

ارزیابی تاثیر درمانی مکمل دارویی حصا-آ (HESA-A) همراه با آتورواستاتین بر روی کبد چرب غیر الکلی در موش صحرایی

مجید عفتی^۱، محمود خرمی^۱، دکتر علی زارعی محمودآبادی^۲، دکتر جواد رئوف سرشوری^۳

نویسنده‌ی مسئول: گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله عج، تهران alizmah2016@gmail.com

دریافت: ۹۵/۴/۵ پذیرش: ۹۵/۶/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: بیماری کبد چرب ناشی از توقف کاتابولیسم و تقویت سنتز چربی می‌باشد که منجر به تجمع مقادیر زیاد چربی (تری گلیسرید) در سلول‌های کبد می‌گردد و عدم درمان مناسب آن منجر به التهاب و سیروز می‌گردد. هدف مطالعه‌ی حاضر بررسی تاثیر استفاده‌ی همزمان داروی حصا-آ و آتورواستاتین بر فاکتورهای بیوشیمیایی در کبد چرب غیر الکلی در مقایسه با مصرف آتورواستاتین به تنهایی در موش‌های مبتلا به کبد چرب می‌باشد.

روش و بررسی: تعداد ۲۸ سر موش صحرایی با وزن تقریبی 180 ± 20 گرم به صورت تصادفی در دو گروه شاهد ($n=7$) با رژیم غذایی استاندارد و گروه تغذیه شده با رژیم پرچرب به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. جهت اطمینان از القای کبد چرب، گروه شاهد به همراه ۷ سر از گروه پرچرب کشته شدند. تعداد ۱۴ حیوان باقیمانده در دو گروه با آتورواستاتین و آتورواستاتین + حصا-آ به مدت ۳۰ روز تیمار شدند. در ادامه شاخص‌های بیوشیمیایی (فند، پروفایل لیپید و آنزیم‌های کبدی) سرم سنجیده و مطالعات بافت شناسی در نمونه‌های کبدی نیز انجام شد. **یافته‌ها:** شاخص‌های بیوشیمیایی در گروه حصا-آ و آتورواستاتین در مقایسه با گروه آتورواستاتین کاهش نشان داد. مطالعه‌ی بافت شناسی کبد نیز کاهش قابل توجه در میزان چربی بافتی و بهبود بیماری از درجه‌ی سه به درجه‌ی یک را در این گروه نشان داد. **نتیجه گیری:** با توجه به نتایج، استفاده از حصا-آ به عنوان مکمل درمانی با کمترین عوارض می‌تواند در کاهش علائم بیماری کبد چرب غیر الکلی به ویژه در موارد شدید بیماری نقش موثری داشته باشد.

واژگان کلیدی: رژیم غذایی پرچرب، کبد چرب غیر الکلی، داروی حصا-آ، آتورواستاتین، پروفایل لیپیدی، آنزیم‌های کبدی

مقدمه

بیماری کبد چرب غیر الکلی (NAFLD) یکی از بیماری‌های مزمن کبدی است که می‌تواند به سیروز کبدی و کارسینومای هپاتوسلولار تبدیل شود (۱). این بیماری یک بیماری قابل برگشت است که به دلیل تجمع مقادیر زیاد چربی (تری گلیسرید) در سلول‌های کبد به وجود می‌آید. در این بیماری معمولاً بیشتر از ۵ درصد وزن کبد را چربی تشکیل

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله عج، تهران

۲- دکترای بیوشیمی بالینی، دانشیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله عج، تهران

۳- دکترای علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله عج، تهران

(۱۱). تعداد فزاینده‌ای از بیماران مبتلا به کبد چرب دارای وزن نرمالی هستند، اگرچه این بیماران ممکن است چاقی شکمی و مقاومت به انسولین نیز داشته باشند. مطالعات نشان داده است که رژیم غذایی این گروه از بیماران یک رژیم غذایی ناسالم حاوی نوشابه گازدار و رژیم غذایی با قند بالا است (۱۲).

طی این بیماری تغییرات سیگنالینگ در مسیرهای ژنتیکی کبد رخ می‌دهد که منجر به کاهش بیان و یا توقف ژنهای مسیر کاتابولیسم چربی شده و از طرف دیگر افزایش بیان ژنهای مسیر سنتز چربی می‌گردد. در نتیجه منجر به تجمع چربی در سلولهای کبدی و افزایش چربی خون می‌گردد. این تغییرات موجب مقاومت به انسولین و فعال شدن فرایند التهاب در کبد شده که در برخی از موارد منجر به سیروز کبدی خواهد شد (۱۳). مطالعه‌ی تغییرات ژنتیکی و بیوشیمیایی بیماری، طی فرایند بروز و پیشرفت بیماری و همچنین ارزیابی درمان و بررسی نقش عوامل درمانی از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد. حصا-آ یک ترکیب بیولوژیک طبیعی با منشاء دریایی گیاهی است که در ایران توسط دکتر امراله احمدی به عنوان دارو معرفی شده است (۱۴). حصا-آ شامل اجزای معدنی (۵۰ درصد) اجزای آلی (۴۵ درصد) و آب (۵ درصد) می‌باشد (۱۵ و ۱۶). این دارو دارای پنج ویژگی مهم از جمله اثرات ضدالتهابی (۱۷)، آنتی اکسیدانی (۱۸)، تنظیم کننده سیستم ایمنی بدن (موثر در ایدز) (۱۹)، عملکرد انتخابی در دارو (۲۰)، شناسایی سلول بیمار از سلول سالم و اثر القا کنندگی مرگ سلولی (۲۱) می‌باشد. با توجه به موارد فوق الذکر به خصوص اثرات آنتی اکسیدانی حصا-آ، احتمالاً این گیاه توانایی آن را خواهد داشت که کبد را از ابتلا به استئاتوز محافظت کند. آتورواستاتین یک استاتین یا مهارکننده‌ی آنزیم ۳- هیدروکسی ۳- متیل گلووتاریل کوآنزیم A ردوکتاز و یک داروی تنظیم کننده‌ی چربی خون با عملکرد بر روی چربی‌های پلاسما است. در اثر مصرف دارو در بیماران هیپرلیپیدمی میزان کلسترول، تری‌گلیسیریدها و LDL-C

می‌دهد (۲). کبد چرب غیرالکلی که در فقدان مصرف الکل ایجاد می‌شود، به عنوان یک مشکل عمده مرتبط با سلامت شناخته شده است. این بیماری یکی از بیماری‌های شایع کبدی است. میزان شیوع آن در جوامع مختلف از ۲۸ تا ۳۰ درصد بوده و در کشورهای غربی میزان شیوع آن بین ۲۰ تا ۳۰ درصد می‌باشد (۳). طبق گزارش مطالعات مختلف ۳۰ درصد مردم کشور ما در محدوده‌ی سنی بین ۴۰ تا ۶۰ سال مبتلا به کبد چرب غیر الکلی می‌باشند (۴). بیماری کبد چرب برای اولین بار در سال ۱۹۸۰ شناسایی و معرفی شد و مشاهده شده بود که در گروهی از بیماران، آسیب سلول‌های کبدی مشابه کسانی که الکل مصرف می‌کنند، اتفاق می‌افتد ولی در این بیماران سابقه‌ای از مصرف الکل وجود ندارد. در این بیماران شواهدی از سایر بیماری‌های سلول کبد نیز وجود نداشت. ولی در عوض مشاهده شد که ۹۰ درصد آنان چاق بوده و ۲۵ درصد آنان افزایش میزان چربی خون و بیش از ۲۵ درصد نیز بیماری دیابت دارند (۵).

این بیماری در مردان شایع‌تر از زنان است و در زنان بعد از سن یائسگی شیوع آن افزایش می‌یابد (۶). یکی از مهم‌ترین فرضیه‌هایی که بیان کننده‌ی علت ایجاد بیماری است تئوری دو مرحله‌ای نام دارد که در آن مقاومت به انسولین به عنوان عامل استئاتوز و استئاتوهپاتیت و عوامل اکسیداتیو به عنوان عامل التهاب و پیشرفت بیماری بیان شده‌اند (۷). چاقی، افزایش قند خون، دیابت نوع دو و افزایش چربی خون از جمله مهم‌ترین علل بروز کبد چرب غیرالکلی هستند (۸). مطالعات نشان داده‌اند که بیشتر از ۷۵ درصد افراد چاق مبتلا به این بیماری هستند (۹). از دیگر عوامل خطر این بیماری می‌توان به افزایش سن، سابقه‌ی خانوادگی، سوء تغذیه، کاهش وزن شدید، داروها (مانند گلوکوکورتیکوئیدها و متوترکسات) و برخی بیماری‌ها (نظیر بیماری التهابی روده) اشاره کرد (۱۰). در برخی مطالعات بین بروز این بیماری با دریافت زیاد چربی‌های اشباع یا کربوهیدرات‌ها ارتباط مشاهده شده است

خون کاهش یافته و HDL-C افزایش می‌یابد. آنورواستاتین، متفورمین و ویتامین E به عنوان داروی انتخابی در درمان کبد چرب می‌باشد (۲۲). هدف از این مطالعه استفاده از حصا-آ به صورت مکمل با آنورواستاتین در موش‌های مبتلا به کبد چرب غیر الکلی و بررسی تاثیر آن در افزایش اثر درمانی آنورواستاتین می‌باشد.

روش و بررسی

حیوانات: مطالعه‌ی حاضر از نوع تجربی مداخله‌گر آزمایشگاهی بود. این مطالعه بر روی ۲۸ سر موش صحرایی نژاد ویستار با میانگین وزنی 180 ± 20 گرم خریداری شده از مرکز حیوانات آزمایشگاهی پژوهشگاه بقیه الله (عج) انجام گرفت. ابتدا حیوانات به مدت دو هفته جهت سازگاری با شرایط محیطی با میانگین دمای 22 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد و با رعایت چرخه‌ی روشنایی تاریکی هر کدام به مدت ۱۲ ساعت و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. همچنین دستورالعمل بین المللی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی (NIH) رعایت گردید. بعد از این مدت حیوانات به صورت تصادفی به ۲ گروه شامل: گروه شاهد؛ ۷ سر حیوان و گروه HFD (رژیم پرچرب) ۲۱ سر حیوان تقسیم شدند.

طراحی آزمایش: گروه شاهد با رژیم غذایی نرمال جوندگان و گروه HFD با رژیم پرچرب فرموله شده بر پایه روغن حیوانی توسط محقق به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. با توجه به عناصر تشکیل دهنده‌ی غذای نرمال جوندگان، غذای پرچرب مورد استفاده شامل غذای پایه‌ی جوندگان که با افزودن ۱۵ درصد چربی حیوانی، ۴ درصد کلسترول (شرکت سیگما-آمریکا) و ۱ درصد اسید کولیک (شرکت سیگما-آمریکا) توسط محقق ساخته شد. این فرمول از لحاظ مقدار کالری و انرژی لازم جهت القای کبد چرب مناسب بود. در جدول ۱، درصد ترکیبات سازنده رژیم غذایی پرچرب و

رژیم نرمال قید شده است. در طول این مدت غذا به صورت نامحدود در اختیار موش‌ها قرار داشت. وزن حیوانات به صورت هفتگی سنجیده و یادداشت شد. پس از پایان دوره‌ی تیمار و رسیدن میانگین وزن حیوانات به حدود ۲۴۰ گرم، به منظور بررسی القای کبد چرب، گروه شاهد به همراه ۷ سر از حیوانات گروه HFD که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند پس از ۱۲ ساعت ناشتایی با استفاده از اتر بیهوش و با برش در ناحیه‌ی شکم و قفسه سینه حدود ۵ میلی‌لیتر خون به طور مستقیم از قلب آنها گرفته شد و در لوله‌های پلاستیکی ژل دار جمع‌آوری گردید و سپس سرم آنها جدا و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. همچنین کبد حیوانات نیز جمع‌آوری و پس از شستشو با نرمال سالین به چند قطعه تقسیم و برای مطالعات بافت شناسی در فرمالین ۱۰ درصد ذخیره شد. در ادامه تعداد ۱۴ موش باقیمانده به صورت تصادفی به دو گروه هفت تایی تقسیم شدند. یکی از گروه‌ها با داروی آنورواستاتین به طور روزانه و با دوز (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) و گروه دوم روزانه با آنورواستاتین با دوز (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) + حصا-آ با دوز (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) به مدت ۳۰ روز تیمار شدند (۲۰ و ۲۳). پس از این مدت مشابه مرحله‌ی قبل سرم و بافت کبد حیوانات جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایشات در شرایط مناسب نگهداری شدند.

سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی: در پایان تیمار دارویی میزان گلوکز، تری‌گلیسیرید، توتال کلسترول، HDL-C، LDL-C و فعالیت آنزیم‌های آسپارات ترانس آمیناز (AST)، آلانین ترانس آمیناز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALK-P) در نمونه سرمی با استفاده از کیت‌های تهیه شده از شرکت بیونیک و توسط دستگاه اتوانالایزر Hitachi ۹۱۲ (ژاپن) اندازه‌گیری شد.

مطالعه هیستوپاتولوژی کبد: بخشی از بافت کبد که در فرمالین

جدول ۲ ارائه شده است. تغذیه با رژیم پرچرب موجب افزایش معنی‌دار در سطوح سرمی قند خون ناشتا، تری‌گلیسیرید (TG)، کلسترول توتال (TC) و LDL-C و کاهش معنی‌دار در میزان سرمی HDL-C در مقایسه با گروه شاهد گردید. استفاده‌ی همزمان از داروهای حصار و آتورواستاتین موجب کاهش معنی‌دار در میزان سرمی TG، TC و LDL-C در مقایسه با گروه تیمار با آتورواستاتین به‌تنهایی و گروه HFD شد در حالی که میزان HDL-C افزایش یافته بود.

جدول ۱؛ ترکیبات سازنده رژیم غذایی پرچرب و رژیم

استاندارد

رژیم استاندارد	رژیم پرچرب
چربی ۱۲٪	۲۹٪
کربوهیدرات ۵۷٪	۴۵٪
پروتئین ۲۸٪	۲۲٪
سایر مواد ۳٪	۴٪
مجموع ۱۰۰٪	۱۰۰٪

ب- بررسی تاثیر رژیم پرچرب بر آنزیم‌های کبدی: نتایج حاصل از تاثیر رژیم پرچرب بر آنزیم‌های کبدی در جدول ۳ آورده شده است. سطوح سرمی فعالیت آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP-K)، در گروه تغذیه با HFD در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش نشان می‌دهد. همچنین میزان آنزیم‌های کبدی در موش‌های تیمار شده با HESA-A و آتورواستاتین در مقایسه با گروه تیمار شده با آتورواستاتین به‌تنهایی و گروه HFD به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود.

قرار داده شده بود با استفاده از شیوه‌های رایج پاساژ بافت و تهیه مقاطع آسیب شناسی، بلوک گیری و برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون تهیه و با هماتوکسیلین-ئوزین رنگ‌آمیزی شد. ارزیابی مقاطع آسیب شناسی توسط یک مقیاس نیمه کمی و به صورت دو سوکور انجام شد و بر اساس میزان چربی ذخیره شده در سلول‌ها و مشخصات بافت شناسی درجه بندی گردید. تغییرات هیستوپاتولوژی از لحاظ تغییر چربی هپاتوسیت‌ها بر اساس شدت ضایعه طبق روش ارائه شده توسط وانگ و همکاران و برانت و همکاران از صفر تا ۴ درجه‌بندی شد. (صفر: بدون استئاتوز، یک: کمتر از ۲۵ درصد هپاتوسیت‌ها دچار استئاتوز هستند، دو: بین ۲۶ تا ۵۰ درصد هپاتوسیت‌ها دچار استئاتوز هستند، سه: بین ۵۱ تا ۷۵ هپاتوسیت‌ها دچار استئاتوز هستند، چهار: بین ۷۶ تا ۱۰۰ درصد هپاتوسیت‌ها دچار استئاتوز هستند) (۲۵ و ۲۴).
آنالیز آماری: نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد ارزیابی قرار گرفت و اختلافات بین گروه‌ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) مورد بررسی قرار گرفت. اختلافات در سطح $(P < 0.05)$ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

میانگین وزن هر چهار گروه در پایان هر هفته سنجیده شد (نمودار ۱). تیمار با رژیم پرچرب در بازه‌ی زمانی ۸ هفته‌ای موجب افزایش معنی‌دار $(P < 0.05)$ در وزن موش‌های HFD در مقایسه با گروه شاهد گردید. همچنین درمان دارویی موجب کاهش در میزان وزن گروه‌ها نسبت به قبل از تیمار گردید هر چند این کاهش معنی‌دار نبود.

الف- بررسی تاثیر رژیم پرچرب بر میزان قند خون و پروفایل لیپیدی سرم: نتایج مربوط به میزان قند و چربی سرم در

جدول ۲: $mean \pm SEM$ قند و پروفایل چربی.

گروه ها	قند خون ناشتا (mg/dl)	تری گلیسیرید (mg/dl)	کلسترول توتال (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)
شاهد	۱۱۹/۵۷±۴/۹	۵۳/۷۱±۵/۰	۵۶/۴۲±۲/۱	۳۹/۲۸±۱/۷	۱۷/۱۴±۱/۲
رژیم پرچرب	**۱۷۲/۷۱±۵/۵	*۹۰/۸۵±۴/۱	*۹۴/۲۸±۱/۳	**۲۲/۵۷±۲/۱	**۳۷/۱۵±۱/۳
تیمار با آتورواستاتین	♣ ۱۴۰/۶۷±۵/۹	♣♣ ۶۱/۳۳±۵/۶	♣♣ ۷۱/۳۳±۳/۸	♣♣ ۳۰/۸۳±۱/۲	♣♣ ۲۰/۸۳±۱/۳
تیمار با حصا-آ + آتورواستاتین	♣♣ ۱۳۱/۱۴±۷/۷	♣♣ ۵۷/۸۵±۴/۶	♣♣ ۶۱/۷۱±۲/۲	♣♣ ۳۱/۷۱±۱/۳	♣♣ ۱۹/۸۵±۱/۷

*: $P < 0.05$ و **: $P < 0.01$ در مقایسه با گروه شاهد. ♣: $P < 0.05$ و ♣♣: $P < 0.01$ در مقایسه با گروه تیمار با گروه تغذیه شده با رژیم پرچرب

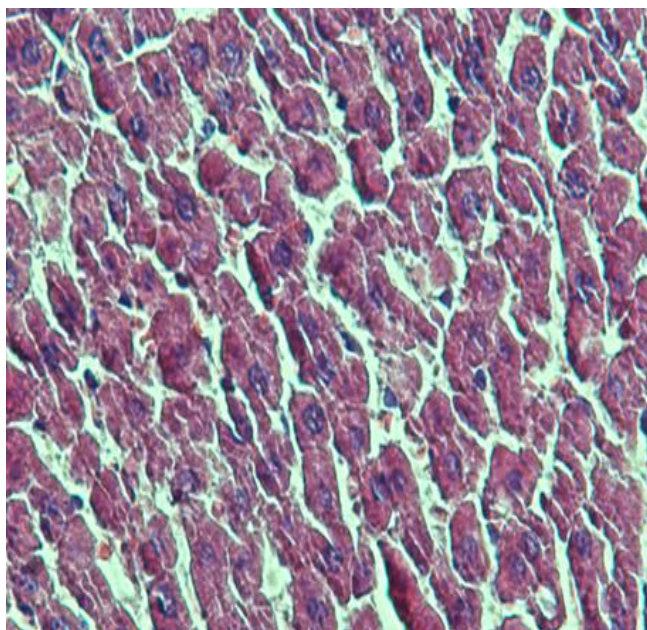
جدول ۳: $mean \pm SEM$ پارامترهای آنزیمی سرم.

گروه ها	آسپاراتات آمینوترانسفراز (U/L)	آلانین آمینوترانسفراز (U/L)	آلکالین فسفاتاز (U/L)
شاهد	۸۹/۸۵±۴/۸	۴۶/۲۸±۲/۸	۲۵۴/۴۲±۱/۳
رژیم پرچرب	**۱۴۷/۸۵±۸/۶	**۸۶/۸۵±۳/۴	**۳۷۳/۲۹±۱/۲
تیمار با آتورواستاتین	♣♣ ۱۰۹/۸۳±۶/۵	♣♣ ۵۹/۱۶±۵/۲	♣♣ ۳۰۲/۵۰±۲/۵
تیمار با حصا-آ + آتورواستاتین	♣♣ ۱۰۲/۴۳±۸/۰	♣♣ ۵۳/۱۶±۵/۸	♣♣ ۲۸۳/۵۷±۱/۴

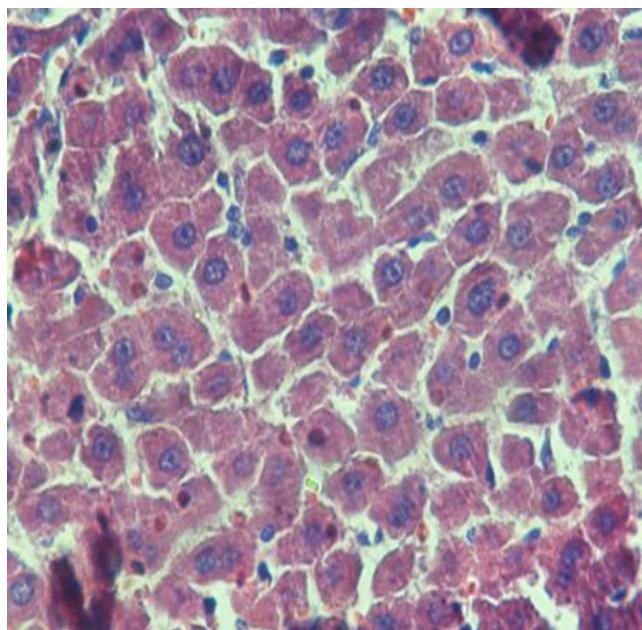
*: $P < 0.05$ و **: $P < 0.01$ در مقایسه با گروه شاهد. ♣: $P < 0.05$ و ♣♣: $P < 0.01$ در مقایسه با گروه تیمار با گروه تغذیه شده با رژیم پرچرب

ج - مطالعه‌ی هیستوپاتولوژی تاثیر رژیم پرچرب بر بافت کبد؛ در مطالعه‌ی بافت شناسی، هیچگونه علامت غیرطبیعی در بافت کبد موش‌های گروه شاهد مشاهده نشد (تصویر ۱). در حالی که، در موش‌های گروه HFD که به مدت ۸ هفته با رژیم پرچرب تغذیه شده بودند، تغییرات هیستوپاتولوژی در کبد به صورت تجمع چربی میکروویکولر و ماکروویکولر همراه با تورم هپاتوسیت‌ها مشاهده شد (تصویر ۲). در گروه تیمار با آتورواستاتین میزان تجمع چربی و

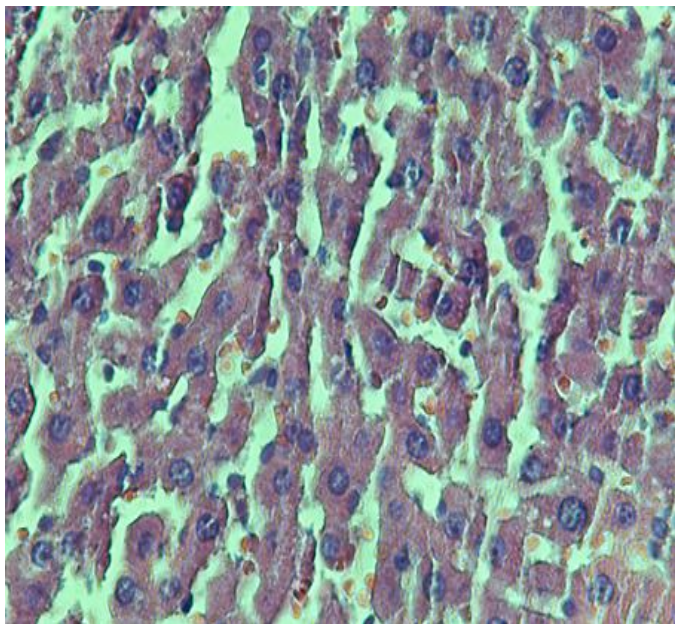
میکروویکولرها کاهش چشمگیر نشان می‌دهد و اشکال ماکروویکولار دیده نمی‌شود (تصویر ۳) ولی میزان کاهش علائم هیستوپاتولوژی در گروه هم افزایی حصا-آ و آتورواستاتین به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه تیمار با آتورواستاتین بیشتر بوده و علائم به شکل بارزی کاهش یافته است (تصویر ۴). در نمودار ۲ میزان آسیب استئاتوز کبد و بهبود آن در موش‌های هر چهار گروه به تفکیک آورده شده است.



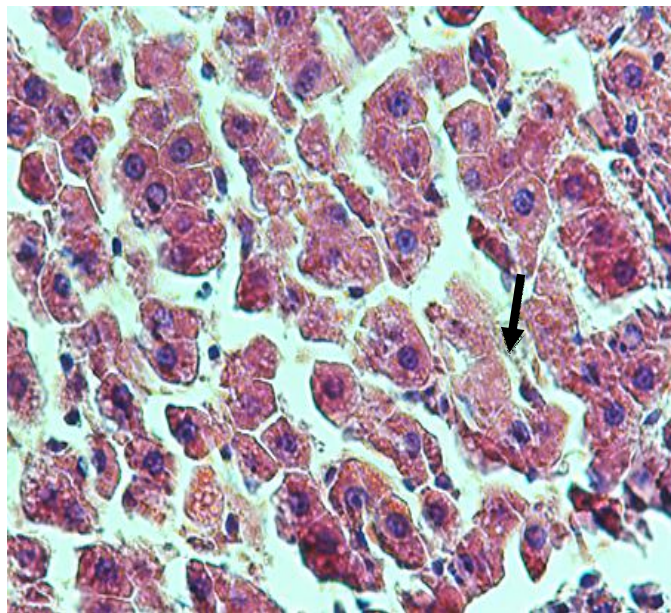
تصویر ۳: گروه تیمار با آتورواستاتین میزان تجمع چربی و میکرووزیکولها کاهش داشت.



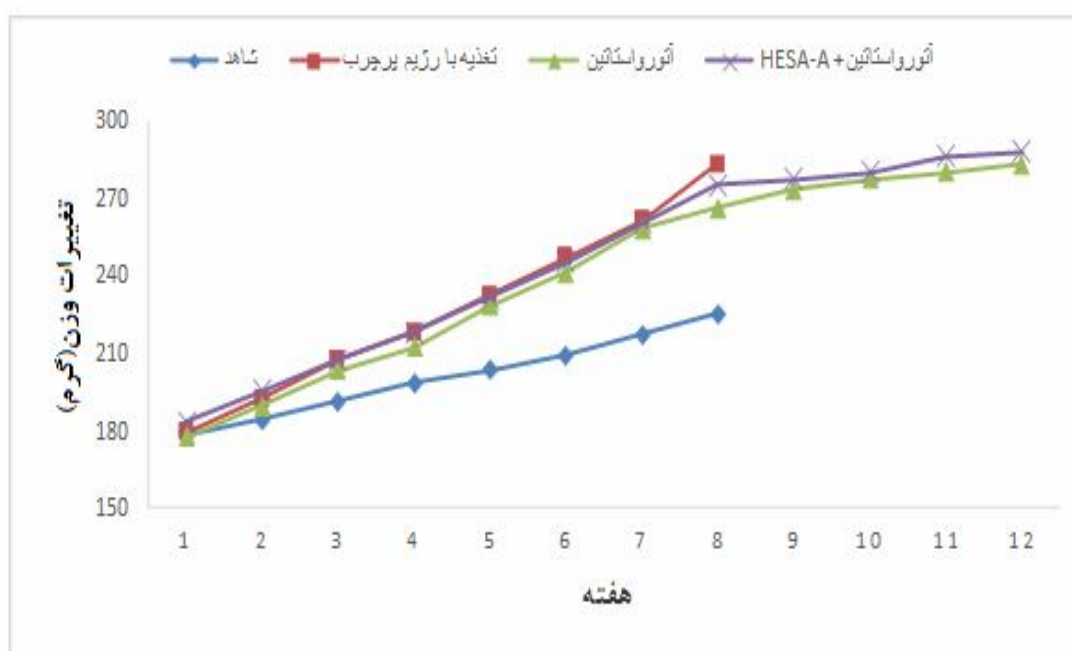
تصویر ۱: نمای میکروسکوپی از بافت کبد گروه سالم، هپاتوسیت‌ها و ساختار بافت کبد طبیعی می‌باشد.



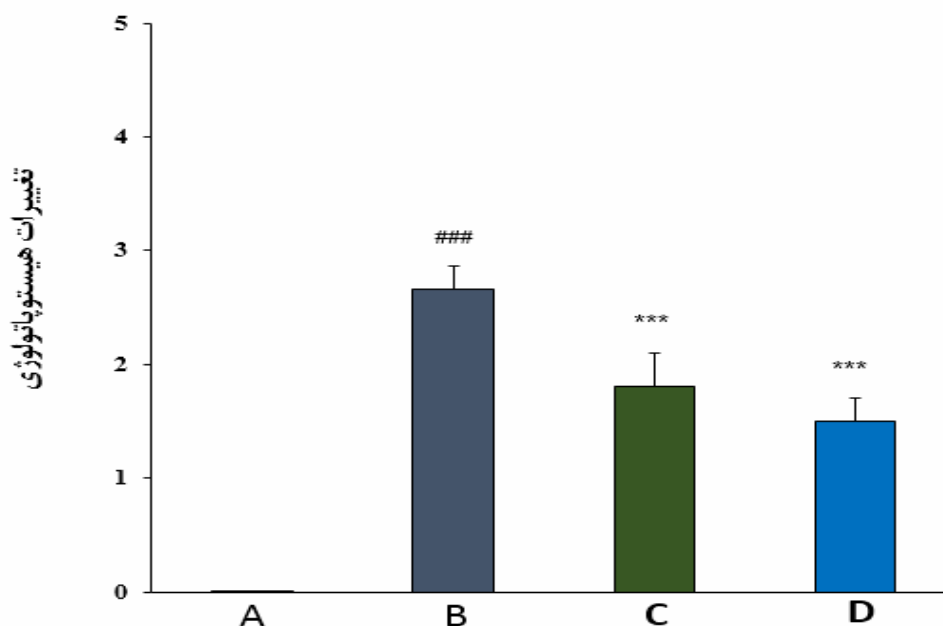
تصویر ۴: گروه حصار-آ همراه با آتورواستاتین میزان بهبودی مشاهده می‌شود.



تصویر ۲: نمای میکروسکوپی از بافت کبد گروه تغذیه شده با رژیم پرچرب که تغییرات چربی به صورت میکرو و ماکرووزیکولر مشاهده می‌شود.



نمودار ۱؛ میانگین تغییرات وزن در گروه‌های شاهد، تغذیه شده با رژیم پرچرب، تیمار با آتورواستاتین و تیمار با حصا-آ + آتورواستاتین



نمودار ۲؛ درجه بندی تغییرات هیستوپاتولوژی به تفکیک گروه‌ها

A: گروه شاهد، B: گروه HFD، C: گروه آتورواستاتین، D: گروه حصا-آ + آتورواستاتین

###: $P < 0.01$ در مقایسه با گروه شاهد، ***: $P < 0.01$ در مقایسه با گروه تغذیه شده با HFD

بحث

نتایج حاصل از مطالعات بافت شناسی و بیوشیمیایی افزایش معنی دار تأثیرات مصرف داروی آتورواستاتین همراه با مکمل دارویی حصا-آ را نشان داد. به طوری که علاوه بر کاهش معنی دار فعالیت آنزیم های کبدی سرم که بیانگر بهبود ضایعات بافتی است، مطالعات بافت شناسی نیز این یافته ها را تایید می کند. با توجه به افزایش قابل توجه شیوع بیماری کبد چرب در جهان و به ویژه در کشور ما مطالعه در زمینه ی پیشگیری و درمان آن بیش از پیش مورد توجه واقع شده است. ابتدا به بیماری کبد چرب غیر الکلی ارتباط مستقیم با سبک زندگی و مخصوصاً رژیم غذایی مردم دارد. تغییر در رژیم غذایی در جوامع در حال توسعه و استفاده از رژیم های پرچرب و کم تحرکی موجب افزایش شیوع آن گردیده است. امروزه برای بررسی بیماری ها از نمونه های حیوانات آزمایشگاهی استفاده می گردد. در خصوص بیماری کبد چرب نیز به دلیل محدودیت هایی که در به دست آوردن نمونه بافت کبد انسانی برای مطالعه وجود دارد، از مدل های حیوانی متعددی استفاده شده است.

یکی از اهداف ما در این مطالعه، القای نوعی از کبد چرب در موش آزمایشگاهی بود که بیشترین شباهت با علل ایجاد کننده ی آن در نمونه ی انسانی داشته باشد، به همین علت از رژیم غذایی استاندارد موش که به آن درصد مشخصی از چربی حیوانی، کلسترول و همچنین به منظور افزایش جذب روده ای چربی در موش های صحرایی از اسید کولیک افزوده شده بود، استفاده گردید که این فرمول از لحاظ مقدار کالری و انرژی لازم جهت القای کبد چرب مورد نیاز در موش مناسب بود و تایید بیماری از طریق بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی شاخص در کبد چرب، بافت شناسی کبد و افزایش وزن صورت گرفت که مقادیر TC، TG و LDL-C به شکل معنی داری افزایش نشان داد. یافته های بافت شناسی همسو با یافته های بیوشیمیایی القای کبد چرب را تایید نمود.

کبد چرب غیرالکلی با ضایعه سلولی همراه است لذا با افزایش سطوح آنزیم های کبدی آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در خون همراه می باشد. میزان افزایش این فاکتورها بیشتر از افزایش مشاهده شده در سندروم متابولیک است (۲۶).

افزایش آنزیم های کبدی در سرم نشانگر آسیب کبد می باشد (۲۷). با توجه به این که تغییر در میزان سرمی آنزیم های مذکور طی استئاتوز کبد نیز قبلاً گزارش شده است (۲۸)، بنابراین می توان با توجه به افزایش آنزیم های کبدی و نتایج بافت شناسی القای بیماری را در حیوانات با استفاده از رژیم غذایی پرچرب نتیجه گیری کرد. در مطالعه ی حاضر علاوه بر آنزیم های کبدی سایر شاخص های بیوشیمیایی که معمولاً در کبد چرب غیر الکلی (TG, Total Chol, LDL-C) افزایش می یابند نیز مورد بررسی قرار گرفت که تقریباً همه ی شاخص ها به شکل معنی داری ایجاد کبد چرب را تایید می کردند. طبق گزارشات مختلف در بیماران مبتلا به NASH تغییرات ساختاری در میتوکندری، اختلال در سنتز ATP کبدی و افزایش تولید رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) بروز می کند (۳۰ و ۲۹). بخش عمده ای از عوارض و علایم بیماری به وسیله ی این عوامل ایجاد می گردد و یکی از مسیرهای درمان نیز مهار تولید این عوامل خواهد بود.

حصا-آ یک ترکیب بیولوژیک طبیعی با منشاء دریایی گیاهی است. با توجه به مطالعات انجام شده این دارو اثر ضد التهابی و آنتی اکسیدانی خوبی دارد و در بسیاری از بیماری هایی که با التهاب روبه رو هستند نظیر سرطان، آرتریت روماتوئید و غیره دارای اثربخشی نسبی است. داروی آتورواستاتین نیز یک داروی کاهش دهنده ی چربی و به عنوان درمان انتخابی برای کبد چرب است. در مطالعه ای که توسط جی و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در مورد مقایسه اثر آتورواستاتین و رژیم غذایی نرمال در رت های مبتلا شده به کبد چرب غیرالکلی، تأثیر داروی آتورواستاتین بر کاهش پروفایل چربی سرم و

آنزیم‌های کبدی، کاهش التهاب و بهبود عملکرد کبد اثبات گردید (۲۳). در مطالعه‌ای که نتایج آن در سال ۲۰۰۹ منتشر شد، ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان متاستاتیک کبدی، بدون هیچ طرح درمانی طی دو ماه، به مدت ۱۲ هفته، روزانه ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از دورای حصا-آ را به شکل قرص دریافت کردند. که در نتیجه آن کاهش معنی‌داری در آنزیم‌های کبدی در ماه دوم و سوم مطالعه مشاهده شد که نشانگر اثرات حفاظت کبدی دارو می‌باشد (۳۲ و ۳۱). در مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار اثر هم افزایی داروی حصا-آ و آتورواستاتین بر روی شاخص‌های کبد چرب غیرالکلی در مقایسه با داروی آتورواستاتین که به‌طور رایج در درمان بیماری‌های افزایش چربی خون نظیر کبد چرب مورد استفاده قرار می‌گیرد مورد بررسی قرار گرفت. دوز مورد استفاده برای مکمل دارویی حصا-آ و آتورواستاتین همان دوز مصرفی در سایر بیماری‌ها مطالعه شده بود (۲۳ و ۲۰). مطالعات بافت شناسی بیانگر کاهش چربی‌ها در داخل هپاتوسیت‌ها اعم از میکرو و ماکرووزیکولار می‌باشد. چون افزایش چربی ناشی از اختلال در روند ژنتیکی متابولیسم چربی در کبد است لذا کاهش ذخایر چربی احتمالا به دلیل اصلاح اختلالات در ژن‌های مربوطه می‌باشد. یکی دیگر از عوارض ناشی از کبد چرب مقاومت به انسولین و افزایش قند خون می‌باشد که در این مطالعه کاهش معنی‌دار در میزان قند خون نیز مشاهده گردید و میزان کاهش آن در درمان با هر دو دارو به‌طور معنی‌داری بیشتر از درمان با آتورواستاتین به تنهایی بود که این نتیجه نیز تایید کننده تاثیرات درمانی حصا-آ می‌باشد هر چند نیاز به مطالعات تکمیلی دیگری برای تعیین دقیق مکانیسم عمل داروی می‌باشد. با توجه به علل ایجاد کننده‌ی عوارض در کبد چرب و تاثیر عوامل اکسیدانی در آن، نتایج مطالعات مربوط به مکمل دارویی حصا-آ نشان می‌دهد که احتمالا این ترکیب

از طریق خواص آنتی‌اکسیدانی خود عمل می‌کند و همچنین با توجه به تاثیرات کاهش دهنده‌ی چربی آن احتمالا خواص آنتی ژنوتوکسیسیته نیز دارا می‌باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد. با توجه به اینکه در گروه‌هایی با شدت کم بیماری که توصیه درمانی بیشتر بر کاهش وزن و اصلاح شیوه زندگی می‌باشد و دارویی پیشنهاد نمی‌شود، لذا می‌توان با دادن این دارو به راحتی بهبود عملکرد کبدی و کاهش آنزیم‌های کبدی را مشاهده نمود و در صورت تایید اثرات مفید این دارو، آن را به‌عنوان یک داروی مفید در درمان و پیشگیری از پیشرفت بیماری به سمت سیروز و نارسایی غیر قابل برگشت کبدی به کار برد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر بیانگر تاثیر درمانی مناسب حصا-آ بر کبد چرب بوده و در مصرف همزمان با آتورواستاتین باعث افزایش اثربخشی آن می‌شود. با توجه به اینکه ترکیب فوق یک مشتق گیاهی-دریایی می‌باشد و تاثیرات منفی ترکیبات شیمیایی را ندارد، لذا می‌توان از آن به عنوان یک ترکیب بالقوه مناسب در درمان بیماری کبد چرب سود جست. هر چند برای تعیین دقیق مکانیسم عمل و تاثیر آن بر سایر عوارض کبد چرب نیاز به مطالعات تکمیلی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از طرح تحقیقاتی که با بودجه پژوهشی و حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) به انجام رسیده است، استخراج شده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه مذکور تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- 1- Duan X-Y, Qiao L, Fan J-G. Clinical features of nonalcoholic fatty liver disease-associated hepatocellular carcinoma. *Hepato Pancreatic Dis Int.* 2012; 11: 18-27.
- 2- Sherlock S, Dooley J. Diseases of the liver and biliary system: John Wiley & Sons; 2008.
- 3- Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Internal Med.* 2000; 132: 112-7.
- 4- Lankarani KB, Ghaffarpasand F, Mahmoodi M, et al. Non alcoholic fatty liver disease in southern Iran: a population based study. *Hepatitis.* 2013; 13: e9248.
- 5- Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2007; 30: 1212-18.
- 6- Hamaguchi M, Kojima T, Ohbora A, Takeda N, Fukui M, Kato T. Aging is a risk factor of nonalcoholic fatty liver disease in premenopausal women. *W J of Gastroenterol.* 2012; 18: 237-43.
- 7- Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med.* 1999; 107: 450-5.
- 8- Farrell GC, George J, de la M. Hall P, McCullough AJ. Overview: An introduction to NASH and related fatty liver disorders fatty liver disease. Blackwell Publishing Ltd; 2007. p. 1-12.
- 9- Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Internal Med.* 2005; 143: 722-8.
- 10- Valenti L, Dongiovanni P, Piperno A, et al. Alpha 1-antitrypsin mutations in NAFLD: high prevalence and association with altered iron metabolism but not with liver damage. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2006; 44: 857-64.
- 11- Musso G, Gambino R, De Michieli F, et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2003; 37: 909-16.
- 12- Assy N, Nasser G, Kamayse I, et al. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. *Canadian J Gastroenterol.* 2008; 22: 811-6.
- 13- Inokuchi-Shimizu S, Park EJ, Roh YS, et al. TAK1-mediated autophagy and fatty acid oxidation prevent hepatosteatosis and tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2014; 124: 3566-78.
- 14- Moallem S, Ahmadi A, Moshafi M, Taghavi M. Teratogenic effects of HESA-A, a natural anticancer product from Iran, in mice. *Human Exper Toxicol.* 2010; 30: 851-9.
- 15- Moallem SA, Ahmadi A, Niapour M, Hosseini T, Habibi G. Role of apoptosis in HESA-A teratogenicity in mouse fetus. *Drug Chem Toxicol.* 2009; 32: 186-90.
- 16- Sadeghi-Aliabadi H, Ahmadi A. Cytotoxicity and antitumor properties of a marine compound, HESA-A, on cancer cells. *DARU.* 2003; 11: 82-7.

- 17- Naseri M, Rezaeizadeh H, Asghari M, et al. The effect of HESA-A drug on formalin-induced inflammation in rats. *Daneshvar*. 2013; 20: 23-30.
- 18- Ahmadi A, Naderi G, Asgary S. Evaluation of hepatoprotective potential of HESA-A (a marine compound) pretreatment against thioacetamide-induced hepatic damage in rabbits. *Drugs Exp Clin Res*. 2004; 31: 1-6.
- 19- Rouhollah V, SeyedMehdi S, Rezvan Z, et al. In vitro inhibitory effects of the herbal-marine compound HESA-A against replication of human immunodeficiency virus-1. *Jundishapur J Microbiol*. 2012; 2012 (1, Winter): 315-9.
- 20- Mehdipour M, Taghavi Zenouz A, Mesgari Abbasi M, et al. Evaluation of the effect of two systemic doses of HESA-A on prevention of induced tongue neoplasm in rats. *J Dental Res Prospects*. 2013; 7: 218-24.
- 21- Ghasemi M, Nadali F, Ostad SN, Zaker F, Rostamy S, Dargahi H. Assesment of the efficacy of HESA-A on the proliferation and apoptosis of chronic myelogenous leukemia cell line (K562). *Payavard Salamat*. 2012; 6: 282-92.
- 22- Dajani A, AbuHammour A. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: where do we stand? An Overview. *Saudi J Gastroenterol*. 2016; 22: 91-105.
- 23- Ji G, Zhao X, Leng L, Liu P, Jiang Z. Comparison of dietary control and atorvastatin on high fat diet induced hepatic steatosis and hyperlipidemia in rats. *Lipids Health Dis*. 2011; 10: 23.
- 24- Wang JQ, Li J, Zou YH, et al. Preventive effects of total flavonoids of *Litsea coreana leve* on hepatic steatosis in rats fed with high fat diet. *J Ethnopharmacol*. 2009; 121: 54-60.
- 25- Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94: 2467-74.
- 26- Nakhjavani M, Khalilzadeh O, Khajeali L, et al. Serum oxidized-LDL is associated with diabetes duration independent of maintaining optimized levels of LDL-cholesterol. *Lipids*. 2010; 45: 321-7.
- 27- Chidambaram J, Venkatraman AC. *Cissus quadrangularis* stem alleviates insulin resistance, oxidative injury and fatty liver disease in rats fed high fat plus fructose diet. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48: 2021-9.
- 28- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *New England J Medicine*. 2002; 346: 1221-31.
- 29- Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006; 43: S99-S11z.
- 30- Riahi S, Mohammadi MT, Sobhani V, Soleimany M. Chronic effects of aerobic exercise on gene expression of LOX-1 receptor in the heart of rats fed with high fat diet. *J Basic Med Sci*. 2015; 18: 805-12.
- 31- Ahmadi A, Mohagheghi M, Karimi M, Seyed Ali G, Naseri M. Anticancer effects of HESA-A in patients with metastatic colon cancer. *Integrative Cancer Therap*. 2009; 8: 71-4.

- 32- Talebi Pour B, Jameshorani M, Salmani R, Chiti H. The Effect of *Chlorella Vulgaris* vs. Artichoke on patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a randomized clinical trial. *J Zanzan Univ Med Sci*. 2015; 23: 36-44.

The Effectiveness of HESA-A Supplement Combined with Atorvastatin on Nonalcoholic Fatty Liver in Rats

Efati M¹, Khorrami M¹, Zarei Mahmoud Abadi A¹, Raouf Sarshoori J²

¹Dept of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

²Dept. of Anatomy, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Zarei Mahmoud Abadi A, Dept. of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

E-mail: alizaremah2015@gmail.com

Received: 25 Jun 2016 **Accepted:** 13 Sep 2016

Background and Objective: Fatty liver disease occurs due to disturbances in lipid metabolism (increased fat synthesis and halting of catabolism) which eventually leads to the accumulation of large amounts of fat (triglycerides) in liver cells, that if left untreated lead to inflammation and cirrhosis. This study aimed to investigate the effect of concomitant use of HESA-A and atorvastatin on biochemical parameters in non-alcoholic fatty liver disease compared with atorvastatin alone.

Methods and Materials: 28 rats weighing 180±20 g were randomly divided into two groups: a control group (n = 7) with standard diet and a HFD (high-fat diet) group (n=21) which were fed for 8 weeks. To confirm the induction of fatty liver; controls along with seven rats from the HFD group were killed. The remaining 14 animals were divided into two groups. The first group received atorvastatin and the second group received HESA-A in combination with atorvastatin daily for 30 days. Finally, biochemical parameters (glucose, lipid profile and liver enzymes) were measured and histological studies were performed on the liver samples.

Results: Biochemical parameters in the HESA-A combined with atorvastatin group were significantly decreased in comparison to the atorvastatin group ($p<0.01$). The histopathological study of liver tissue showed a significant reduction in the amount of fat tissue and conversion of fatty liver from grade III to grade I.

Conclusion: According to the results of this study, the use of HESA-A as a complementary treatment for fatty liver disease without side effects can be integral role in reducing the incidence of non-alcoholic fatty liver disease, especially in severe cases.

Keywords: *high-fat diet, Non-alcoholic fatty liver, HESA-A, Atorvastatin, Lipid profile, Liver enzymes*