

اثر عصاره‌ی هیدروالکلی زرین گیاه بر فیروز کبدی ناشی از تتراکلرید کربن در رت‌های نر بالغ

محمد اتابک^۱، علی حسینی شریف آباد^۲، حسن صدراپی^۳، عادل محمدعلی پور^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بیماری‌های کبدی، در نهایت منجر به فیروز می‌شوند که نوعی کلاژنه شدن بافت است. زرین گیاه، از گیاهانی است که ترکیبات آن خاصیت ضد التهابی و ضد فیروزی قوی دارند. با توجه به ماهیت التهابی فیروز، هدف این مطالعه، بررسی اثر دوزهای مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی زرین گیاه بر فیروز کبدی ناشی از تتراکلرید کربن بود.

روش‌ها: عصاره‌ی زرین گیاه با روش ماسراسیون توسط الکل ۷۰ درصد تهیه شد. گروه‌های ۶ تایی رت‌های نر بالغ شامل بدون ماده، شاهد، تتراکلرید کربن، ویتامین E و گروه‌های عصاره به همراه تتراکلرید کربن بود. عصاره‌ی زرین گیاه با دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گاواژ و تتراکلرید کربن رقیق شده در روغن زیتون (۱ به ۱) به میزان ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به شکل داخل صفاقی تزریق شد. طول دوره‌ی درمان ۱ ماه بود و پس از آن خون‌گیری و جداسازی کبد رت‌ها جهت بررسی بیوشیمیایی و پاتولوژی انجام گرفت.

یافته‌ها: تجویز زرین گیاه به مدت ۱ ماه، سطح آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP (Alkaline phosphatase)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST (Aspartate Aminotransferase) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT (Alanine Aminotransferase) را در مقایسه با گروه تتراکلرید کربن به صورت معنی‌داری کاهش داد ($P < 0/001$) و همچنین باعث بهبود معنی‌داری در آسیب‌های پاتولوژیک ناشی از تتراکلرید کربن شد.

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر کاهش معنی‌داری را در میزان فیروز کبدی ناشی از تتراکلرید کربن در نمونه‌های پاتولوژی دریافت‌کننده‌ی عصاره‌ی زرین گیاه نشان داد. علاوه بر این، با افزایش میزان دوز زرین گیاه، کاهش آنزیم‌های کبدی به طور قابل توجهی دیده شد. اثر زرین گیاه در بهبود فیروز در دوزهای بالاتر نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

واژگان کلیدی: تتراکلرید کربن؛ فیروز؛ زرین گیاه؛ کبد؛ نکروز کبدی

ارجاع: اتابک محمد، حسینی شریف آباد علی، صدراپی حسن، محمدعلی پور عادل. اثر عصاره‌ی هیدروالکلی زرین گیاه بر فیروز کبدی ناشی از

تتراکلرید کربن در رت‌های نر بالغ. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۷۲): ۳۴۲-۳۵۶

نسبتاً کوتاه بازسازی کند. در مقابل، آسیب مزمن کبدی، باعث اختلال در ظرفیت احیای کبدی شده و در نهایت منجر به فیروز می‌گردد (۲، ۳).

بهترین راه برای درمان فیروز کبدی، برطرف کردن علت اصلی بیماری است. روش‌های درمانی مختلفی برای تجویز وجود دارد. که برخی از آن‌ها شامل این موارد می‌شود: قطع مصرف مشروبات الکلی و استفاده از روش‌های حمایتی برای کمک به ترک اعتیاد به الکل،

مقدمه

کبد، یکی از اعضای مهم بدن است که وظایف مهمی از جمله سوخت و ساز بدن، متابولیسم داروها و غیره را بر عهده دارد (۱). یکی از بیماری‌های کبد، فیروز کبدی است و زمانی رخ می‌دهد که بافت سالم کبد فرد دچار جراحت و زخم شود که می‌تواند به خاطر تجمع بیش از حد پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن باشد. پس از آسیب حاد، کبد می‌تواند توده‌ی کامل و ساختار اصلی را در یک بازه‌ی زمانی

۱- دانشجوی داروسازی، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: علی حسینی شریف آباد؛ دانشیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
Email: hosseini_a@pharm.mui.ac.ir

روش‌ها

تهیه‌ی عصاره زین گیاه: اندام هوایی زین گیاه در فصل گلدهی از مزرعه‌ی شرکت کشت پرتیکان (واقع در شاهان کوه روستای ایوانک فریدونشهر) جمع‌آوری و در سایه خشک و آسیاب می‌گردد. عصاره‌گیری با روش ماسراسیون اتانول ۷۰ درصد انجام می‌شود. فرایند عصاره‌گیری سه بار تکرار و عصاره‌ی هیدروالکلی حاصله توسط دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه تغلیظ می‌گردد. عصاره‌ی تغلیظ شده از نظر میزان عصاره‌ی خشک، تعیین مقدار می‌گردد. برای تعیین میزان عصاره‌ی خشک ابتدا مقدار مشخصی از عصاره، وزن و بر روی شیشه‌ی ساعت قرار داده و به مدت ۱۵ دقیقه در آن قرار می‌گیرد. مجدداً عصاره، توزین شده و این کار ۳ بار تکرار می‌شود و در آخر، عصاره‌ی خشک شده وزن می‌گردد و بدین صورت میزان عصاره‌ی خشک به دست می‌آید (۱۴). برای تهیه‌ی دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه (۱۴) ابتدا یک استوک به غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر از عصاره تهیه می‌کنیم و طبق فرمول زیر سایر دوزها را به دست می‌آوریم.

$$\text{Dose} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{v(\text{ml}) \times c \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}{w(\text{kg})}$$

V = حجم مورد نیاز برای تهیه‌ی هر دوز.

C = غلظت استوک.

W = وزن هر رات.

حیوانات مورد مطالعه: ۴۸ سر رت نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم از لانه‌ی حیوانات دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه شدند. حیوانات قبل و حین آزمایش، به آب و غذای طبیعی دسترسی آزاد داشتند. آن‌ها در شرایط محیطی استاندارد از نظر دما و رطوبت و تحت چرخه‌ی تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. تمام مراحل آزمایش در مرحله‌ی روشن چرخه انجام شد. با حیوانات بر اساس پروتکل مصوب کمیته‌ی اخلاق در پژوهش‌های زیستی با کد (IR.MUI.RESEARCH.REC.1400.010) رفتار شد.

مواد مورد استفاده: در این مطالعه از تتراکلرید کربن (Merck, Germany) و آمپول ویتامین E (داروسازی اسوه، ایران) استفاده شد. از نرمال سالین به عنوان حامل برای عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه و از روغن زیتون به عنوان حامل تتراکلرید کربن استفاده شد. **روش انجام آزمایش:** حیوانات به طور تصادفی به ۸ گروه و هر گروه شامل ۶ رت بر اساس فهرست زیر تقسیم شدند:

گروه شم (Sham): ماده‌ی خاصی دریافت نکردند و فقط فرایندهای گاوآژ و تزریق روی آن‌ها اجرا شد.

گروه شاهد (Control): روزانه ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم از

درمان هپاتیت ویروسی به کمک داروهای ضد ویروس، درمان کبد چرب غیرالکلی و استئوپاتیت غیرالکلی با اصلاح شیوه‌ی زندگی و رفع انسداد مجاری صفراوی (۴).

اثر بخشی زین گیاه در بیماری‌های مختلف از جمله فیروز قابل توجه بوده است. زین گیاه با نام علمی *Dracocephalum kotschy Boiss* و از خانواده‌ی *Dracocephalum* یک گیاه چمنی چند ساله است که گونه‌های متنوع آن به طور گسترده در سراسر جهان و به ویژه در کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری یافت می‌شود (۵). نمونه‌ی هرباریوم آن با شماره‌ی ۱۵۱۹ در محل دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان نگهداری می‌شود. چندین گزارش منشأ آن را به آسیا (هندوچین، اندونزی و مالزی)، آفریقا و قاره‌ی آمریکا پیوند داده‌اند. این گیاه می‌تواند تا ۶ اینچ بلندی رشد کند و ساقه‌های آن مانند پیازچه از برگ‌های غلاف‌دار ورقه‌ای و ورقه‌ای بدون لبه با پایه‌ی باریک و رأس حاد تشکیل شده است. طول برگ، حدود ۱۰۰ سانتی‌متر و ۲ سانتی‌متر عرض دارد. هنگام فشرده شدن، برگ‌های زرد یا کهربایی معطر، اسانس تولید می‌کنند (۶). ترکیبات تشکیل دهنده‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی استخراج شده از زین گیاه شامل آپیزین، اولئانولیک اسید، لوتولین، گلوکوپیرانوزاید، رزماریتیک اسید و غیره است (۷). به طور سنتی، جای تهیه شده از برگ‌های گیاه در میان کشورهای آمریکای جنوبی و آسیا محبوب است که به عنوان اثرات ضد عفونی کننده، ضد تب و ضد التهاب مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸، ۹). پژوهش‌های مختلفی انجام شده است که مشخص می‌کند آنتی‌اکسیدان‌ها در مهار فیروژنز مؤثر هستند (۱۰، ۱۱). در بین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، پلی‌فنول‌ها می‌توانند با مهار پیشرفت واکنش‌های اکسیداتیو، آسیب سلولی را مهار کنند (۱۲).

یکی از این گیاهانی که حاوی عناصر پلی‌فنولی می‌باشد، زین گیاه است. زین گیاه از گیاهان اندمیک ایران است (۱۳). در مطالعه‌ای که در گذشته انجام شد، نشان داد که دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره‌ی هیدروالکلی و آبکی زین گیاه باعث کاهش قابل توجه فیروز ریوی و آسیب‌های ریوی ناشی از بلنومایسین در رات می‌شود (۱۴).

با توجه به ماهیت التهابی فیروز کبدی و نظر به ویژگی‌های شناخته شده‌ی زین گیاه، تاکنون مطالعه‌ای که به بررسی تأثیر دوزهای مختلف آن بر این اختلال پرداخته باشد وجود ندارد. بنابراین این مطالعه به بررسی اثر دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم زین گیاه بر فیروز کبدی ناشی از تتراکلرید کربن در رات، از طریق بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی و پاتولوژی پرداخته است.

صورت زیر نمره‌بندی (Scoring) شد: ۰- بدون فیروز؛ ۱- گسترش بافت فیروز به برخی از نواحی پورتال همراه با یا بدون سپتوم‌های کوتاه فیروز؛ ۲- گسترش بافت فیروز به تعداد زیادی از نواحی پورتال همراه با یا بدون سپتوم‌های کوتاه فیروز؛ ۳- گسترش بافت فیروز به تعداد زیادی از نواحی پورتال همراه با ایجاد پل‌های فیروزه بین نواحی پورتال به صورت محدود؛ ۴- گسترش بافت فیروز به تعداد زیادی از نواحی پورتال همراه با ایجاد پل‌های فیروزه کاملاً مشخص بین نواحی پورتال و همچنین نواحی پورتال به سترال؛ ۵- پل‌های فیروزه مشخص بین نواحی پورتال و نواحی پورتال به سترال همراه با ایجاد ندول به صورت محدود؛ ۶- سیروز ناقص و ۷- سیروز.

ارزیابی بیوشیمیایی: مطالعات بیوشیمیایی در این مطالعه شامل تعیین مقدار سرمی آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP (Alkaline phosphatase)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST (Aspartate Aminotransferase) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT (Alanine Aminotransferase) می‌باشد. هر کدام از این فاکتورها با کیت‌های مخصوص و بر اساس دستورالعمل‌های هر کیت اندازه‌گیری شدند.

نتایج به صورت میانگین \pm انحراف از میانگین گزارش شد. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار Graphpad Prism و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و یا دوطرفه انجام گردید. جهت مقایسه آماری نتایج گروه‌های مختلف پس از آزمون یک‌طرفه‌ی ANOVA از تست تعقیبی Tukey استفاده شد. اختلاف با P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر تجویز تراکلرید کربن بر شاخص‌های بیوشیمیایی و آسیب بافتی کبد رت‌ها: تجویز تراکلرید کربن در گروه تراکلرید کربن منجر به افزایش قابل توجه در میزان آنزیم‌های ALT، AST و ALP در رت‌ها نسبت به گروه شاهد شد ($P < 0/001$) (شکل ۱، ۲ و ۳). از نظر ارتشاح التهابی، فیروز و نکروز در بافت کبد، در حیوانات گروه تراکلرید کربن فیروز و التهاب شدید و همچنین نکروز لقمه‌ای شدید، تشکیل ندول‌های کوچک سیروز و جداسازی لوب‌های بافت کبد دیده شد در حالی که گروه‌های شم و شاهد از این نظر کاملاً سالم و نرمال بودند (شکل ۴ و جدول ۱).

اثر دوزهای مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه بر میزان آنزیم‌های کبیدی رت‌های دچار فیروز کبیدی با تراکلرید کربن: تجویز عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه به صورت گاواژ در دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱ ماه باعث کاهش

نرمال‌سالیین به صورت گاواژ به مدت ۱ ماه و ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم روغن زیتون به صورت تزریق زیر پوستی هفته‌ای ۲ مرتبه و به مدت ۱ ماه دریافت کردند.

گروه تراکلرید کربن: گروه دریافت‌کننده‌ی تراکلرید کربن و روغن زیتون به نسبت ۱ به ۱ و به میزان ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به صورت تزریق زیر پوستی هفته‌ای ۲ مرتبه و به مدت ۱ ماه (۱۵، ۱۶). گروه‌های دوز ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه به همراه تراکلرید کربن: در این گروه‌ها، حیوانات به ترتیب به شکل روزانه به مدت ۱ ماه دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه را به صورت خوراکی دریافت نموده و همزمان تراکلرید کربن را به شکلی که در گروه تراکلرید کربن اشاره شد، دریافت کردند.

گروه دوز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره: دریافت‌کننده‌ی دوز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره‌ی زین گیاه به شکل روزانه و به مدت ۱ ماه به صورت گاواژ.

گروه ویتامین E: دریافت‌کننده‌ی تراکلرید کربن به شکلی که در گروه تراکلرید کربن اشاره شد و ویتامین E به شکل روزانه به مدت ۱ ماه به صورت خوراکی.

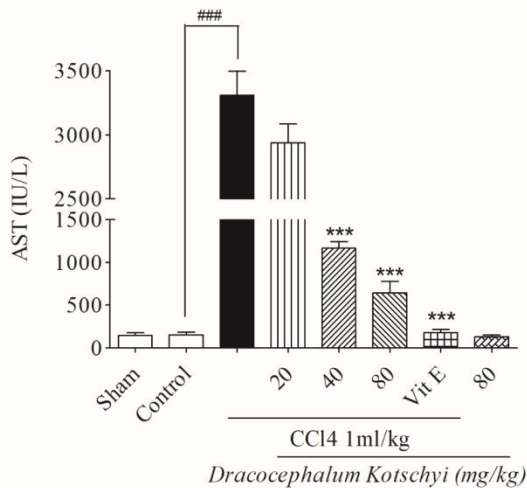
پس از ۱ ماه، از تمامی رت‌ها نمونه‌گیری خون به عمل آمد. نمونه‌ی خون در لوله‌های بدون ماده‌ی ضد انعقاد ریخته شد، سپس سانتریفیوژ شده و سرم تهیه شده در ظرف‌های مخصوص در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان تعیین سطح فاکتورهای بیوشیمیایی نگهداری گردید. پس از خون‌گیری، بافت کبد جداسازی و پس از شستشو با نرمال‌سالیین در فرمالین ۱۰ درصد جهت بررسی‌های پاتولوژیک نگهداری شدند.

ارزیابی پاتولوژی: در مطالعات پاتولوژیک پس از رنگ‌آمیزی‌های عمومی و احیاناً اختصاصی بافت‌های مذکور، این بافت‌ها از نظر التهاب، فیروز و نکروز بررسی و به صورت نیمه کمی با درجه‌بندی استاندارد باهم مقایسه شدند. شدت آسیب با استفاده از امتیازبندی تعیین و امتیازات هر گروه باهم مقایسه شدند. نحوه‌ی امتیازدهی به شرح زیر بود:

ارتشاح التهابی: بدون التهاب = ۰؛ التهاب موضعی برخی سلول‌ها = ۱؛ احاطه شدن بیشتر رگ‌ها و سلول‌ها به وسیله‌ی یک لایه‌ی باریک از سلول‌های التهابی (ضخامت ۱ تا ۵ سلول) = ۲؛ احاطه شدن اکثر رگ‌ها و سلول‌ها به وسیله‌ی یک لایه‌ی ضخیم از سلول‌های التهابی (ضخامت بیش از ۵ سلول) = ۳؛ التهاب کامل = ۴.

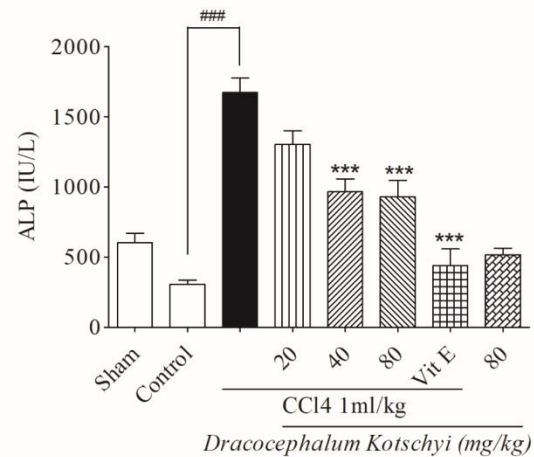
فیروز کبیدی: برای ارزیابی تغییرات بافت فیروزه در کبد، روش تغییر یافته‌ی ایشاک (Ishak-modified HAI system) مورد استفاده قرار گرفت (۱۷). بر اساس این روش، تغییرات کمی بافت فیروزه به

فیروز بود که بررسی‌های بیشتر نشان داد این بهبود نکروز و فیروز و کاهش التهاب در دوزهای ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیشتر از دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود (شکل ۴ و جدول ۱).



شکل ۲. مقایسه‌ی اثر تزریق تتراکلرید کربن به صورت زیر پوستی و اثر تجویز دوزهای مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه به صورت گاوژ و مقایسه با گروه‌های شم، شاهد و ویتامین E بر سطح آنزیم کبدی AST. تزریق تتراکلرید کربن باعث افزایش سطح این آنزیم و گاوژ عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه به خصوص دوزهای ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آن باعث کاهش آنزیم شد و ویتامین E سطح این آنزیم را در حد گروه شاهد پایین آورد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از میانگین گزارش شده است. ^{###} بیانگر $P < 0.001$ و تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. ^{***} بیانگر $P < 0.001$ و تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه تتراکلرید کربن می‌باشد.

معنی‌دار در میزان آنزیم‌های کبدی در مقایسه با میزان آن در گروه دریافت‌کننده‌ی تتراکلرید کربن شد ($P < 0.001$). این کاهش در دوزهای ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیشتر از دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود (شکل ۱، ۲ و ۳).



شکل ۱. مقایسه‌ی اثر تزریق تتراکلرید کربن به صورت زیر پوستی و اثر تجویز دوزهای مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه به صورت گاوژ و مقایسه با گروه‌های شم، شاهد و ویتامین E بر سطح آنزیم کبدی ALP. تزریق تتراکلرید کربن باعث افزایش سطح این آنزیم و تجویز خوراکی عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه باعث کاهش آنزیم شد و ویتامین E سطح این آنزیم را در حد گروه شاهد پایین آورد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از میانگین گزارش شده است. ^{###} بیانگر $P < 0.001$ و تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. ^{***} بیانگر $P < 0.001$ و تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه تتراکلرید کربن می‌باشد.

بحث

طبق اطلاعات ما، در این مطالعه برای اولین بار به بررسی اثر دوزهای مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه بر فیروز کبدی ناشی از تتراکلرید کربن پرداخته شده است. در این مطالعه، پس از گذشت ۱ ماه از تزریق تتراکلرید کربن به شکل زیر پوستی و با بررسی از دو طریق بیوشیمیایی و بافت‌شناسی، فیروز کبدی در رت‌ها مشاهده شد.

اثر دوزهای مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه بر شاخص‌های بافتی نمایانگر التهاب و فیروز کبدی در رت‌های دچار فیروز کبدی با تتراکلرید کربن: تجویز عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه در دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱ ماه در مقایسه با حیوانات گروه تتراکلرید کربن نشان‌دهنده‌ی کاهش قابل توجه التهاب و سلول‌های التهابی و همچنین تاحدی بهبود نکروز و

جدول ۱. تأثیر تجویز تتراکلرید کربن با/ بدون درمان با عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه بر امتیازات التهاب و فیروز در کبد رت‌ها

گروه‌ها	Sham	Control	Ccl4	Ccl4+20	Ccl4+40	Ccl4+80	Ccl4+E
میانگین شدت التهاب	۰	۰	۴	۳	۲	۲	۲
میانگین شدت فیروز	۰	۰	۷	۵	۳	۲	۲

ارتشاح التهابی: بدون التهاب = ۰؛ التهاب موضعی برخی سلول‌ها = ۱؛ احاطه شدن بیشتر رگ‌ها و سلول‌ها به وسیله‌ی یک لایه باریک از سلول‌های التهابی (ضخامت ۱ تا ۵ سلول) = ۲؛ احاطه شدن اکثر رگ‌ها و سلول‌ها به وسیله‌ی یک لایه ضخیم از سلول‌های التهابی (ضخامت بیش از ۵ سلول) = ۳؛ التهاب کامل = ۴.

در مطالعه‌ی حاضر، نتایج نشان داد که با تزریق تتراکلرید کربن به شکل زیر پوستی، حیوانات در طول مطالعه دچار کاهش وزن معنی‌داری نسبت به روز اول خود و نسبت به روز معادل خود در گروه شم و شاهد شده‌اند. این کاهش وزن می‌تواند مربوط به پروسه‌های التهابی ناشی از تتراکلرید کربن باشد.

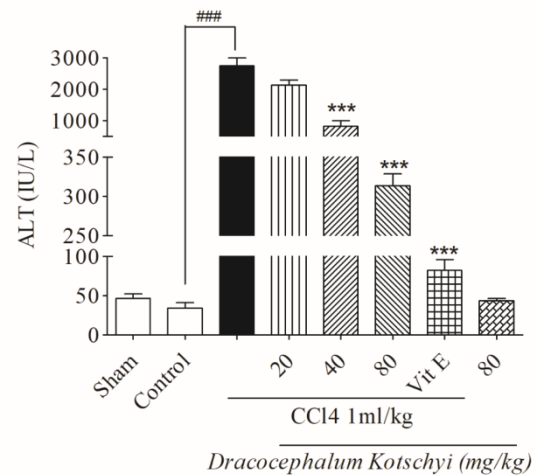
همچنین در این مطالعه به عنوان یافته‌ی اصلی نشان داده شد که گاوژ روزانه‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه در دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱ ماه، آسیب‌های کبدی القا شده توسط تتراکلرید کربن را بهبود می‌بخشد که این بهبودی در دوزهای ۴۰ و ۸۰ بیشتر نمایان بود. این موضوع در هر دو بررسی بافت‌شناسی و بیوشیمیایی تأیید شد. دوزهای مورد استفاده از این عصاره به طور معنی‌داری سطح سرمی ALT، AST و ALP را کاهش دادند که گویا به دلیل اثرات ضد فیبروزی زین گیاه می‌باشد.

همچنین برای بررسی هرگونه اثر سمی احتمالی عصاره‌ی اتانولی زین گیاه از میتوکندری جدا شده از سلول‌های کبدی توموری و غیر توموری استفاده شد که نتایج نشان داد، عصاره‌ی اتانولی زین گیاه باعث ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال و تورم میتوکندری فقط در سلول‌های کبدی توموری می‌شود و روی سلول‌های سالم، سمیتی ندارد (۱۸).

یافته‌های مطالعه‌ی حاضر با یافته‌های برخی از مطالعات گذشته پیرامون اثرات ضد فیروز زین گیاه همخوانی داشت در مطالعه‌ای از اولتائولیک اسید روی موش‌های آلبینو استفاده شد که نشان داد، سمیت کبدی ناشی از الکل را با بازیابی آنزیم‌ها و مارکرهای کبدی بهبود می‌بخشد (۱۹).

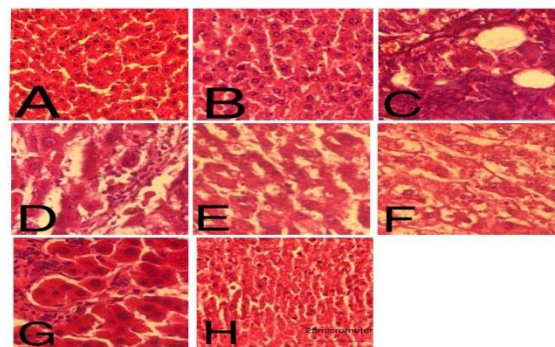
در مطالعه‌ای که Liu و همکاران تحت عنوان کاهش بیماری الکی کبدی به وسیله‌ی لوتولین انجام دادند، کاهش قابل توجهی در میزان مارکرهای کبدی از جمله کلاسترول، تری‌گلیسرید، AST و ALT دیده شد که تا حدی همسو با مطالعه‌ی حاضر بود (۲۰).

مطالعه‌ای برای بررسی اثر ضد التهابی آپیزنین و عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه بر کولیت ناشی از اسید استیک در موش انجام شده است. عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه به میزان ۱۰، ۲۰، ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم یا آپیزنین به میزان ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به صورت خوراکی، ۲ ساعت قبل از القای کولیت که با تجویز داخل رحمی اسید استیک ایجاد شده بود، استفاده شد. ارزیابی بیوشیمیایی رودی بزرگ ملتهب با اندازه‌گیری فعالیت میلوپراکسیداز انجام گردید. پس از ۵ روز درمان، زخم مخاطی مورد بررسی قرار گرفت. زین گیاه و گروه‌های تحت درمان با آپیزنین مقادیر نمره‌ی قابل توجهی پایین‌تر از کاراکترهای ماکروسکوپی و میکروسکوپی را در مقایسه با گروه شاهد منفی تحت درمان با حامل نشان دادند. اثر مفید



نمودار ۳. مقایسه‌ی اثر تزریق تتراکلرید کربن به صورت زیر پوستی و اثر تجویز دوزهای مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه به صورت گاوژ و مقایسه با گروه‌های شم، شاهد و ویتامین E بر سطح آنزیم کبدی ALT. تزریق تتراکلرید کربن باعث افزایش سطح این آنزیم و گاوژ عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه باعث کاهش آنزیم شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از میانگین گزارش شده است. ^{###} بیانگر $P < 0.001$ و تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. ^{***} بیانگر $P < 0.001$ و تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه تتراکلرید کربن می‌باشد.

از میان روش‌های مختلف در دسترس برای القای فیروز کبدی در مدل‌های آزمایشگاهی، تتراکلرید کربن به عنوان پر کاربردترین ماده برای این منظور شناخته شده است.



شکل ۴. تغییرات بافت‌شناسی در کبد رت‌ها. بافت کبد نرمال در گروه‌های شم (A)، شاهد (B) و دوز ۸۰ عصاره (H). ارتشاح التهابی و فیروز کبدی شدید همراه با وجود نکروز لقمه‌ای و تغییرات بالینگ شدید، تشکیل ندول‌های کوچک سیروز و جداسازی لوب‌های بافت کبد در گروه تتراکلرید کربن (C). پسرقت قابل توجه التهاب و فیروز و کاهش سلول‌های التهابی در گروه‌های تحت درمان با دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۸۰ عصاره‌ی هیدروالکلی زین گیاه (D، E و F) و مقایسه‌ی بافت کبد این گروه‌ها با گروه دریافت‌کننده‌ی ویتامین E (G). (بزرگ‌نمایی $\times 400$)

ترکیبات گسترده‌ای که زرین گیاه دارد، از آن در جهت مطالعات فیروتیک دیگر اندام‌ها نیز استفاده شود.

آپیزین با اثر پردنیزولون قابل مقایسه بود. این مطالعه، پتانسیل ضد التهابی عصاره‌ی زرین گیاه را نشان داده است (۲۱).

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی دانشجویی دکترای داروسازی به شماره‌ی طرح ۳۹۹۱۰۸۵ بوده و توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مورد حمایت مالی قرار گرفته است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، و همچنین از حمایت‌ها و راهنمایی‌های خانم دکتر برادران، پاتولوژیست محترم آزمایشگاه دکتر برادران و نیز آقای شریفی کارشناس لانه‌ی حیوانات دانشکده‌ی داروسازی اصفهان، تقدیر و تشکر می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، فعالیت ضد التهابی و ضد فیروزی عصاره‌ی هیدروالکلی زرین گیاه بر کبد رات، نشان داده شد. با این حال، مطالعات گسترده‌تری برای نشان دادن عملکرد عصاره‌ی هیدروالکلی زرین گیاه بر روی کبد لازم است.

پیشنهاد می‌شود مطالعات دقیق مولکولی جهت پی بردن به اثر دقیق عصاره‌ی هیدروالکلی زرین گیاه در بهبود فیروز کبیدی ناشی از تتراکلرید کربن انجام گیرد. همچنین پیشنهاد می‌شود با توجه به

References

- Dadban-Shahamat M, Shakki M, Hashemi-Chashmi SZ. The effect of high-intensity intermittent exercise with silymarin supplementation on liver enzymes in male rats of fatty liver model [In Persian]. *J Isfahan Med Sch* 2021; 38(606): 989-95.
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115(2): 209-18.
- Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut* 2015; 64(5): 830-41.
- Huizen J. What is liver fibrosis? [Online] 2019 [cited 2019 Apr 30]. Available from: URL: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/325073>
- Francisco V, Figueirinha A, Neves BM, García-Rodríguez C, Lopes MC, Cruz MT, et al. cymbopogon citratus as source of new and safe anti-inflammatory drugs: bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Ethnopharmacol* 2011; 133(2): 818-27.
- Adeneye AA, Agbaje EO. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 112(3): 440-4.
- Zeng Q, Jin HZ, Qin JJ, Fu JJ, Hu XJ, Liu JH, et al. Chemical constituents of plants from the genus *Dracocephalum*. *Chem Biodivers* 2010; 7(8): 1911-29.
- Negrelle R, Gomes EC. *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf: chemical composition and biological activities. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s 2007; 9(1): 80-92.
- Sawyer E. traditional medicine in Sierra Leone-a critical appraisal. *Nigerian Journal of Pharmacy* 1982; 13(5): 28-33.
- Lee TY, Wang G-J, Chiu JH, Lin HC. Long-term administration of *salvia miltiorrhiza* ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55(11): 1561-8.
- Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, et al. the role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci* 2015; 16(11): 26087-124.
- Ningsih IY, Zulaikah S, Hidayat MA, Kuswandi B. Antioxidant activity of various kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) leaves extracts from Jember, Indonesia. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 2016; 9(8): 378-85.
- Fattahi M, Nazeri V, Torras-Claveria L, Sefidkon F, Cusido RM, Zamani Z, et al. Identification and quantification of leaf surface flavonoids in wild-growing populations of *Dracocephalum kotschy* by LC-DAD-ESI-MS. *Food chemistry* 2013; 141(1): 139-46.
- Hosseini-Sharifabad A, Sadraei H, Hashemnia M, Sajjadi SE, Mirdamadi Z. Effect of hydroalcoholic and aqueous extracts of *Dracocephalum kotschy* on bleomycin induced pulmonary fibrosis. *J Herbmed Pharmacol* 2021; 10(2): 209-17.
- Guo Y, Liang X, Meng M, Chen H, Wei X, Li M. Hepatoprotective effects Yulangsan flavone against carbon tetrachloride (CCl4)-induced hepatic fibrosis in rats. *Phytomedicine* 2017; 15(33): 28-35.
- Ishikawa M, Saito K, Yamada H, Nakatsu N, Maekawa K, Saito Y. Plasma lipid profiling of different types of hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride and lomustine in rats. *Lipids Health Dis* 2016; 15: 74.
- Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22(6): 696-9.
- Talari M, Seydi E, Salimi A, Mohsenifar Z, Kamalinejad M, Pourahmad J. *Dracocephalum*: novel anticancer plant acting on liver cancer cell mitochondria. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 892170.
- Ayeleso TB, Matumba MG, Mukwevho E. Oleanolic acid and its derivatives: biological activities and therapeutic potential in chronic diseases. *Molecules* 2017; 22(11): 1915.
- Liu G, Zhang Y, Liu C, Xu D, Zhang R, Cheng Y, et al. luteolin alleviates alcoholic liver disease induced by chronic and binge ethanol feeding in mice. *J Nutr* 2014; 144(7): 1009-15.
- Sadraei H, Asghari G, Khanabadi M, Minaiyan M. Anti-inflammatory effect of apigenin and hydroalcoholic extract of *Dracocephalum kotschy* on acetic acid-induced colitis in rats. *Res Pharm Sci* 2017; 12(4): 322-9.

Evaluation of the Effect of Hydroalcoholic Extract of *Dracocephalum Kotschy* Boiss on Hepatic Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride in Rats

Mohammad Atabak¹, Ali Hosseini-Sharifabad², Hasan Sadraei³, Adel Mohammadalipour⁴

Original Article

Abstract

Background: Liver disease eventually leads to fibrosis, which is a type of collagenized tissue. *D.kotschy* has compounds that have strong anti-inflammatory and anti-fibrotic properties. Due to the inflammatory nature of fibrosis, this study aims to investigate the effect of different doses of hydroalcoholic extract of *D.kotschy* on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride.

Methods: The *D.kotschy* hydroalcoholic extract was prepared via maceration method in 70% ethanol. The groups (6 adult male rats in each) of animals included: Sham, Control, Tetrachloride carbon (CCl₄), vitamin E as well as extracts plus CCl₄. The extract of *D.kotschy* was gavaged at 20, 40 or 80 mg/kg. In addition, the diluted CCl₄ in olive oil (1:1) was injected at 1ml/kg intraperitoneally. The duration of treatment was 1 month. Then the blood sample and liver tissue of rats were extracted for biochemical and pathological examination.

Findings: Administration of the *D.kotschy* for 1 month significantly reduced the level of Alkaline phosphatase (ALP), Aspartate Aminotransferase (AST), Alanine Aminotransferase (ALT) liver enzymes compared to CCl₄ treated group (P < 0.001) as well as caused a significant improvement in the pathological features of fibrosis.

Conclusion: The present study showed a significant reduction in the amount of hepatic fibrosis caused by carbon tetrachloride in the pathology samples receiving the *D.kotschy* extract. In addition, by increasing dose of the *D.kotschy*, a significant decrease in liver enzymes was observed. The effect of the *D.kotschy* in improving fibrosis at higher doses requires extensive studies.

Keywords: Carbon tetrachloride; Fibrosis; *Dracocephalum Kotschy*; Liver; Liver necrosis

Citation: Atabak M, Hosseini-Sharifabad A, Sadraei H, Mohammadalipour A. Evaluation of the Effect of Hydroalcoholic Extract of *Dracocephalum Kotschy* Boiss on Hepatic Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride in Rats. J Isfahan Med Sch 2022; 40(672): 356-62.

1- Pharmacy Student, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Assistant Professor, Department of Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Ali Hosseini-Sharifabad, Associate Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: hosseini_a@pharm.mui.ac.ir