi V, Hosseini SH, Kardan A, Pourahmad J and Eskandari MR. Mitochondria as a Target for the Cardioprotective Effects of *Cydonia oblonga* Mill. and *Ficus carica* L. in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Drug. Res* (*Stuttg*). 2017; 67: 358-65.

21. Salimi A, Motallebi A, Ayatollahi M, SeydiE, Mohseni AR, Nazemi M and Pourahmad J. Selective toxicity of Persian Gulf seacucumber holothuria parva on humanchronic lymphocytic leukemia b lymphocytesby direct mitochondrial targeting. *Environ. Toxicol.* 2017; 32: 1158-69.

22. Tutunchi P, Roufegarinejad L, Hamishehkar H and Alizadeh A. Extraction of red beet extract with β-cyclodextrin-enhanced ultrasound assisted extraction: A strategy for enhancing the extraction efficacy of bioactive compounds and their stability in food models. *Food. Chem.* 2019; 297: 124994.

23. Mansouri E, Basgen J and Saremy S. The effects of pomegranate extract on normal adult rat kidney: A stereological study. *Vet. Res. Forum.* 2016; 7: 1-6.

24. Weber LW, Boll M and Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit. Rev. Toxicol.* 2003; 33: 105-36.

25. Jeong DH, Lee GP, Jeong WI, Do SH, Yang HJ, Yuan DW, Park HY, Kim KJ and Jeong KS. Alterations of mast cells and TGF-β1 on the silymarin treatment for CCl4-induced hepatic fibrosis. *World. J. Gastroenterol.* 2005; 11: 1141-8.

26. Mirmohammadlu M, Hosseini SH, Kamalinejad M, Esmaeili Gavgani M, Noubarani M and Eskandari MR. Hypolipidemic, Hepatoprotective and Renoprotective Effects of Cydonia Oblonga Mill. Fruit in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Iran. J. Pharm. Res.* 2015; 14: 1207-14.

27. Shihabi ZK and Scaro J. A modified Malloy-Evelyn procedure for total bilirubin in microsamples. *Am. J. Med. Technol.* 1977; 43: 1004-7.

28. Riener CK, Kada G and Gruber HJ. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.* 2002; 373: 266-76.

29. Adiban H, Shirazi FH, Gholami S, Kamalinejad M, Hosseini SH, Noubarani M and Eskandari MR. Chemopreventive effect of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) fruit extract on hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in rats. *Int. Pharm. Acta.* 2019; 2e2: 1-12.

30. Amereh Z, Hatami N, Shirazi FH, Gholami S, Hosseini SH, Noubarani M, Kamalinejad M, Andalib S, Keyhanfar F and Eskandari MR. Cancer chemoprevention by oleaster (*Elaeagnus angustifoli* L.) fruit extract in a model of hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in rats. *EXCLI. J.* 2017; 16: 1046-56.

31. Domitrović R and Potočnjak I. A comprehensive overview of hepatoprotective natural compounds: mechanism of action and clinical perspectives. *Arch. Toxicol.* 2016; 90: 39-79.

32. Lin SY, Dan X, Du XX, Ran CL, Lu X, Ren SJ, Tang ZT, Yin LZ, He CL, Yuan ZX, Fu HL, Zhao XL and Shu G. Protective Effects of

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]

Salidroside against Carbon Tetrachloride (CCl_4)-Induced Liver Injury by Initiating Mitochondria to Resist Oxidative Stress in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20: 3187.

33. Shayesteh R, Kamalinejad M, Adiban H, Kardan A, Keyhanfar F and Eskandari MR. Cytoprotective Effects of Pumpkin (Cucurbita Moschata) Fruit Extract against Oxidative Stress and Carbonyl Stress. *Drug. Res* (*Stuttg*). 2017; 67: 576-82.

34. Kaur G, Jabbar Z, Athar M and Alam MS. Punica granatum (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food. Chem. Toxicol.* 2006; 44: 984-93.

35. Deniz GY and Geyikoglu F. Extract of the Punica granatum Flowers Attenuates Progression of Hepatoxicity against Cadmium Chloride-Induced Liver Injury in Rat. *Inter. J. Med. Res. Heal. Sci.* 2019; 8: 143-50.

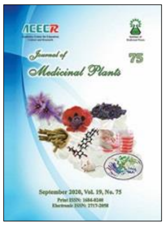
How to cite this article: Andalib S, Maleki Nejad N, Kamali Nejad M, Tavakolizadeh M, Noubarani M, Shahbazi Zanjanmaskan S, Eskandari MR. A search for protective activity of aqueous extract of punica granatum var. pleniflora against CCl_4-induced hepatotoxicity in rats. ***Journal of Medicinal Plants*** 2020; 19(75): 188-203.
doi: 10.29252/jmp.19.75.188

J. Med. Plants 2020; 19(75): 188-203

Institute of Medicinal Plants

Journal of Medicinal Plants

Journal homepage: www.jmp.ir



Research Article

A search for protective activity of aqueous extract of *Punica granatum* var. *pleniflora* against CCl_4-induced hepatotoxicity in rats

Sina Andalib[1], Negar Maleki Nejad[1], Mohammad Kamali Nejad[2], Mahdi Tavakolizadeh[3], Maryam Noubarani[1], Sonia Shahbazi Zanjanmaskan[1], Mohammad Reza Eskandari[1,]*

[1] *Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran*

[2] *Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

[3] *Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran*

ARTICLE INFO

Keywords:
Golnar
Antioxidant
Carbon tetrachloride
Flavonoid
Hepatoprotection
Polyphenol

ABSTRACT

Background: *Punica granatum* var. *pleniflora* (Golnar in Persian) is a subspecies of pomegranate that only has the blooms with no fruit generation. The plant has been used for the treatment of liver diseases in Iranian folk medicine. **Objective:** In the present study, the hepatoprotective effects of aqueous extract of *Punica granatum* var. pleniflora (APG) were evaluated in carbon tetrachloride (CCl_4)-induced hepatotoxicity in male rats along with its *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. *In vitro* free radical scavenging and antioxidant properties of APG were also measured by DPPH method and the determination of polyphenol and flavonoids contents. **Methods:** Hepatotoxicity was induced in rats by CCl_4 administration and the extract were administered orally at three different doses. **Results:** At the end of the experiment, the serum biomarkers of liver injury, including alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP), gamma glutamyl transpeptidase (GGT), bilirubin, and total protein were significantly decrease in APG-treated animals when compared to CCl_4-intoxicated rats ($P < 0.001$). Besides, *in vivo* examination showed that the extract prevented CCl_4-induced hepatic oxidative stress in rats, which demonstrated by the restoration of reduced glutathione (GSH) and the lessening of lipid peroxidation ($P < 0.001$). In addition, APG diminished the increase of relative liver weight induced by CCl_4 in rats ($P < 0.001$). **Conclusion:** To conclude, this study showed that APG possesses potent free radical scavenging and antioxidant activities. Also, the hepatoprotective properties of APG against CCl_4-induced liver injury may be partly mediated by its antioxidant activity due to the presence of polyphenols and flavonoids in the plant.

Abbreviations: APG, *Punica granatum* var. *pleniflora*; CCl_4, Carbon tetrachloride; ALT, Alanine transaminase; AST, Aspartate transaminase; ALP, Alkaline phosphatase; GGT, Gamma glutamyl transpeptidase; GSH, Reduced glutathione

* Corresponding author: eskandarimr@zums.ac.ir

doi: 10.29252/jmp.19.75.188
Received 7 July 2019; Received in revised form 4 November 2019; Accepted 8 January 2020
© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

[Downloaded from jmp.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2020.19.75.11.1]
[DOI: 10.29252/jmp.19.75.188]