

اثر عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه غافث (*Agrimonia eupatoria L.*) بر سمیت کبدی در موش‌های صحرایی نر القا شده با تتراکلرید کربن

مریم خزائی^۱، دکتر ناصر میرازی^۲

نویسنده‌ی مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان maryam.khazaei133@yahoo.com

دریافت: ۹۶/۱/۲۸ پذیرش: ۹۶/۴/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: تتراکلریدکربن ماده‌ای سمی است که باعث ایجاد سمیت کبدی می‌گردد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه غافث بر سمیت کبدی در موش‌های القا شده با تتراکلریدکربن بود.

روش بررسی: در این مطالعه‌ی تجربی، ۴۲ سر موش صحرایی نر به ۶ گروه تصادفی تقسیم شدند. گروه کنترل و شم به ترتیب میزان ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم نرمال سالین و روغن زیتون به‌صورت درون صفاقی و گروه دریافت‌کننده تتراکلریدکربن میزان ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم تتراکلریدکربن با نسبت ۱:۱ با روغن زیتون به‌صورت تک‌دوز و درون صفاقی دریافت کردند. گروه‌های تیمار ۱، ۲ و ۳ توسط تتراکلریدکربن القا شده و دو ساعت بعد توسط عصاره‌ی گیاه غافث به‌ترتیب با دوزهای ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌مدت ۹۶ ساعت و به‌صورت درون صفاقی تیمار شدند. سپس نمونه‌های خونی مستقیماً از قلب جمع‌آوری شده و سطح سرمی آنزیم‌های کبدی اندازه‌گیری گردید. مطالعات میکروسکوپی بافت کبد نیز انجام شد. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری آنووا و توکی ارزیابی شدند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه افزایش معنادار سطح سرمی آنزیم‌های کبدی در گروه دریافت‌کننده تتراکلریدکربن نسبت به گروه کنترل و درمان با عصاره‌ی غافث و کاهش معنادار سطح سرمی آنزیم‌های کبدی در گروه‌های تیمار نسبت به گروه دریافت‌کننده تتراکلریدکربن را نشان داد ($P < 0.001$). همچنین مطالعات بافتی نکروز و التهاب بافت کبد در گروه دریافت‌کننده تتراکلریدکربن و کاهش سلول‌های نکروزی و التهاب را در گروه‌های تیمار نشان داد.

نتیجه‌گیری: تتراکلریدکربن بافت کبد را ملتهب و دچار نکروز می‌کند. عصاره‌ی گیاه غافث با کاهش میزان آنزیم‌های کبدی توانست اثرات سمی تتراکلریدکربن را در کبد کاهش دهد.

واژگان کلیدی: غافث، سمیت کبدی، تتراکلریدکربن، آنزیم‌های کبدی، موش صحرایی

مقدمه

خون، ذخیره‌ی قند به‌صورت گلیکوژن و تنظیم سوخت‌وساز قند و چربی از مهم‌ترین وظایف آن در بدن می‌باشد. همچنین نقش کبد در جذب چربی و دفاع در برابر

کبد یکی از ارگان‌های حیاتی بدن است که سم‌زدایی از داروها، دفع محصولات زائد ناشی از تخریب و نوسازی گلبول‌های قرمز خون به‌صورت صفرا، تولید عوامل انعقادی

۱- کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۲- دکترای تخصصی فیزیولوژی، دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

میکروبها و سموم جذب شده از راه مواد غذایی را نباید نادیده گرفت (۱). هرگونه اختلال در عملکرد کبد باعث ایجاد مجموعه‌ای از اختلالات می‌شود که می‌تواند صدمات جبران ناپذیری را به این عضو وارد نماید. عواملی مانند استرس اکسیداتیو، رادیکال‌های آزاد، الکل سفید، مواد شیمیایی، ویروس‌ها و داروها می‌توانند باعث تخریب بافت کبدی شوند (۲). چندین تست بیوشیمیایی در تشخیص بیماری‌های کبدی استفاده می‌شود. مهم‌ترین این تست‌ها تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های آمینوترانسفراز، شامل آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) می‌باشد. این آنزیم‌ها به طور معمول توسط سلول‌های کبدی به مقدار معینی تولید می‌گردند. زمانی که کبد دچار آسیب می‌شود سلول‌های کبدی ترشح آنزیم‌های فوق را افزایش داده و موجب بالا رفتن سطح پلاسمایی آن‌ها می‌گردند که بالا رفتن سطح این آنزیم‌ها در خون نشانه‌ی آسیب کبدی است. آلکالین فسفاتاز (ALP) نیز در بیماری‌های کبدی مرتبط با ترشح و دفع صفرا افزایش می‌یابد (۳). حلال‌های آلی به‌صورت گسترده در صنایع مختلف کاربرد دارند. این ترکیبات از راه‌های مختلف وارد بدن شده و با توجه به قدرت حلالیت آن‌ها در چربی از سد خونی- مغزی عبور نموده و موجب تضعیف سیستم اعصاب مرکزی می‌شوند. از طرف دیگر این ترکیبات در بدن متابولیزه شده و محصولاتی مانند رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌کنند که موجب آسیب در ارگان‌های مختلف بدن می‌شوند (۴). این ترکیبات در ایجاد بیماری‌های کبدی نقش مهمی دارند. فیروز کبدی معمولاً در اثر انواع مختلف بیماری‌های مزمن کبدی ایجاد می‌شود. پیامد احتمالی فیروز کبدی، سیروز کبد و کارسینومای سلول‌های کبدی می‌باشد (۵). تراکلرید کربن یکی از این حلال‌های آلی می‌باشد که به صورت گسترده در صنایع مختلف، مواد شوینده و پاک کننده‌ها به کار می‌رود. این ماده سمی بوده و موجب اختلال در سیستم اعصاب مرکزی، اختلال حواس و آسیب ارگان‌های

مختلف بدن شده و علاوه بر آن باعث ایجاد عوارض دیگری از جمله آسیب کبدی و کلیوی، سردرد، افسردگی، ضعف روانی و گیجی می‌گردد (۶). تراکلرید کربن بعد از ورود به بدن، توسط سیتوکروم P450 متابولیزه شده و به رادیکال‌های آزاد تری کلرومتیل (CCl_3) و پراکسی تری کلرومتیل (OOCCL_3) تبدیل می‌شود. اولین و مهمترین ارگان هدف برای این ماده کبد می‌باشد. رادیکال‌های آزاد تولید شده باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و ایجاد سمیت کبدی می‌گردند (۷). رادیکال تری کلرومتیل با انواع مولکول‌های زیستی مهم از قبیل آمینواسیدها، نوکلئوتیدها، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها و لیپیدها واکنش می‌دهد. رادیکال تری کلرومتیل در حضور اکسیژن به رادیکال پراکسی تری کلرومتیل تبدیل می‌شود. این رادیکال فعال‌تر بوده و از اسیدهای چرب غیراشباع هیدروژن دریافت می‌کند و به این ترتیب فرآیند پراکسیداسیون لیپیدی را آغاز می‌نماید. پراکسیداسیون لیپیدی در غشای کبد باعث تخریب غشا می‌گردد. اختلال در یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول‌های کبدی باعث می‌شود، آنزیم‌های کبدی که به‌طور طبیعی در داخل سیتوزول قرار دارند، وارد جریان خون شده و میزان این آنزیم‌ها در خون افزایش یابد که شاخصی برای آسیب کبدی می‌باشد (۸). مطالعات نشان می‌دهند رادیکال تری کلرومتیل همچنین می‌تواند انواعی از رادیکال‌های آزاد و اکسیژن واکنش‌پذیر در سایر بافت‌های غیرکبدی از جمله کلیه، قلب، شش، بیضه، مغز و خون تولید کند و با ایجاد استرس اکسیداتیو باعث ایجاد آسیب در آن‌ها گردد (۹). تحقیقات گذشته نشان داده اند که منابع غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط آن‌ها، می‌توانند سمیت کبدی ناشی از تراکلریدکربن را کاهش دهند. یکی از این منابع آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی می‌باشند (۱۰). گیاهان دارویی از زمان‌های قدیم در طب سنتی، جهت درمان و یا کنترل اغلب بیماری‌ها مورد استفاده‌ی بشر بوده است. با توجه

اینکه تاکنون اثر محافظتی این گیاه بر آسیب کبدی ناشی از تراکلرید کربن انجام نشده است، در این مطالعه برآن شدیم تا نقش محافظتی این گیاه را در به تاخیرانداختن سمیت کبدی و جلوگیری از پیشرفت بیماری مورد بررسی و ارزیابی قرار دهیم.

روش بررسی

انتخاب و گروه بندی حیوانات: در این مطالعه‌ی تجربی، ۴۲ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار، در محدوده وزنی ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم از دانشگاه علوم پزشکی همدان خریداری شد و به مدت ۱۰ روز در حیوان خانه‌ی دانشکده علوم پایه دانشگاه بوعلی سینا همدان در دمای استاندارد ۲۰ تا ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، همراه با آب و غذای کافی و در دسترس و تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند تا به شرایط محیط عادت نمایند. در این مطالعه کلیه‌ی موارد اخلاقی مورد تایید کمیته‌ی اخلاق پزشکی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه بوعلی سینا که با کد ۵۴-۱۵۲-۷ تصویب رسیده است، رعایت شد. حیوانات به‌طور تصادفی در ۶ گروه ۷ سری شامل گروه کنترل (دریافت کننده نرمال سالین به میزان ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم)، گروه دریافت کننده‌ی تراکلرید کربن (دریافت کننده‌ی تراکلرید کربن به میزان ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم با نسبت ۱:۱ با روغن زیتون به‌صورت تک دوز)، گروه شم (دریافت کننده‌ی روغن زیتون به میزان ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم)، گروه‌های تیمار ۱ و ۲ و ۳ (دو ساعت بعد از دریافت تراکلرید کربن به میزان ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم با نسبت ۱:۱ با روغن زیتون به‌صورت تک دوز، عصاره‌ی گیاه غاغت را به ترتیب با دوزهای متفاوت ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم دریافت کردند) تقسیم شدند. دو ساعت پس از دریافت تراکلرید کربن، تجویز عصاره به‌مدت ۹۶ ساعت انجام گرفت. تمام آزمایشات در طول روز و در دمای استاندارد ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد و

به عوارض و اثرات سوء داروهای شیمیایی، امروزه گرایش به‌مصرف گیاهان دارویی در سطح جهان افزایش چشمگیری داشته است (۱۱). یکی از این گیاهان دارویی که از سالیان دور به‌طور گسترده در درمان بیماری‌ها به‌کار می‌رفته است، گیاه غاغت با نام علمی *Agrimonia eupatoria* L. می‌باشد. گونه *Agrimonia eupatoria* L. از تیره گلسترخیان (Rosaceae) است که با نام agrimony شناخته شده است. این گیاه یک گیاه چندساله می‌باشد و به‌طور گسترده در سراسر اروپا، آسیا، آفریقا و امریکای شمالی یافت می‌شود (۱۲). این گیاه در ایران در مناطق تالش، آذربایجان، کردستان، مازندران، رشت، خراسان، لرستان، قزوین، اردبیل، شیراز، دشت مغان، تهران و ارومیه یافت می‌شود (۱۳). غاغت یک گیاه پایا، علفی و افراشته بوده و دارای ساقه‌ی راست می‌باشد که با کرک‌های گسترده و متراکم پوشیده شده است. شاخه‌های آن طویل، برگ‌دار و منتهی به گل آذین سنبله می‌باشد. برگ‌های این گیاه به صورت پرمماند و دندانه‌دار با سطح زیرین مخملی بوده و گل‌های آن زرد رنگ هستند. میوه‌ی غاغت به‌صورت مخروطی شکل کوچک می‌باشد (۱۴). غاغت دارای ترکیباتی از جمله پلی فنول‌ها، فلاونوئیدهایی مانند پروسیانیدین، کوئرستین، کاتچین و کامفرول، تانن‌ها و تری‌پنوئیدها می‌باشد (۱۵). از خواص درمانی غاغت می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد دیابتی، ضد چاقی، ضد سرطانی، ضد میکروبی و محافظت کننده‌ی سیستم عصبی، کبد و کلیه اشاره کرد (۱۶). گیاه غاغت از دیرباز برای آرام بخشی، کاهش استرس و درمان یرقان استفاده شده است و امروزه اثرات مفید آن در درمان هپاتیت، مشکلات تنفسی و ضد خونریزی بودن آن به اثبات رسیده است. این گیاه همچنین در درمان بیماری‌های گوارشی، دستگاه ادراری و صفراوی به‌کار می‌رود (۱۷). بنابر مطالب ذکر شده و از آنجایی که گیاه غاغت یک منبع غنی از ترکیبات مفید بوده و دارای اثرات درمانی متعددی می‌باشد و نظر به

(Auto analyzer Selectra- XL - هلند) اندازه‌گیری شد. با انجام لاپاراسکوپي نمونه‌های بافت کبد تهیه و پس از شستشو به وسیله سرم فیزیولوژی بلافاصله در فرمالین ۱۰ درصد جهت فیکس شدن و تهیهی مقاطع بافتی قرار داده شد.

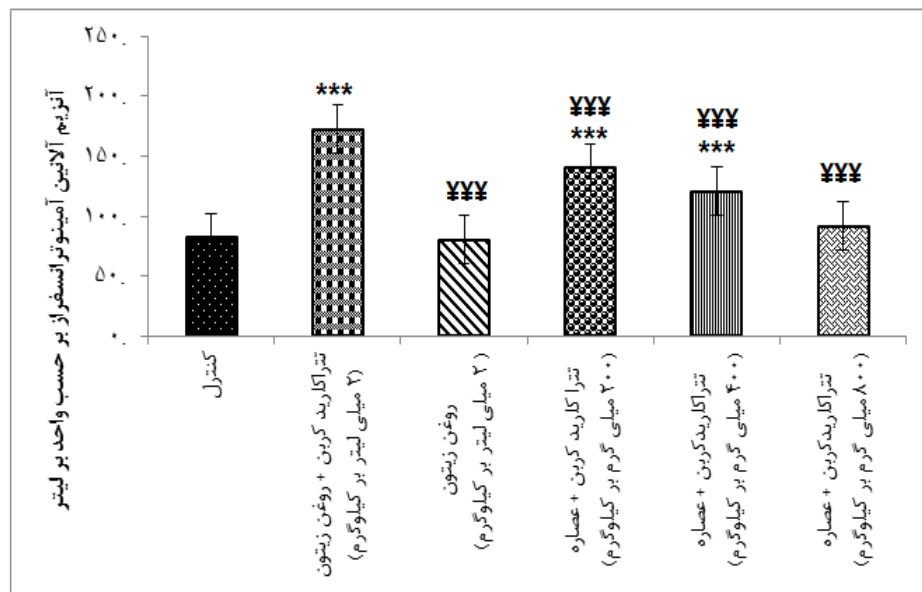
تحلیل آماری: داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه و تحلیل شدند. از آزمون آماری کولموگروف-اسمیرنوف، آزمون آنووا (آنالیز واریانس یک طرفه) و تست تعقیبی توکی برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

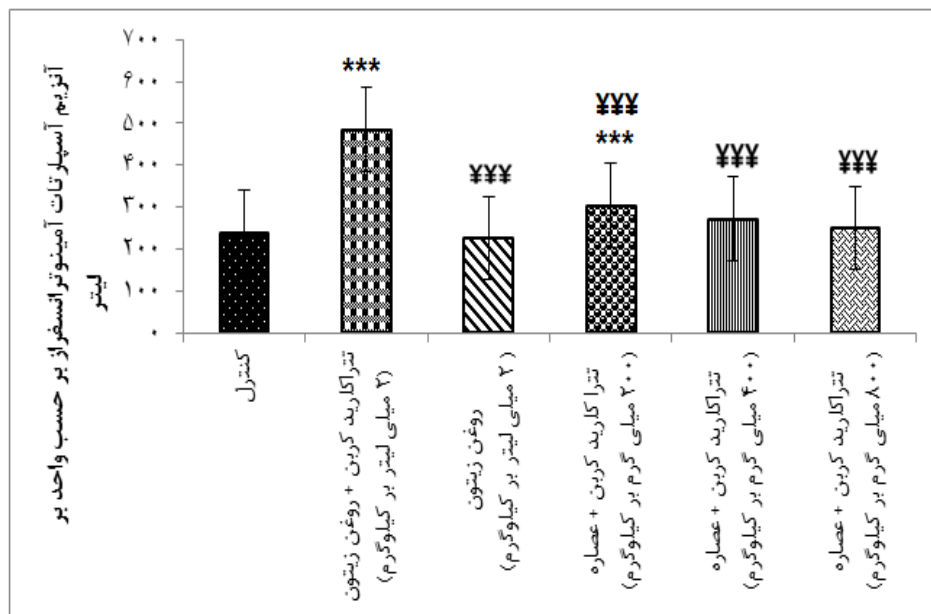
نتایج حاصل از مطالعات نشان داد که تتراکلریدکربن باعث ایجاد سمیت کبدی شدید در موش‌ها گردید و با افزایش معنادار سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی ALT, AST و ALP در مقایسه با گروه کنترل و گروه شم همراه بود ($P < 0/001$). تجویز عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه غافث در هر سه دوز ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش معنی‌دار میزان آنزیم‌های کبدی در مقایسه با گروه دریافت‌کننده CCl_4 شد. بر اساس نتایج این مطالعه تتراکلریدکربن باعث افزایش معنادار سطح سرمی آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در گروه دریافت‌کننده CCl_4 در مقایسه با گروه کنترل و شم گردید ($P < 0/001$), در حالی که درمان با عصاره‌ی هیدروالکلی غافث در هر سه دوز ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش معنادار میزان آنزیم ALT در مقایسه با گروه دریافت‌کننده CCl_4 شد ($P < 0/001$). گروه شم و گروه تیمار سه (دریافت‌کننده عصاره با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اثر معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان ندادند (نمودار ۱).

تمام تزریقات به صورت درون صفاقی انجام شد (۱۸ و ۱۱). عصاره‌گیری گیاه غافث: گیاه غافث با کد هرباریومی ۲۲۲ در گروه فارماکوگنوزی دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی همدان ثبت گردیده است. برگ‌های این گیاه از باغ گیاهان دارویی سازمان جهاد کشاورزی همدان جمع‌آوری شد و توسط کارشناس گیاه شناس آن سازمان شناسایی گردید. سپس فرآیند عصاره‌گیری بر اساس منابع قبلی انجام شد (۱۹).

روش عصاره‌گیری: جهت آماده‌سازی عصاره‌ها، ابتدا برگ‌های گیاه در سایه خشک و توسط آسیاب برقی پودر گردید. برای تهیه‌ی عصاره هیدروالکلی، پودر گیاه در ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد قرار گرفت و به‌منظور ممانعت از اثرات دمای محیط و اختلالات متاثر از آن، به‌مدت یک هفته داخل یخچال نگهداری شد. سپس توسط کاغذ صافی و قیف شیشه‌ای صاف گردید و محلول حاصل در دستگاه روتاری با دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و با دور متوسط ۶۰ دور در دقیقه به‌منظور جداسازی حلال از عصاره قرار گرفت. پس از خروج حلال مایع غلیظ نیمه جامد به دست آمده داخل پلیت شیشه‌ای ریخته شده و به مدت ۴۸ ساعت زیر هود قرار داده شد. بعد از آنکه عصاره کاملاً تغلیظ شد، جهت جلوگیری از ورود هوا در پلیت‌ها بسته شد و تا زمان مصرف در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. انجام آزمایش: عصاره‌ی گیاه غافث در دوزهای مناسب تهیه شد و آزمایشات انجام گرفت. بعد از اتمام آزمایشات در گروه‌های مورد مطالعه، خونگیری مستقیم از قلب انجام شد. سپس نمونه‌های خون تهیه شده جهت تهیه سرم با دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس سطح آنزیم‌های کبدی با روش رنگ سنجی آنزیمی و با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر



نمودار ۱: مقایسه داده‌های حاصل از سنجش آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در گروه‌های مورد آزمون. داده‌ها به صورت $Maen \pm SEM$ ارائه شده‌اند. * معنی‌داری نسبت به گروه کنترل. † بیانگر نسبت به گروه تتراکلرید گرین. ($***: P < 0.001$) ($^{\dagger\dagger\dagger}: P < 0.001$)



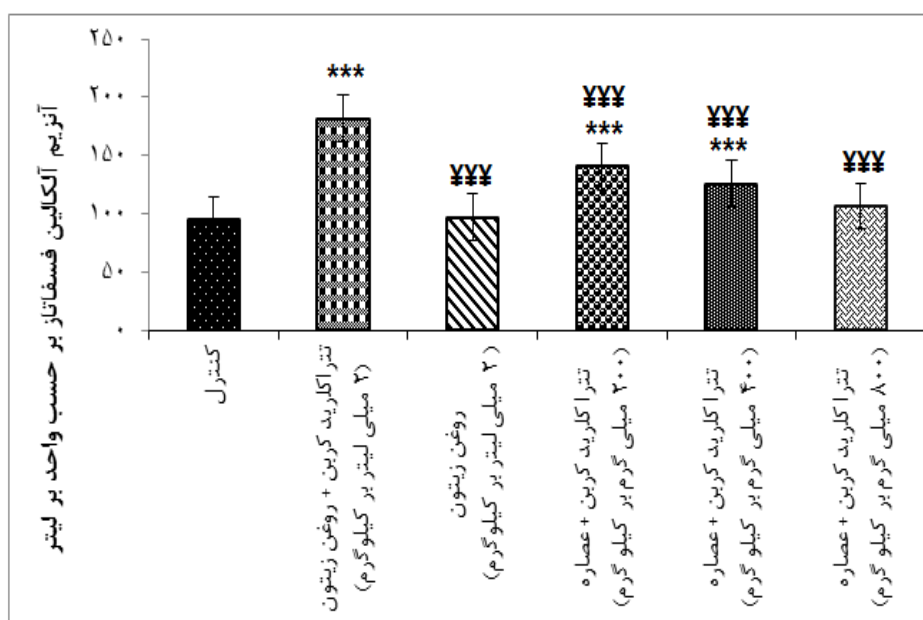
نمودار ۲: مقایسه داده‌های حاصل از سنجش آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز در گروه‌های مورد آزمون. داده‌ها به صورت $Maen \pm SEM$ ارائه شده‌اند. * معنی‌داری نسبت به گروه کنترل. † معنی‌داری نسبت به گروه تتراکلرید گرین. ($***: P < 0.001$) ($^{\dagger\dagger\dagger}: P < 0.001$)

در CCl_4 در مقایسه با گروه کنترل و شم گردید ($P < 0.001$), در حالی که درمان با عصاره هیدروالکلی غاغت در هر سه دوز

تتراکلرید گرین باعث افزایش معنادار سطح سرمی آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز (AST) در گروه دریافت‌کننده

گروه کنترل و شم گردید ($P < 0.001$)، در حالی که درمان با عصاره هیدروالکلی غافث در هر سه دوز ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث کاهش معنادار میزان آنزیم ALP در مقایسه با گروه دریافت کننده CCl_4 شد ($P < 0.001$). گروه شم و گروه تیمار سه (دریافت کننده عصاره با دوز ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) اثر معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان ندادند (نمودار ۳).

۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث کاهش معنادار میزان آنزیم AST در مقایسه با گروه دریافت کننده CCl_4 شد ($P < 0.001$). گروه شم، گروه تیمار دو (دریافت کننده عصاره با دوز ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و تیمار سه (دریافت کننده عصاره با دوز ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) اثر معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان ندادند (نمودار ۲). تراکلریدکربن همچنین باعث افزایش معنادار سطح سرمی آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در گروه دریافت کننده CCl_4 در مقایسه با



نمودار ۳: مقایسه داده‌های حاصل از سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروه‌های مورد آزمون. داده‌ها به صورت $Maen \pm SEM$ ارائه شده اند.

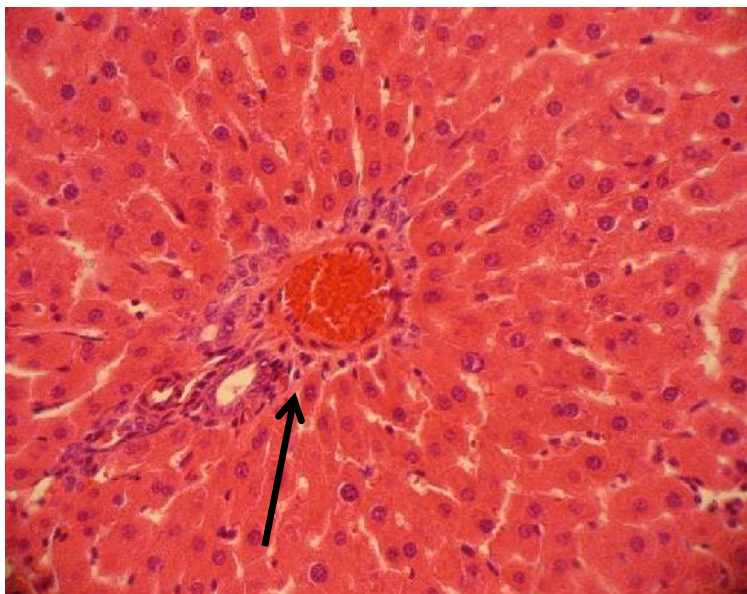
* معنی داری نسبت به گروه کنترل. $^{\Delta}$ معنی داری نسبت به گروه تراکلریدکربن. ($P < 0.001$: ***)($P < 0.001$: ****)

CCl_4 با نسبت ۱:۱ با روغن زیتون دریافت کرده بودند، در مدت کوتاهی سبب آسیب حاد کبدی می‌شود که با نکروز گسترده‌ی هپاتوسیت‌ها (سلول‌های کبدی)، به هم ریختگی نظم طناب‌های سلولی کبدی و داربست سلولی و نشت تعداد قابل توجهی از سلول‌های التهابی از جمله لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها در اطراف ورید مرکزی همراه است (شکل ۳). در گروه تیمار شده با دوز ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی هیدروالکلی غافث، ناحیه‌ی نکروزه به میزان قابل توجهی

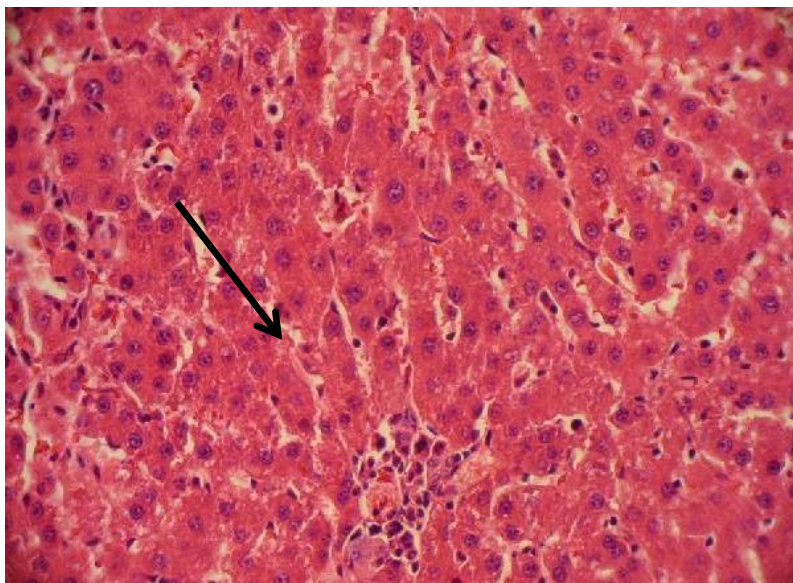
مطالعات بافتی: نمونه‌های بافتی تهیه شده توسط میکروسکوپ نوری (ZEISS, Axioskop 2, mot/plus, Germany) مطالعه شدند. مطالعات بافتی نشان داد در گروه‌های کنترل و شم بافت کبد سلول‌های کبدی کاملاً طبیعی بوده و طناب‌های سلولی به‌طور منظم در اطراف سیاهرگ مرکزی قرار گرفته‌اند. همچنین هیچ نکروزی در سلول‌های کبدی به چشم نمی‌خورد (شکل ۱ و ۲). نتایج این مطالعه نشان داد که در گروه دریافت کننده‌ی تراکلریدکربن که میزان ۲ میلی لیتر بر کیلوگرم

می‌باشد، نکروز و نشت سلول‌های التهابی به میزان بسیار چشمگیری کاهش یافته است و تقریباً مشابه گروه کنترل شده است. این گروه اختلاف معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان ندادند (شکل ۵).

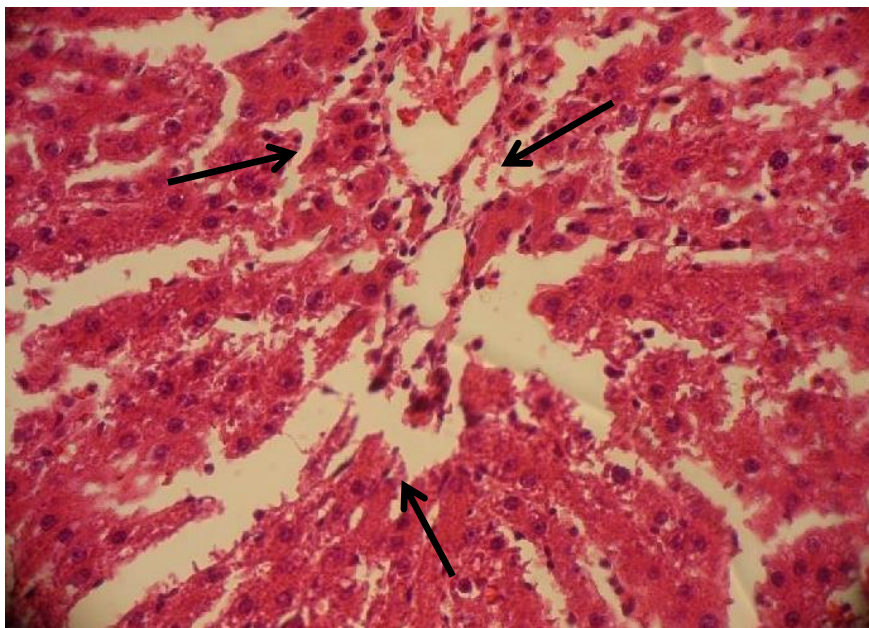
کوچک‌تر شده و نشت سلول‌های التهابی در اطراف سیاهرگ مرکزی تا حدودی کاهش یافته است (شکل ۴). در گروه تیمار شده با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی غافث، ترمیم بافت کبد بسیار بیشتر از دوز ۴۰۰



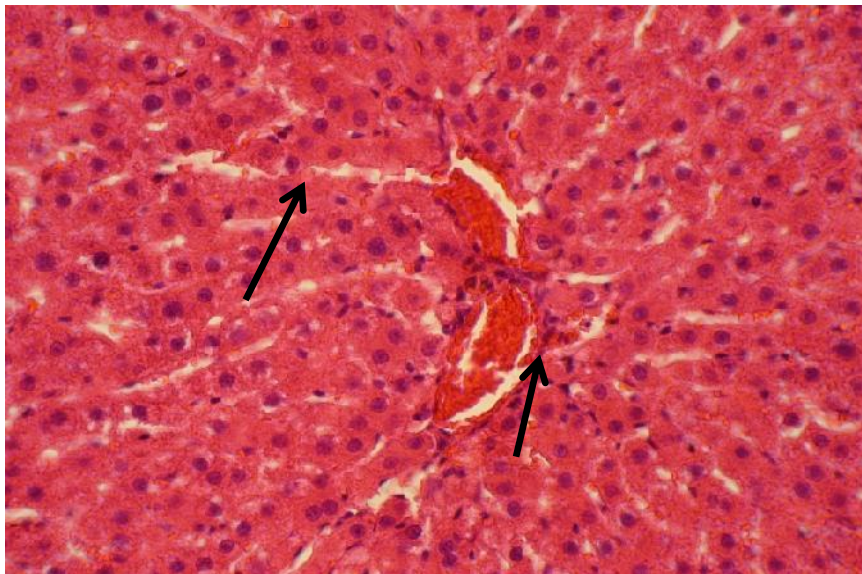
شکل ۱: مقطع بافتی تهیه شده از کبد گروه کنترل. سلول‌های کبدی (هپاتوسیت‌ها) و طناب‌های سلولی لویول‌ها به طور منظم در اطراف سیاهرگ مرکزی قرار گرفته و هیچ نکروزی به چشم نمی‌خورد (پیکان). بزرگنمایی $400\times$ و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین.



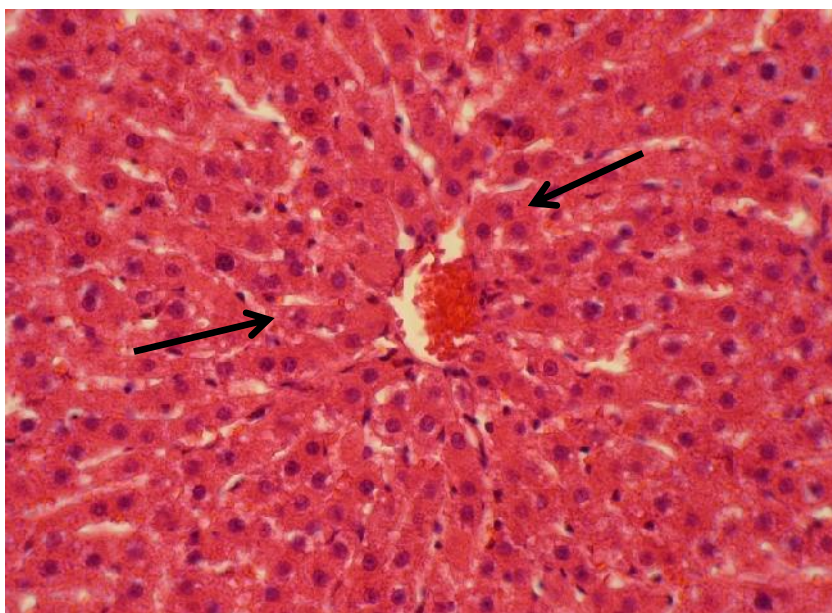
شکل ۲: مقطع بافتی تهیه شده از کبد گروه شم (دریافت‌کننده روغن زیتون به میزان ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم). ساختار هپاتوسیت‌ها کاملاً سالم بوده و هیچگونه اختلالی در سلول‌ها و نظم آن‌ها اتفاق نیفتاده است (پیکان). بزرگنمایی $400\times$ و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین.



شکل ۳: مقطع بافتی تهیه شده از کبد گروه دریافت کننده تتراکلرید کربن (دریافت کننده CCl_4 به میزان ۲ میلی لیتر بر کیلوگرم با نسبت ۱:۱ با روغن زیتون به مدت ۹۶ ساعت). نکروز و واکوئل دار شدن هپاتوسیت‌ها، به هم ریختگی طناب‌های سلولی کبدی و التهاب در اطراف سیاهرگ مرکزی را نشان می‌دهد (پیکان‌ها). بزرگنمایی $400\times$ و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین.



شکل ۴: مقطع بافتی تهیه شده از کبد گروه تیمار شده با دوز 400 میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی غافث. میزان نکروز هپاتوسیت‌ها تا حدودی کاهش یافته و ناحیه نکروزه کوچک‌تر شده است. نشت سلول‌های التهابی در اطراف ورید مرکزی کاهش یافته است (پیکان‌ها). بزرگنمایی $400\times$ و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین.



شکل ۵: مقطع بافتی تهیه شده از کبد گروه تیمار شده با دوز ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی غافث. نکروز به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته است. نشت سلول‌های التهابی در اطراف ورید مرکزی به میزان زیادی کاهش یافته است. طناب‌های سلولی کبدی به صورت منظم درآمده‌اند و داربست سلولی مجدداً بازسازی شده است (پیکان‌ها). بزرگنمایی ۴۰۰x و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین.

بحث

این بررسی به منظور مطالعه اثرات محافظتی عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه غافث بر بافت کبد و میزان آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی نر القا شده با تتراکلرید کربن انجام گرفت. گروه شم هیچگونه تفاوت معناداری را با گروه کنترل نشان نداده و بیان کننده‌ی آن است که روغن زیتون فاقد اثر بر بافت کبد و میزان آنزیم‌های کبدی می‌باشد و هر گونه تغییر در بافت کبد در گروه دریافت کننده‌ی تتراکلرید کربن که میزان ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم CCl₄ را به نسبت ۱:۱ با روغن زیتون دریافت کردند تنها ناشی از اثرات تتراکلرید کربن است. نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق تتراکلرید کربن باعث افزایش میزان آنزیم‌های کبدی AST, ALT و ALP می‌گردد. مطالعات بافتی حاکی از نکروز حاد سلول‌های کبدی، به هم ریختگی نظم طناب‌های سلولی کبدی و

داربست سلولی و همچنین ارتشاح سلول‌های التهابی در اطراف ورید مرکزی و ایجاد التهاب در بافت کبد بود. این اثرات، اثبات کننده اثر تخریبی تتراکلرید کربن بر بافت کبد می‌باشد. همچنین بر اساس نتایج به دست آمده عصاره هیدروالکلی برگ گیاه غافث به صورت وابسته به دوز بر بافت کبد و میزان آنزیم‌های کبدی موثر می‌باشد. درمان با عصاره غافث توانست میزان آنزیم‌های کبدی را کاهش دهد و باعث کاهش نکروز سلول‌های کبدی، بازسازی مجدد داربست سلولی و کاهش التهاب اطراف ورید مرکزی گردد. ابراهیمی و همکاران در پژوهشی نشان دادند که تتراکلرید کربن، توسط آنزیم‌های سیتوکروم P450 متابولیزه شده و منجر به تولید رادیکال‌های آزاد بسیار فعالی می‌گردد. این رادیکال‌های آزاد در کبد به پروتئین‌ها یا لیپیدهای غشا متصل شده و باعث پراکسیداسیون لیپیدی در غشا می‌گردد که

در پژوهشی دیگر حسن رحمانی و همکاران نشان دادند عصاره هیدروالکلی عدس قرمز توانست از کبد در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از تتراکلریدکربن محافظت نماید که این اثر را به ترکیب‌های فلاونوئیدی موجود در آن نسبت داده‌اند (۲۴). فلاونوئیدها دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قوی بوده که یکی از فعالیت‌های آن‌ها به دام‌انداختن و حذف رادیکال‌های آزاد می‌باشد. خاصیت آنتی اکسیدانی آن‌ها به دلیل وجود گروه‌های هیدروکسیل و فنولی در ساختمان آن‌ها است (۲۵). در مطالعه‌ی حاضر عصاره‌ی هیدروالکلی غافث باعث کاهش میزان آنزیم‌های کبدی شد که با توجه به تحقیقات گذشته و وجود ترکیبات آنتی اکسیدانی مشابه در گیاه غافث، این اثر احتمالاً مربوط به فلاونوئیدهای موجود در عصاره می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر نشان داده شد که تتراکلریدکربن سبب آسیب حاد کبدی می‌شود که با نکرز گسترده هپاتوسیت‌ها، به هم ریختگی نظم طناب‌های سلولی کبدی و ارتشاح تعداد قابل توجهی از سلول‌های التهابی از جمله لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها در اطراف ورید مرکزی کبد همراه است و همچنین میزان آنزیم‌های کبدی AST , ALT و ALP را در خون افزایش می‌دهد. از آنجایی که در تحقیقات گذشته نشان داده شده است که آنتی اکسیدان‌ها قادرند با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و نکرز هپاتوسیت‌ها، کبد را در مقابل آسیب اکسیداتیو محافظت کنند و گیاه غافث نیز دارای ترکیبات آنتی اکسیدانی مانند ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها می‌باشد (۱۵)، تصور می‌شود علت کاهش نکرز هپاتوسیت‌ها ترکیب‌های آنتی اکسیدانی موجود در عصاره‌ی گیاه غافث باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تتراکلریدکربن میزان آنزیم‌های کبدی را افزایش داده و باعث ایجاد التهاب در بافت کبد گردید، در حالی که درمان با عصاره‌ی هیدروالکلی برگ

تخریب غشا را در پی دارد. اختلال در یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول‌های کبدی باعث می‌شود، آنزیم‌های کبدی که به‌طور طبیعی در داخل سیتوزول قرار دارند، وارد جریان خون شده و میزان این آنزیم‌ها در خون افزایش یابد که بهترین شاخص برای مطالعه وضعیت کبدی می‌باشد (۲۰). در مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داده شد که تتراکلرید کربن باعث افزایش میزان آنزیم‌های کبدی و تخریب بافت کبد می‌گردد که با نتایج سایر محققین مطابقت دارد.

به نظر می‌رسد که استفاده از آنتی اکسیدان‌ها بتواند در ختنی کردن رادیکال‌های آزاد و کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از آن‌ها موثر باشد. یون و همکاران در پژوهشی نشان دادند عصاره‌ی آبی گیاه غافث دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی بوده و در درمان بیماری‌های التهابی مانند خونریزی روده، بیماری‌های دستگاه ادراری و بیماری‌های کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در پژوهش یون نشان داده شد که عصاره‌ی آبی غافث با به دام انداختن رادیکال‌های آزاد ناشی از الک، باعث کاهش میزان آنزیم‌های کبدی و التهاب بافت کبد گردید که این اثر را به ترکیب‌های پلی فنولی موجود در این گیاه نسبت داده‌اند (۲۱). ترکیب‌های فنولی دارای خواص آنتی اکسیدانی قوی بوده و اغلب در برابر رادیکال‌های آزاد مضر، از بدن محافظت می‌کنند (۲۲). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که یک رابطه‌ی مثبت بین ترکیب‌های فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی در بسیاری از گونه‌های گیاهی وجود دارد. توانایی به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد توسط ترکیب‌های فنولی، به دلیل گروه هیدروکسیل و خاصیت احیاکنندگی آن‌هاست (۲۳). در مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داده شد که عصاره‌ی هیدروالکلی برگ غافث توانست موجب کاهش میزان آنزیم‌های کبدی و التهاب بافت کبد گردد که با توجه به تحقیقات گذشته در مورد عصاره‌ی غافث، احتمالاً این اثر مربوط به ترکیب‌های فنولی موجود در آن می‌باشد.

شدن مکانیسم اثر تراکلریدکربن در کبد انجام گردد. همچنین از آنجایی که جداسازی ترکیب‌های مختلف گیاه غافث و استفاده از این ترکیب‌ها به‌طور جداگانه، می‌تواند سهم هر یک از آن‌ها را در بهبود سمیت کبدی بهتر مشخص کند، لذا جهت بررسی کامل‌تر اثرات برگ غافث بر بافت کبد، پیشنهاد می‌شود مطالعات علمی و بالینی بیشتری جهت مشخص شدن مکانیسم و اثرات واقعی درمان با غافث به عمل آید تا نتایج قابل قبول‌تری در این خصوص ارائه شود.

تقدیر و تشکر

در پایان لازم می‌دانیم از زحمات بی‌دریغ آقای رامتین پاکزاد، کارشناس ارشد فیزیولوژی گیاهی و خانم مژگان قبادی پور دکترای فیزیولوژی جانوری که در تهیه‌ی عصاره غافث، یاریگر ما بودند و همچنین پرسنل آزمایشگاه تحقیقات فیزیولوژی جانوری دانشگاه بوعلی سینا که ما را در این پروژه یاری نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی نماییم.

References

- 1- Jamali R, Jamali A. Non-alcoholic fatty liver disease. *Feyz*. 2010; 14: 169-81.
- 2- Terohid SF, Mirazi N, Sarihi A. Study of hepatoprotective effect of *Malva neglecta* L. hydroethanolic leaf extract in male rat induced with carbon tetrachloride. *J Cell & Tissue*. 2015; 6: 31-42.
- 3- Taghikhani A, Ansarisamani R, Afrogh H, et al. The hepatotoxic and nephrotoxic effects of *Stachys lavandulifolia* Vahl in rat. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2012; 22: 84-90.

غافث توانست با کاهش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی، در بهبود سمیت کبدی ناشی از تراکلریدکربن موثر باشد. این اثرات ممکن است به برخی از ترکیب‌های موجود در این گیاه از جمله مواد آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی مربوط باشد. هر چند ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاهان بسیار متنوع می‌باشند، اما از آنجایی که ترکیب‌هایی نظیر پلی فنول‌ها و فلاونوئیدهای موجود در عصاره‌ی این گیاه، در بسیاری از گونه‌های دیگر گیاهان دارویی نیز وجود داشته و اثربخشی خود را در کاهش آنزیم‌های کبدی و سمیت کبدی ناشی از تراکلریدکربن به اثبات رسانیده‌اند، لذا تصور می‌شود که بیشترین خاصیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی گیاه غافث نیز مربوط به وجود این ترکیبات باشد. از آنجایی که اندازه‌گیری سطوح آنتی‌اکسیدانی کبد و میزان اکسیدان‌های (ROS) تولید شده توسط تراکلریدکربن که استرس اکسیداتیو ایجاد کرده و باعث آسیب کبدی می‌شود، مکانیسم اثر تراکلریدکربن در ایجاد مسمومیت کبدی را بیشتر مشخص می‌کند، لذا پیشنهاد می‌شود بررسی‌های بیشتری در این خصوص جهت مشخص

- 4- Ahmadi Zadeh M, Amir Gholami F. Effects of cimetidine on CCl₄-induced hepatotoxicity. *Jundishapur Sci Med J*. 2010; 2: 1-8.
- 5- Gangarapu V, Gujjala S, Korivi R, Pala I. Combined effect of curcumin and vitamin E against CCl₄ induced liver injury in rats. *Am J Life Sci*. 2013; 1: 117-124.
- 6- Onuoha SC, Chinaka NC. Carbon tetrachloride induced renal toxicity and the effect of aqueous extract of *Gongronema latifolium* in Wistar albino rats. *Drug discovery*. 2013; 4: 15-16.
- 7- Mochizuki M, Shimizu S, Urasoko Y, et al. Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in

- pregnant and lactating rats. *J Toxicol Sci.* 2009; 34: 175-181.
- 8- Kamalakkannan N, Rukkumani R, Aruna K, Varma PS, Viswanathan P, Menon VP. Protective effect of N-acetyl cysteine in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Iranian J Pharmacol Ther.* 2005; 4: 118-123.
- 9- Kuriakose GC, Kurup GM. Antioxidant activity of *Aulosira fertilisima* on CCl₄ induced hepatotoxicity in rats. *Indian J Exp Biol.* 2008; 46: 52-59.
- 10- Roozbehi S, Razmi N, Akbartabar Touri M, Sadeghi H. Hepatoprotective effects of *Bupleurum exalatum* extracts against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Armaghane-danesh.* 2015; 19: 1069-1081.
- 11- Mirazii N, Gholami M. Study of protective effect of *Avicennia marina* leaf hydroalcoholic extract on bone marrow tissue in male rate induced with CCl₄. *Arak Univ Med J.* 2016; 19: 88-98.
- 12- Ad'hiah AH, Al-Bederi ONH, Al-Sammarrae KW. Cytotoxic effects of *Agrimonia eupatoria* L. against cancer cell lines in vitro. *J Assoc Arab Univ Basic Appl Sci.* 2013; 14: 87-92.
- 13- Rechinger KH. Flora Iranica. Akademische Druck-u Verlagsanstalt, Graz. 1969; 148-152.
- 14- Ivanova D, Tasinov O, Vankova D, Kiselova-Kaneva Y. Antioxidative potential of *Agrimonia eupatoria* L. *Sci Technol.* 2011; 1: 20-24.
- 15- Correia HS, Batista MT, Dinis TC. The activity of an extract and fraction of *Agrimonia eupatoria* L. against reactive species. *Biofactors.* 2007; 29: 91-104.
- 16- Mirjana Z, Muruzovic KG, Mladenovic OD, Stefanovic SM, Vasic LR. Extracts of *Agrimonia eupatoria* L. as sources of biologically active compounds and evaluation of their antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm activities. *J Food Drug Anal.* 2016; 24: 539-47.
- 17- Najafpour Navaei M, Golipour M, Parsa E. The effects of densities and planting dates on seed yield of *Agrimonia eupatoria* L. *Iran J Med Aromat Plant.* 2008; 24: 198-206.
- 18- Mirazi N, Movassagh SN, Rafieian-Kopaei M. The protective effect of hydro-alcoholic extract of mangrove (*Avicennia marina* L.) leaves on kidney injury induced by carbon tetrachloride in male rats. *J Nephrothol.* 2016; 5: 118-122.
- 19- Masjedi MS, Keyhanfar M, Behbahani M. In vitro evaluation of methanol extract of *Agrimonia eupatoria* on PBMC and 12 Pathogenic Bacteria. *J Med Plant.* 2017; 1: 167-73.
- 20- Ebrahimi S, Sadeghi H, Pourmahmoudi A, Askariyan SH, Askari S. Protective effect of *Zizphus Vulgaris* extract, on liver toxicity in laboratory rats. *Yasuj Univ Med Sci.* 2010; 16: 172-80.
- 21- Yoon SJ, Koh EJ, Kim CS, et al. *Agrimonia eupatoria* protects against chronic ethanol-induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50: 2335-41.
- 22- Erasto P, Grierson DS, Afolayan AJ. Evaluation of antioxidant activity and the fatty acid profile of the leaves of *Vernonia amygdalina*

growing in South Africa. *Food Chem.* 2007; 104: 636-642.

23- Kaledaite R, Bernatoniene J, Majiene D, et al. Investigation of antiradical activity of *Salvia officinalis L*, *Urticadioica L*, *Thymus vulgaris L*. extracts as potential candidates for a complex therapeutic preparation. *J Med Plant Res.* 2011; 5: 6090-96.

24- Rahmani AH, Goudarzi M, Rashidi Nooshabadi MR, Houshmand Gh, Khadem

Haghighian H. Protective effect of red Lentil (*Lens Culinaris*) extract against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *J Babol Univ Med Sci.* 2014; 16: 49-55.

25- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med.* 1996; 20: 933-56.

The Effect of *Agrimonia eupatoria* Leaf Hydroalcoholic Extract on Carbon Tetrachloride Induced Liver Toxicity in Male Rats

Khazaei M¹, Mirazi N¹

¹Dept. of Biology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Corresponding Author: Khazaei M, Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran

E-mail: maryam.khazaei133@yahoo.com

Received: 17 Apr 2017 **Accepted:** 2 July 2017

Background and Objective: Carbon tetrachloride (CCl₄) is a toxic agent leading to hepatotoxicity. The aim of this study was to investigate the effect of *Agrimonia eupatoria* leaf hydroalcoholic extract (AEE) on carbon tetrachloride induced rat liver.

Materials and Methods: In this study, 42 male rats were randomly allocated to 6 groups: the control group receiving normal saline, 2ml/kg, ip and the sham group receiving olive oil, 2ml/kg, ip, the CCl₄ induced group receiving carbon tetrachloride/olive oil (1:1), 2ml/kg, single dose, ip. The treated groups (1, 2 and 3) were induced by carbon tetrachloride 1:1 with olive oil, 2ml/kg, single dose, ip and after two hours underwent treatment by 200 mg/kg, 400 mg/kg and 800 mg/kg AEE/day for 96 hrs, ip. Then, the blood samples were collected from their heart directly and subsequently serum levels of the liver enzymes were measured. The microscopic studies of liver tissue were performed. The data were analyzed with ANOVA and Tukey tests.

Results: The results of this study showed that the serum levels of liver enzymes significantly increased in the group receiving CCl₄ compared to the control group. Meanwhile, treatment by AEE significantly decreased the serum levels of liver enzymes in treated groups compared to the group receiving CCl₄ (P<0.001). Histological study revealed necrosis and inflammation in the liver tissue in CCl₄ group and reduction in necrotic cells and inflammation in AEE treated group.

Conclusion: Carbon tetrachloride can bring about necrosis and inflammation effects on the liver tissue. AEE can decrease toxic effects of carbon tetrachloride in the liver tissue by reducing the serum levels of liver enzymes.

Keywords: *Agrimonia eupatoria* L., liver toxicity, Carbon tetrachloride, liver enzymes, Rats