مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۴، شماره۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۸(شماره پی در پی ۱۳۷)

اثر محافظت کبدی و آنتی‌اکسیداتیو رزمارینیک اسید بر کلستاز کبدی القا شده با انسداد مجاری صفراوی در موش صحرایی نر

ناهید آذرمهر[۱]، فاطمه بردستانی[۱]، مهرزاد جعفری[۲]، امیر حسین دوستی مطلق[۳*]

[۱]کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [۲]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، [۳]مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۰۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰٤/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: کلستاز نوعی بیماری کبدی است که در اثر اختلال عملکرد سیستم کبدی ـ صفراوی به وجود می‌آید، این اختلال نتیجه تجمع اسیدهای چرب صفراوی و سموم دیگر در کبد است. هدف از مطالعه حاضر تعیین و بررسی اثرات احتمالی مکمل دارویی رزمارینیک اسید در برابر استرس اکسیداتیو و آسیب کبدی در رت‌های کلستاتیک القا شده با انسداد مجاری صفراوی (Bile Duct Ligation –BDL) بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۷ انجام شد، ۲۴ موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵±۲۰۰ گرم به صورت تصادفی به سه گروه تقسیم شدند؛ کنترل(تعداد=٦)، گروه کلستاتیک(تعداد=۹) و گروه کلستاتیک دریافت کننده رزمارینیک اسید (تعداد=۹) با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز. آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل؛ اسپارتات آمینو ترانسفراز، آلانین آمینو ترانسفراز، آلکالین فسفاتاز، مارکرهای استرس اکسیداتیو شامل پروتئین کربونیل، توتال تیول، توانایی آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز سنجش شدند، همچنین رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین در بافت کبد انجام شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون آماری واریانس یک طرفه (ANOVA) با Post hoc با تصحیح Tukey و LSD تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در گروه کلستاتیک فعالیت آنزیم‌های ALT، AST، ALP و CAT و همچنین میزان PCO، FRAP پلاسما به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش داشت در حالی که میزان TSH، FRAP و GPX بافت کبد به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد($p<0/05$). در گروه دریافت کننده رزمارینیک اسید فعالیت آنزیم‌های ALT و ALP به طور معنی‌دار کاهش($p<0/05$)، یافت ولی تأثیر معنی‌داری بر روی مارکرهای استرس اکسیداتیو مشاهده نشد. همچنین در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین، BDL به طور قابل ملاحظه‌ای سبب نکروز بافت کبدی شد که این تغییرات به طور قابل توجهی با تجویز رزمارینیک اسید بهبود پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهند که رزمارینیک اسید از طریق تأثیر بر روی تست‌های بیوشیمیایی متداول مانند ALT و ALP و بهبود شاخص‌های هیستولوژی می‌تواند در بهبود اسیب کبدی ناشی از کلستاز سودمند باشد. با وجود افزایش معنی‌دار میزان مارکر استرس اکسیداتیو مانند پروتئین کربونیل و کاهش معنی‌دار TSH، FRAP و GPX در گروه BDL، رزمارینیک اسید با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأثیر معنی‌داری بر روی این پارامترهای تعادل اکسیدان–آنتی‌اکسیدان نشان نداد.

واژه‌هایکلیدی: کبد، کلستاز، انسداد مجاری صفراوی، رزمارینیک اسید

[*] **نویسنده مسئول: امیر حسین دوستی مطلق**، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، گروه بیوشیمی بالینی
Email: amirhosseindoustimotlagh@gmail.com

مقدمه

کبد ارگان اصلی در تنظیم هموستاز متابولیسم بدن است. اختلال در عملکرد کبد منجر به بیماری‌های کبدی حاد و مزمن از جمله هپاتیت‌ها، فیبروز، سیروز و حتی سرطان سلول‌های کبد می‌شود(۱). شیوع بیماری‌های کبدی مزمن در سطح جهان در حال افزایش است (۲). کلستاز خصوصیت اصلی اختلالات کبدی مزمن مثل سیروز صفراوی اولیه و کلانژیت اسکلروزی اولیه است (۳، ۴). ترشح صفرا از عملکردهای ضروری کبد پستانداران است؛ کلستاز حالتی است که در ان ترشح صفرا دچار اختلال شده و تجمع ترکیبات صفراوی سمی از جمله نمک‌های صفراوی در کبد افزایش می‌یابد (۵). تداوم یافتن این اتفاق به اسیب هپاتوسیت‌ها و سلول‌های اپیتلیال مجرای صفراوی، التهاب و پیشرفت فیبروز کبدی، سیروز و مرگ منجر می‌شود (۴). از لحاظ بالینی کلستاز با علایمی مثل؛ زردی، خارش و سوء جذب همراه است در حالی که از لحاظ آزمایشگاهی با افزایش فعالیت الکالین فسفاتاز، میزان بیلی‌روبین کونژوگه و اسیدهای صفراوی تام در خون همراه است (۶). علل کلستاز شامل؛ اختلالات متعدد ژنتیکی، اتوایمیون و بدخیمی‌ها است که می‌تواند انتقال اسیدهای صفراوی را در هر مرحله دچار مشکل کند (۷). مکانیسم اصلی کلستاز کبدی ناشناخته است؛ با وجود این، همراه با افزایش و تجمع اسیدهای صفراوی و سموم دیگر در کبد و پلاسما، کلستاز با بعضی تغییرات بیوشیمیایی از جمله؛ تکثیر کلانژیوسیت‌ها، واکنش دکتورال(هیپرپلازی مجرای صفراوی (۸))، اسیب هپاتوسلولار، نفوذ پذیری بر فعال‌سازی التهابی سلول و استرس اکسیداتیو همراه است (۹). پژوهش‌های قبلی نشان می‌دهند که رادیکال‌های ازاد و استرس اکسیداتیو در اسیب کلستاتیک نقش دارند (۲). در انسداد صفراوی تجمع اسیدهای صفراوی آب گریز و سلول‌های التهابی در بافت کبد، تولید رادیکال‌های ازاد را افزایش می‌دهد. هم‌چنین، اسیدهای صفراوی باعث افزایش گونه‌های واکنشگر اکسیژن(Reactive Oxygen Species-ROS) از لوکوسیت‌های چند هسته‌ای می‌شوند (۱۰). در یک سیستم بیولوژیک، به علت عدم تعادل بیولوژیکی بین ROSها و دفاع آنتی‌اکسیدانی استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد. مهم‌ترین رادیکال‌های آزاد شناخته شده در سیستم‌های بیولوژیک شامل آنیون سوپر اکسید(O_2^-)، هیدروکسیل(OH^-) و پراکسید هیدروژن(H_2O_2) می‌باشند (۱۱). سلول‌های نرمال کبد دارای سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشند که آنها را در برابر رادیکال‌های آزاد و واکنش دهنده‌ها حفظ می‌کند. سیستم دفاع آنزیمی شامل؛ آنزیم‌های GPX، SOD و CAT می‌باشد که به سرعت گونه‌های فعال اکسیژن مثل؛ سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل را حذف می‌کنند (۱۲). بهترین و مرسوم ترین روش جهت اندازه‌گیری رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو،تعیین محصولات حاصل از واکنش رادیکال‌های آزاد با مولکول‌های زیستی (لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک) به عنوان بیومارکر می‌باشد (۱۳).

مکمل‌های غذایی مشتق از گیاه انتخاب مناسبی برای ارتقاء سلامت با رویکرد درمانی می‌باشند (۱). بسیاری از ترکیبات فنولی طبیعی، مانند پلی‌فنول‌ها به

طور مستقیم در رژیم غذایی انسان استفاده می‌شوند که خواص مفید انها مربوط به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آنها می‌باشد (۱۴). Rosmarinic acid-RA (a-o-caffeoy1-3,4dihydroxyphenyllacticacid) یک ترکیب معمول دی فنولیک گیاهی از خانواده براژیناسه و لامیاسه است (۱۵، ۱۶). رزمارینیک اسید به عنوان یک داروی گیاهی بالقوه محسوب شده و به خاطر خواص آنتی‌اکسیدانی قوی آن مورد توجه قرار گرفته است. گیاهانی که حاوی RA هستند به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی در جنوب اروپا، ژاپن و هند برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سر درد، درد معده، دیابت شیرین، رفع نیش حشرات و اکنه استفاده می‌شوند (۱۵). علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی (۱، ۱۷) خصوصیات ضد التهابی، ضد توموری (۱۸)، ضد باکتریایی و ضد ویروسی (۱۹) RA نیز نشان داده شده است. اثرات محافظت کبدی گیاهان حاوی رزمارینیک اسید مانند رزماری، بادرنجبویه و مریم گلی در پژوهش‌های پیشین اثبات شده است (۲۰). BDL مدل رایجی برای ایجاد کلستاز کبدی در حیوانات است که با انسداد کامل صفرا باعث اسیب کلستاتیک به کبد می‌شود (۲۱). پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که این مدل سبب استرس اکسیداتیو در مدل‌های حیوانی می‌شود (۲۲). اگر چه رزمارینیک اسید دارای پتانسیل درمانی بوده و اثر آن بر بیماری‌های کبدی امیدوار کننده است، در حال حاضر شواهد تجربی که اثر بخشی این ترکیب را در برابر بیماری‌های کلستاتیک کبد نشان دهد وجود ندارد، لذا با توجه به خصوصیات آنتی‌اکسیدانی رزمارینیک اسید و همچنین نقش اکسیدان‌ها در بروز کلستاز کبدی القا شده به وسیله انسداد مجاری صفراوی در مطالعه حاضر تصمیم گرفته شد که اثر محافظتی احتمالی آن در برابر این نوع از آسیب کبدی بررسی شود.

روش و بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۷ انجام شد، ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار سه ماهه با وزن بین ۱۷۵ تا ۲۲۵ گرم مورد آزمایش قرار گرفتند. کلیه ملاحظات اخلاقی در خصوص رفتار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. برای ایجاد کلستاز از تکنیک جراحی انسداد مجاری صفراوی(BDL) استفاده شد (۲۳) به این ترتیب که پس از القای بیهوشی عمومی با داروهای(کتامین ـHCl ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و (کلرپرومازین ـ HCl ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در گروه‌های مورد آزمایش، مجرای صفراوی مشترک حیوان از دو طرف گره زده شد و از وسط قطع گردید. این امر منجر به نارسایی در ترشح صفرا شده و به کلستاز منتهی شد. با پیشرفت زمان و آسیب‌های ناشی از تجمع اسیدهای صفراوی سمی در کبد، فیبروز ایجاد شده در این ارگان گسترش یافته و کلستاز(یک هفته بعد از جراحی) رخ داد (۲۴). همزمان بر روی تعدادی از موش‌ها، تمام اعمال جراحی به غیر از بستن مجرای صفراوی صورت گرفت، این موش‌ها به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. رت‌های خریداری شده به ۳ گروه به

شرح ذیل تقسیم شدند؛ کنترل(تعداد=۶): انجام عمل جراحی به غیر از بستن مجرای صفراوی، کلستاتیک(تعداد=۹): انجام عمل جراحی به همراه بستن مجرای صفراوی و کلستاتیک + رزمارینیک اسید(تعداد=۹): انجام عمل جراحی به همراه بستن مجرای صفراوی و دریافت روزانه ۲۰ BW میلی‌گرم بر کیلوگرم رزمارینیک اسید در نرمال سالین به صورت گاواژ(۲۵).

۲ هفته بعد از عمل جراحی، از موش‌های صحرایی خون‌گیری شد، پس از کشته شدن رتها قسمتی از بافت کبدی جدا شده و بررسی هیستوپاتولوژیک روی آن انجام گرفت، بقیه بافت کبد پس از فریز شدن در نیتروژن مایع در ۷۰ـ درجه ذخیره شد. نمونه خون در لوله‌های حاوی هپارین جمع‌آوری شد به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ و پلاسمای آن جدا شد. ۱ گرم از بافت کبد ذخیره شده به وسیله دستگاه هموژنایزر با ۹ میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات(pH=۷/۴ و ۱۰ میلی مولار) هموژنه شد و برای بررسی فعالیت آنزیم‌های GPX، SOD و CAT و همچنین اندازه‌گیری میزان توتال تیول(TSH) و پروتئین کربونیل(PCO) استفاده شد. در ضمن پلاسمای جدا شده برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های مهم کبدی شامل؛ ALT، AST و ALP و همچنین PCO و FRAP استفاده گردید.

برای بررسی‌های هیستوپاتولوژیک، ابتدا نمونه‌های گرفته شده از بافت کبد در بافر فرمالین ٤ درصد فیکس شد. در مرحله بعدی دهیدراتاسیون نمونه ها با استفاده از الکل انجام گرفته و در انتها، نمونه‌های آب‌گیری شده در پارافین قالب‌گیری شدند. سپس برش‌های بافتی ۵ میکرونی تهیه و با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی صورت گرفت.

میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی شامل؛ ALT، AST و ALP با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و به روش کالریمتری اندازه‌گیری شد.

نمونه‌های بافت هموژنه کبد و پلاسما به مدت ٦۰ دقیقه در شرایط تاریکی و در دمای اتاق با معرف ۲، ٤ـ دی‌نیتروفنیل هیدرازین(۱۰ میلی‌مول در لیتر) در HCl ۲ مولار انکوبه شدند. سپس تری‌کلرو استیک اسید ۵۰ درصد به نمونه‌ها اضافه و بعد از سانتریفوژ رسوب حاصل با محلول اتانول/ اتیل استات(نسبت ۱:۱) شستشو داده شد. به رسوب حاصل از سانتریفوژ محلول گوانیدین هیدروکلراید(٦ مولار) اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در نهایت جذب محلول رویی در طول موج ۳۷۰ نانومتر قرایت شد و میزان پروتئین کربونیل با استفاده از ضریب جذب مولی $2.2\times10^4\ M^{-1}cm^{-1}$ محاسبه شد (۲٦).

مقدار TSH بافت هموژنه بر اساس واکنش DTNB با گروه‌های تیول و تشکیل ترکیبات TNB (۲ـ نیترو-۵ـ تیوبنزوئیک اسید) و دی‌سولفید تعیین شد. به طور خلاصه، ۲۵ میکرولیتر نمونه، ۱۰ میکرولیتر DTNB، ۱۵۰ میکرولیتر Tris-EDTA و ۷۹۰ میکرولیتر متانول مطلق به یک میکروتیوب اضافه شد.

سپس میکروتیوب به آرامی مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. جذب محلول رویی در طول موج ٤١٢ نانومتر قرائت شد و مقدار TSH با استفاده از ضریب جذب مولی $13600\ M^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه شد (۲۷).

در این روش توانایی پلاسما در احیای یون‌های فریک(Fe^{3+}) اندازه گیری می‌شود. با احیای یون‌های فریک(Fe^{3+}) و تبدیل آن به یون‌های فرو(Fe^{2+}) در pH اسیدی و در حضور TPTZ (Tripyridyl-s-triazine)، کمپلکس Fe-TPTZ تشکیل می‌شود که رنگ آن آبی است. شدت رنگ حاصله در طول موج ۵۹۳ نانومتر و به صورت اسپکتروفتومتریک قابل اندازه‌گیری است. این واکنش غیر اختصاصی است و هر مولکولی که تحت شرایط فوق قابلیت احیای یون فریک را داشته باشد می‌تواند در آن شرکت نماید (۲۸).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GPX، SOD و CAT در بافت هموژنه کبد با استفاده از کیت الایزا (Zell Bio GmbH, Ulm, Germany) و بر اساس دستورالعمل کیت اندازه‌گیری شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های واریانس یک طرفه با پست هاک با تصحیح توکی و LSD انجام گرفت و نتایج به صورت میانگین± SEM نشان داده شد. آنالیز آماری داده‌هایی که توزیع نرمال نداشتند با استفاده از آزمون آماری کروسکال والیس انجام گرفت و نتایج به صورت Q3-Q1 میانه نشان داده شد. لازم به ذکر است که $p< ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

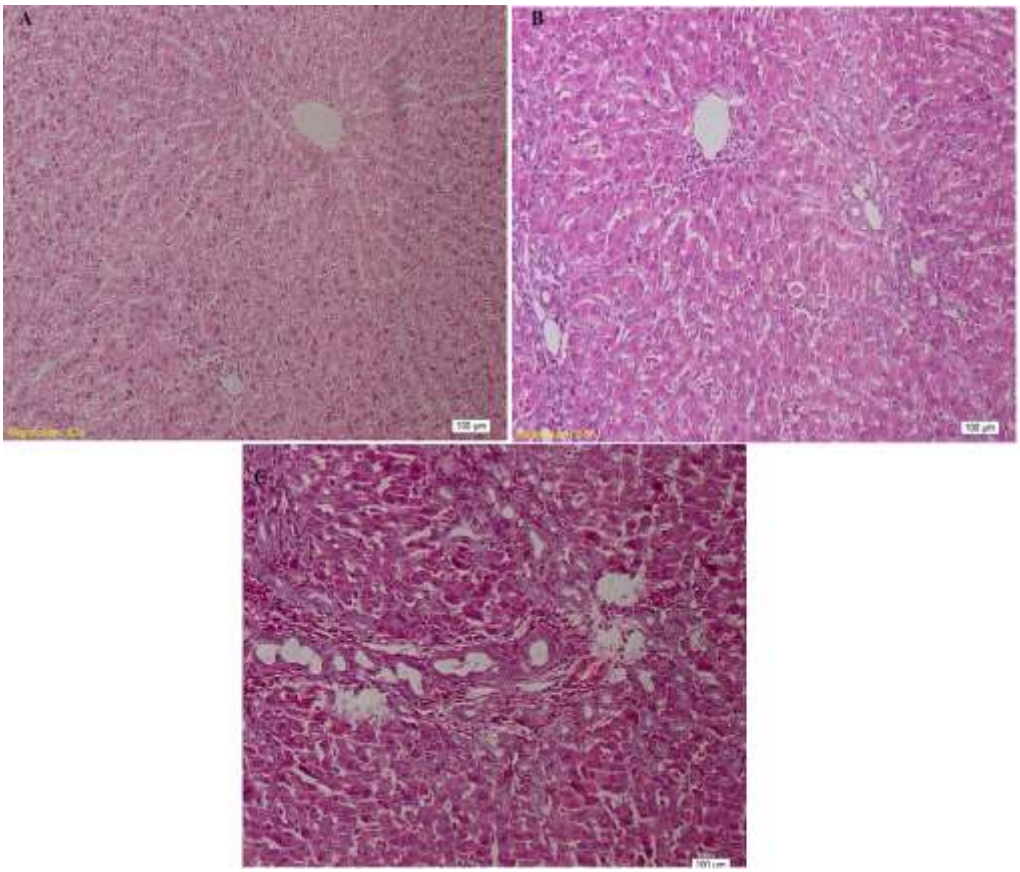
نمونه‌های کبد گروه کنترل ساختارهای سلولی نرمال با سلول‌های کبدی مشخصی را نشان دادند و هسته‌ها به وضوح مشاهده می‌شد. در گروه کلستاتیک فیبروز بافتی، هیپرپلازی شدید مجاری صفراوی و ارتشاح التهابی گلبول‌های سفید در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. در گروه کلستاتیک دریافت کننده رزمارینیک اسید، هیپرپلازی مجاری صفراوی متوسطی دیده شد، ولی فیبروز بافتی دیده نشد(شکل ۱).

آسیب کبدی با تعیین سطح پلاسمایی آنزیم‌های کبد مورد ارزیابی قرار گرفت. همان طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، سطوح پلاسمایی آنزیم‌های ALT، AST و ALP در گروه کلستاتیک نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد($p< ۰/۰۵$) و تزریق رزمارینیک اسید به گروه کلستاتیک، میزان ALP و ALT را به طور معنی‌دار($p<۰/۰۵$) و میزان AST را به طور غیر معنی‌داری کاهش داد.

یافته‌های حاضر نشان داد که در گروه کلستاتیک نسبت به گروه کنترل، میزان TSH بافت کبد به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد در حالی که میزان FRAP در پلاسما به طور معنی‌داری افزایش و در بافت کبد به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. میزان PCO

پلاسما در گروه کلستاتیک نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد در حالی که تغییرات معنی‌داری در میزان PCO بافت کبد در گروه کلستاتیک نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. درمان رت‌های کلستاتیک با رزمارینیک اسید تأثیر معنی‌داری روی میزان مارکرهای استرس اکسیداتیو در کبد و پلاسما نداشت(جدول ۲).

همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، فعالیت آنزیم CAT در گروه کلستاتیک نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت($p<0/05$) و فعالیت آنزیم GPX در گروه کلستاتیک نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت($p<0/05$). با وجود این فعالیت آنزیم SOD در گروه کلستاتیک نسبت به گروه‌های دیگر تغییر معنی‌داری نشان نداد. به طور کلی تجویز رزمارینیک اسید به گروه کلستاتیک تأثیر معنی‌داری بر روی فعالیت این آنزیم‌ها نداشت(جدول ۳).



شکل ۱: نتیجه هیستولوژی کبد رت رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین و آئوزین(X ۱۰). A) کنترل، B) کلستاتیک و C) کلستاتیک دریافت کننده رزمارینیک اسید با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم

جدول ۱: تأثیر رزمارینیک اسید بر روی پارامترهای بیوشیمیایی پلاسما در موش‌های صحرایی القا شده با انسداد مجاری صفراوی

گروه	الکالین فسفاتاز (واحد بین الملل بر لیتر)	اسپارتات امینو ترانسفراز (واحد بین الملل بر لیتر)	الانین امینو ترانسفراز (واحد بین الملل بر لیتر)
کنترل	٤٤٦/٥٣ ± ٥٥/٦٢	٨٧/٦٦ ± ١٠/٨١	٤٠/٢٥ (٢٣/٥٤-٤٦/٦٦)
کلستاتیک	١٠٨٩/٤٦ ± ٧٨/٩٨[a]	٢٠١/٩٠ ± ٢٢/٠٧[a]	٨٠/٥٠ (٥٤/٥٤-١٢٣/٣٧)[a]
کلستاتیک+ رزمارینیک اسید	٦٩٦/٢٩ ± ٦١/٤٢[b]	١٥٢/٦٠ ± ٢٧/٠٥	٤٠/٢٥ (٢٨/٢٩-٥٦/٥٨)[b]

[a]تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل($p<0/05$) ، [b]تفاوت معنی دار نسبت به گروه کلستاتیک($p<0/05$)

جدول ۲: تأثیر رزمارینیک اسید بر روی مارکرهای استرس اکسیداتیو بافت کبد و پلاسما در موش‌های صحرایی القا شده با انسداد مجاری صفراوی

گروه	پروتئین سولفیدریل (میکرومول بر گرم بافت)	پروتئین کربونیل (میکرومول بر گرم بافت)	توانایی انتی اکسیدانی تام پلاسما (میکرومول بر گرم بافت)	پروتئین کربونیل (میکرومول بر لیتر)	توانایی انتی اکسیدانی تام پلاسما (میکرومول بر لیتر)
کنترل	٧/٦١ ± ٠/٥٩	٢/٨٦ ± ٠/٠٧	١٤٨٨/٢٠ ± ٥٣/٧٦	٣/٧٦± ٠/١٤	٨٣٩/٠٠ (٨٠٤/٠٠-٩٧٢/٠٠)
کلستاتیک	٤/٢١ ± ٠/٦٦[a]	٢/٨٠ ± ٠/٠٣	١١٠٢/٥٠ ± ٩١/٤٢[a]	٤/٤٧ ± ٠/٠٦[a]	١٦١٤/٠٠ (١٠٥٥/٥٠- ١٦٧٧/٠٠)[a]
کلستاتیک+ رزمارینیک اسید	٢/٦٦ ± ٠/١٣	٣/٠٢ ± ٠/٠٧	١١٣٢/٧٥ ± ٧١/٢٩	٤/٦٠ ± ٠/٢٦	١٥٨٦/٥٠ (١٠٤٦/٥٠- ١٨٣٥/٢٥)

[a]تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل($p<0/05$) ، [b]تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کلستاتیک($p<0/05$)

جدول ۳: تأثیر رزمارینیک اسید بر روی فعالیت انزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GPX، SOD و CAT در موش‌های القا شده با انسداد مجاری صفراوی بر اساس (خطای استاندارد ± میانگین)

گروه	سوپر اکسید دسموتاز (مول بر میلی‌لیتر)	گلوتاتیون پراکسیداز (مول بر میلی‌لیتر)	کاتالاز (مول بر میلی‌لیتر)
کنترل	٢٥/٣٩ ± ١٠/٠٦	٤٣٩/٤٥ ± ٥٥/٨٩	٢٥/٧٦ ± ٠/٨٥
کلستاتیک	٢٨/٦٤ ± ٠/٤٧	١٥٢/٢٥ ± ٥٠/٦٣[a]	٢٩/٤٠ ± ٠/٥٣[a]
کلستاتیک+ رزمارینیک اسید	٣٢/٣٢ ± ٣/٧٧	١٣٦/٧١ ± ٧٩/٢٨	٢٧/٠٦ ± ٠/٨٧

[a]تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل($p<0/05$) ، [b]تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کلستاتیک ($p<0/05$)

بحث

سلول‌های نرمال کبد دارای سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشند که آنها را در برابر رادیکال‌های آزاد و واکنش دهنده‌ها حفظ می‌کند، بهترین و مرسوم‌ترین روش جهت اندازه‌گیری رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو،تعیین محصولات حاصل از واکنش رادیکال‌های آزاد با مولکول‌های زیستی به عنوان بیومارکر می‌باشد(۱۳ و ۱۲). هدف از مطالعه حاضر تعیین و بررسی اثرات احتمالی مکمل دارویی رزمارینیک اسید در برابر استرس اکسیداتیو و آسیب کبدی در رت‌های کلستاتیک القا شده با انسداد مجاری صفراوی (Bile Duct Ligation –BDL) بود.

کلستاز نوعی بیماری کبدی است که در اثر اختلال عملکرد سیستم کبدی ـ صفراوی به وجود می‌آید، این اختلال نتیجه تجمع اسیدهای چرب

صفراوی و سموم دیگر در پلاسما و کبد است و در صورت عدم درمان به نارسایی کبدی، سیروز و در نهایت مرگ منجر می‌شود(۲۹). در یک سلول سالم تعادل مناسبی بین پرواکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها وجود دارد، با افزایش پرواکسیدانها و یا کاهش آنتی اکسیدانها استرس اکسیداتیو اتفاق می‌افتد که در صورت طولانی شدن، آسیب جدی سلولی رخ می‌دهد(۳۰). بیشتر بیماریهای کبدی با استرس اکسیداتیو همراه هستند که ممکن است این استرس اکسیداتیو سبب مرگ سلول‌های کبدی و آسیب کبدی شود(۳۱).

BDL یک مدل تجربی کلاسیک است که به دنبال آن اسیب کبدی و کلستاز ایجاد می‌شود. BDL باعث ایجاد کلستاز، القا فیبروز پیش رونده، سیروز صفراوی ثانویه و در نهایت منجر به نارسایی کبد می‌شود(۳). اثرات محافظت کبدی رزمارینیک اسید در مدل‌های مختلف آسیب کبدی مانند اسیب کبدی ناشی از استامینوفن(۳۲) و آسیب کبدی القا شده با تتراکلرید کربن(۱۸) بررسی شده است. با وجود این، پژوهش‌های ما نشان داد که تاکنون تأثیر رزمارینیک اسید به عنوان یک مکمل دارویی بر روی کلستاز کبدی ناشی از BDL بررسی نشده است. در مطالعه حاضر مدل BDL در موش‌های صحرایی ایجاد شد تا اثر محافظت کبدی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی رزمارینیک اسید بر روی کلستاز کبدی بررسی شود. در موش‌های صحرایی با بسته شدن مجرای صفراوی(BDL)، آسیب کلستاتیک کبد در طول ۴ روز اول به طور کامل گسترش یافته و یک تا دو هفته بعد از عمل جراحی به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد(۳۳). به خاطر تجمع اسیدهای صفراوی سمی فعالیت انزیم‌های کبدی به شدت افزایش می‌یابد(۳۴). از این رو در مطالعه حاضر میزان تست‌های عملکردی کبد مانند ALT، AST و ALP در رت‌های کلستاتیک نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. هم‌چنین آنالیز هیستولوژی کبد تأیید کننده نتایج بیوشیمیایی بود و نشان داد که پس از گذشت ۱۴ روز از BDL کلستاز اتفاق افتاده است. آمینوترانسفرازهای کبدی و ALP بیومارکرهای مفیدی برای بررسی عملکرد کبد هستند. AST و ALT از هپاتوسیت‌های آسیب دیده به داخل جریان خون ازاد می‌شوند، بنابراین افزایش هر دوتای این آنزیم‌ها اسیب کبدی را نشان می‌دهد (۲۵). ALP آنزیمی از خانواده متالوهیدرولاز حاوی روی است که در کبد، استخوان، کلیه، اپیتلیوم روده، جفت و جرم سل‌ها وجود دارد. از آنجایی که ALP کبدی به کانالیکول‌های صفراوی متصل می‌شود افزایش سطح آن یک پیش اگهی برای بیماری‌های کبدی کلستاتیک است (۳۵). نتایج ون و همکاران (۳۶) و زو و همکاران (۳۷) با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. مطالعه لوکارینی و همکاران نشان داد که در اسیب کبدی القا شده با استامینوفن، رزمارینیک اسید با دوزهای ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP را به طور غیرمعنی‌داری کاهش داد (۳۲). هم‌چنین لوو و همکاران اثر رزمارینیک اسید را بر بازسازی کبد

بررسی کردند و نشان دادند رزمارینیک اسید با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور قابل توجهی سطوح آنزیم‌های ALT، AST و ALP را کاهش می‌دهد(۲۵). در مطالعه دیگری لی و همکاران(۱۸) اثر رزمارینیک اسید با دوزهای ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را بر فیبروز کبدی القا شده با تتراکلریدکربن بررسی کردند و مشاهده کردند که رزمارنیک اسید به طور معنی‌داری فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP را کاهش می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، نتایج مطالعه حاضر درباره فعالیت آنزیم‌های ALT و ALP به طور کامل با این نتایج هم‌خوانی دارد. با توجه به نتایج هیستولوژی می‌توان گفت علت کاهش سطوح پلاسمایی این آنزیم‌ها بهبود بافت و سلول‌های کبدی است.

ROSها به طور مداوم برای اهداف فیزیولوژیکی تولید می‌شوند، ولی تولید بیش از حد انها در شرایط پاتولوژیک منجر به استرس اکسیداتیو و آسیب به ماکرومولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها می‌شود(۳۸). انواع گوناگونی از تغییرات اکسیداتیو در پروتئین وجود دارد، رایج‌ترین این تغییرات تشکیل TSH و PCO می‌باشد. از PCO به عنوان مارکر مطالعه تغییرات ناشی از اکسیژن فعال در پروتئین ها استفاده می‌شود(۳۹). در مطالعه ترزیگلو و همکاران(۲۲) و سوکولوویچ و همکاران(۴۰) میانگین سطح PCO در گروه کلستاتیک به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که این نتایج با مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت. TSH یکی از شاخص‌های حساس استرس اکسیداتیو است که نقش حیاتی در سیستم دفاعی در برابرROS ایفا می‌کند. در مطابقت با مطالعه حاضر کبیری فر و همکاران(۴۱) نشان دادند میزان TSH بافت کبدی در رت‌های کلستاتیک در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت. با وجود این، تجویز رزمارینیک اسید با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأثیر معنی‌داری بر روی متغیرهای اکسیداسیون پروتئین نشان نداد. برای بررسی اجمالی و کلی آنچه در پلاسما رخ می‌دهد، وضعیت آنتی‌اکسیدانی تام به کمک تست FRAP اندازه‌گیری شد. این آزمایش ویژگی ندارد و تخمینی کلی از ذخیره آنتی‌اکسیدانی در فاز آبی و فاز غیر محلول محسوب می‌شود. در توافق با مطالعه قبلی ما (٤٢)، ١٤ روز پس از جراحی BDL، میزان پلاسمایی FRAP در گروه کلستاتیک نسبت به گروه کنترل به طور چشمگیری افزایش پیدا کرد. مقدار بالای FRAP پلاسما در رت‌های کلستاتیک ممکن است ناشی از افزایش میزان بیلی‌روبین و سایر آنتی‌اکسیدان‌های درونزا باشد(۴۳). علاوه بر این، میزان FRAP در بافت کبد در گروه کلستاتیک نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت که این کاهش ممکن است به خاطر افزایش تولید عوامل اکسیدان در بافت کبد باشد. با این وجود، در گروه کلستاتیک دریافت کننده رزمارینیک اسید نسبت به گروه کلستاتیک تنها تغییرات آماری معنی‌داری در میزان FRAP در بافت کبد و پلاسما مشاهده نشد.

از آنجایی کـه ROSهـا بـه طـور بـالقوه بـرای عملکردهای سلولی زیان‌آور هستند، سیستم‌های انتی اکسـیدانی دفـاعی در همـه سـلول‌هـا حضـور دارنـد. سیسـتم‌هـای انزیمـی متعـددی از جملـه SOD، GPX و CAT وجـود دارنـد کـه ROS را بـه طـور مـؤثری سمیت‌زدایی کرده و سطوح سلولی این اکسـیدان‌هـا را بـه شـدت کـاهش مـی‌دهنـد (۴۴). CAT یـک آنـزیم هوموتترامر کبدی است که پراکسـید هیـدروژن را بـه آب و اکسیژن تبدیل می‌کند. آنزیم SOD یکـی دیگـر از آنزیم‌های کلیدی دفـاع آنتـی‌اکسـیدانی بـدن اسـت کـه واکـنش تبـدیل رادیکـال سـوپر اکسـید بـه پراکسـید هیدروژن و اکسـیژن مولکـولی را سـرعت مـی‌بخشـد (۴۵). GPX، آنزیم آنتی اکسیدانی درون سلولی دیگـری است که هیدروژن پراکسید را به آب کاتالیز می‌کند تا اثرات مضر آن از بین برود (۴۶). در پژوهش‌های قبلی مشاهده شد که فعالیت این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ۷، ۱۰ و ۴۵ روز پـــس از ایجـــادBDL کـــاهش می‌یابد(۴۹-۴۷ و ۴۳). کیم (۵۰) و پـارولا(۵۱) گـزارش دادند که فعالیت CAT و SOD به سرعت در پی جراحی BDLافزایش می‌یابد. نتایج مطالعه حاضر در تطابق بـا مطالعه کیم نشان داد که فعالیت آنـزیم CAT در گـروه کلستاتیک نسبت به گروه کنتـرل بـه طـور معنـی‌داری افزایش نشان داد، در حالی که فعالیـت GPX بـه طـور معنـی‌داری کـاهش یافـت. یانـگ نشـان دادنـد کـه رزمارینیـک اسـید در ترکیـب بـا کافئیـک اسـید فعالیت آنـزیم‌هـای آنتـی‌اکسـیدانی CAT، SOD و GPX را در آســـیب کبـــدی القـــا شـــده بـــا t- BHP (tert- butylhydroperoxide) به طور قابل تـوجهی افزایش می‌دهد (۵۲). در حالی کـه در مطالعـه حاضـر تغییرات معنی‌داری در فعالیت ایـن آنـزیم‌هـا مشـاهده نشد. این اخـتلاف ممکـن اسـت ناشـی از نـوع آسـیب کبدی ایجاد شـده، روش مطالعـه و نـوع مکمـل مـورد استفاده باشد.

در مطالعه حاضر محدودیت‌هایی وجود داشت که از جمله آنها مـی‌تـوان بـه مـرگ و میـر بعضـی از رت‌های جراحی شده و منابع مالی ناکافی اشاره کـرد. پیشنهاد می‌شـود در پـژوهش‌هـای بعـدی بـه منظـور مشاهده اثرات آنتی اکسیدانی رزمارینیک اسید از دوز مصرفی بالاتر و تعداد حیوانات بیشتر اسـتفاده شـود. همچنین پیشنهاد می‌شود کـه طـول دوره درمـان نیـز بیشتر شود.

نتیجه‌گیری

اســـتراتژی‌هـــای تغذیـــه‌ای بـــا اســـتفاده از فیتوکمیکال‌های مشتق از گیاه، گزینه‌های قابل قبول در درمان جایگزین یـا مکمـل بـرای بیمـاری‌هـای حـاد و مـــزمن کبـــدی هســـتند. شـــماری از پـــژوهش‌هـــای خصوصیات محافظت کبـدی رزمارینیـک اسـید را در بیماری‌هـای کبـدی مختلـف بـه جـز کلسـتاز بررسـی کرده‌اند. در مطالعه حاضر بـا اسـتفاده از مـدل بسـتن مجرای صفراوی و ایجـاد کلسـتاز اثـرات رزمارینیـک اسید در مقابل اسیب کبدی کلستاتیک بررسـی گردیـد. مشاهده شد که اثرات محافظت کبدی رزمارینیک اسید با بهبود بافت شناسی کبد از جمله کـاهش هیپـرپلازی

مجاری صفراوی و فیبروز و به دنبال آن کاهش آنزیم‌های کبدی همراه بود. با وجود این که طبق زمینه و هدف مطالعه اثرات آنتی‌اکسیدانی رزمارینیک اسید بر این مدل آسیب کبدی بررسی گردید، ولی تغییر معنی‌داری در پارامترهای تعادل اکسیدان مانند PCO و آنتی‌اکسیدان مانند TSH، FRAP و GPX با استفاده از دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم رزمارینیک اسید مشاهده نشد

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی رشته بیوشیمی بالینی با کد اخلاق IR.YUMS.REC.1396.129 دانشگاه علوم پزشکی یاسوج می‌باشد. بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج جهت حمایت از این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1.Lin SY, Wang YY, Chen WY, Liao SL, Chou ST, Yang CP, et al. Hepatoprotective activities of rosmarinic acid against extrahepatic cholestasis in rats. Food and Chemical Toxicology 2017; 108: 214-23.
2.Shen K, Feng X, Pan H, Zhang F, Xie H, Zheng S. Baicalin ameliorates experimental liver cholestasis in mice by modulation of oxidative stress, inflammation, and NRF2 transcription factor. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2017; 34: 2017.
3.Chen WY, Chen CJ, Liao JW, Mao FC. Chromium attenuates hepatic damage in a rat model of chronic cholestasis. Life Sciences 2009; 84(17-18): 606-14.
4.Lin SY, Wang YY, Chen WY, Chuang YH, Pan PH, Chen CJ. Beneficial effect of quercetin on cholestatic liver injury. The Journal of Nnutritional Biochemistry 2014; 25(11): 1183-95.
5.Ghonem NS, Assis DN, Boyer JL. Fibrates and cholestasis. Hepatology 2015; 62(2): 635-43.
6.Girardin M, Hadengue A, Frossard J-L, Group SICS. High prevalence of cholestasis, with increased conjugated bile acids in inflammatory bowel diseases patients. World Journal of Clinical Cases 2018; 6(4): 44.
7.van Golen RF, Olthof PB, de Haan LR, Coelen RJ, Pechlivanis A, de Keijzer MJ, et al. The pathophysiology of human obstructive cholestasis is mimicked in cholestatic Gold Syrian hamsters. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease 2018; 1864(3): 942-51.
8.Sato K, Marzioni M, Meng F, Francis H, Glaser S, Alpini G. Ductular reaction in liver diseases: pathological mechanisms and translational significances. Hepatology 2019; 69(1): 420-30.
9.Wang YY, Lin SY, Chen WY, Liao SL, Wu CC, Pan PH, et al. Glechoma hederacea extracts attenuate cholestatic liver injury in a bile duct-ligated rat model. Journal of Ethnopharmacology 2017; 204: 58-66.
10.Tokaç M, Taner G, Aydın S, Özkardeş AB, Dündar HZ, Taşlıpınar MY, et al. Protective effects of curcumin against oxidative stress parameters and DNA damage in the livers and kidneys of rats with biliary obstruction. Food and Chemical Toxicology 2013; 61: 28-35.
11.Ezhilarasan D. Oxidative stress is bane in chronic liver diseases: Clinical and experimental perspective. Arab Journal of Gastroenterology 2018; 19(2): 56-64.
12.Lee JY, Lee SH, Kim HJ, Ha JM, Lee SH, Lee JH, et al. The preventive inhibition of chondroitin sulfate against the CCI 4-Induced oxidative stress of subcellular level. Archives of Pharmacal Research 2004; 27(3): 340.
13.Salmaninejad A, Kangari P, Shakoori A. Oxidative stress: development and progression of breast cancer. Tehran University Medical Journal TUMS Publications 2017; 75(1): 1-9.
14.Gülçin I, Scozzafava A, Supuran CT, Koksal Z, Turkan F, Çetinkaya S, et al. Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 2016; 31(6): 1698-702.
15.McCue PP, Shetty K. Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 2004; 13(1): 101-6.
16.Pérez-Tortosa V, López-Orenes A, Martínez-Pérez A, Ferrer MA, Calderón AA. Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated Thymus membranaceus shoots. Food Chemistry 2012; 130(2): 362-9.
17.Lucarini R, Bernardes WA, Tozatti MG, da Silva Filho AA, Andrade ML, Momo C, et al. Hepatoprotective effect of Rosmarinus officinalis and rosmarinic acid on acetaminophen-induced liver damage. Emirates Journal of Food and Agriculture 2014: 878-84.
18.Li GS, Jiang WL, Tian JW, Qu GW, Zhu HB, Fu FH. In vitro and in vivo antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis. Phytomedicine 2010; 17(3-4): 282-8.
19.Jayanthy G, Subramanian S. Rosmarinic acid, a polyphenol, ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet–STZ induced experimental diabetes mellitus. Biomedicine & Preventive Nutrition 2014; 4(3): 431-7.
20.Amoah SK, Sandjo LP, Kratz JM, Biavatti MW. Rosmarinic acid–pharmaceutical and clinical aspects. Planta Medica 2016; 82(05): 388-406.
21.Saleh H, Soliman AM, Mohamed AS, Marie M-AS. Antioxidant effect of sepia ink extract on extrahepatic cholestasis induced by bile duct ligation in rats. Biomedical and Environmental Sciences 2015; 28(8): 582-94.
22.Terzioglu D, Uslu L, Simsek G, Atukeren P, Erman H, Gelisgen R, et al. The effects of hyperbaric oxygen treatment on total antioxidant capacity and prolidase activity after bile duct ligation in rats. Journal of Investigative Surgery 2017; 30(6): 376-82.

23.Doustimotlagh AH, Dehpour AR, Etemad-Moghadam S, Alaeddini M, Kheirandish Y, Golestani A. Nitrergic and opioidergic systems affect radiographic density and histomorphometric indices in bile-duct-ligated cirrhotic rats. Histol Histopathol 2017; 32(7): 743-9.
24.Doustimotlagh AH, Dehpour AR, Etemad-Moghadam S, Alaeddini M, Ostadhadi S, Golestani A. A study on OPG/RANK/RANKL axis in osteoporotic bile duct-ligated rats and the involvement of nitrergic and opioidergic systems. Research in Pharmaceutical Sciences 2018; 13(3): 239.
25.Lou K, Yang M, Duan E, Zhao J, Yu C, Zhang R, et al. Rosmarinic acid stimulates liver regeneration through the mTOR pathway. Phytomedicine 2016; 23(13): 1574-82.
26.Kholari FS, Dehpour AR, Nourbakhsh M, Doustimotlagh AH, Bagherieh M, Golestani A. Erythrocytes membrane alterations reflecting liver damage in CCl_4-induced cirrhotic rats: the ameliorative effect of naltrexone. Acta Medica Iranica 2016; 54(10): 631-9.
27.Doustimotlagh AH, Dehpour AR, Nourbakhsh M, Golestani A. Alteration in membrane protein, antioxidant status and hexokinase activity in erythrocytes of CCl4-induced cirrhotic rats. Acta Medica Iranica 2014: 23: 795-803.
28.Sadeghi H, Azarmehr N, Razmkhah F, Sadeghi H, Danaei N, Omidifar N, et al. The hydroalcoholic extract of watercress attenuates protein oxidation, oxidative stress, and liver damage after bile duct ligation in rats. Journal of Cellular Biochemistry 2019; 120(9): 14875-84.
29.Ostadhadi S, Jahanabadi S, Javadi S, Saadaei H, Zolfaghari S, Dehpour AR. The involvement of nitric oxide in antidepressant-like effect of metformin after bile-duct. ligation in NMRI Mice 2015; 34: 55.
30.Bom APA, Rangel LP, Costa DC, de Oliveira GA, Sanches D, Braga CA, et al. Mutant p53 aggregates into prion-like amyloid oligomers and fibrils implications for cancer. Journal of Biological Chemistry 2012; 287(33): 28152-62.
31.de la Rosa LC, Vrenken TE, Buist-Homan M, Faber KN, Moshage H. Metformin protects primary rat hepatocytes against oxidative stress-induced apoptosis. Pharmacology Research & Perspectives 2015; 3(2): 25.
32.Lucarini R, Bernardes WA, Ferreira DS, Tozatti MG, Furtado R, Bastos JK, et al. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of Rosmarinus officinalis aqueous extracts, rosmarinic acid and its acetyl ester derivative. Pharmaceutical Biology 2013; 51(9): 1087-90.
33.Ohta Y, Imai Y, Matsura T, Yamada K, Tokunaga K. Successively postadministered melatonin prevents disruption of hepatic antioxidant status in rats with bile duct ligation. Journal of Pineal Research 2005; 39(4): 367-74.
34.Alaca N, Özbeyli D, Uslu S, Şahin HH, Yiğittürk G, Kurtel H, et al. Treatment with milk thistle extract (Silybum marianum), ursodeoxycholic acid, or their combination attenuates cholestatic liver injury in rats: Role of the hepatic stem cells. Turk J Gastroenterol 2017; 28(6): 476-84.
35.Lui F. Laboratory tests in liver failure. Anaesthesia & Intensive Care Medicine 2018; 19(1): 1-3.
36.Wen YA, Liu D, Zhou QY, Huang SF, Luo P, Xiang Y, et al. Biliary intervention aggravates cholestatic liver injury, and induces hepatic inflammation, proliferation and fibrogenesis in BDL mice. Experimental and Toxicologic Pathology 2011; 63(3): 277-84.
37.Zhu L, Wang L, Cao F, Liu P, Bao H, Yan Y, et al. Modulation of transport and metabolism of bile acids and bilirubin by chlorogenic acid against hepatotoxicity and cholestasis in bile duct ligation rats: involvement of SIRT1-mediated deacetylation of FXR and PGC-1α. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences 2018; 25(3): 195-205.
38.Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutrition Research 2003; 23(12): 1719-26.
39.Bayr H. Reactive oxygen species. Critical Care Medicine 2005; 33(12): S498-S501.
40.Sokolovic D, Nikolic J, Kocic G, Jevtovic-Stoimenov T, Veljkovic A, Stojanovic M, et al. The effect of ursodeoxycholic acid on oxidative stress level and DNase activity in rat liver after bile duct ligation. Drug and Chemical Toxicology 2013; 36(2): 141-8.
41.Kabirifar R, Safari F, Karimollah A, Moradi A, Eskandari-nasab E. Quercetin protects liver injury induced by bile duct ligation via attenuation of Rac1 and NADPH oxidase1 expression in rats. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International 2017; 16(1): 88-95.
42.Doustimotlagh AH, Dehpour AR, Golestani A. Involvement of nitrergic and opioidergic systems in the oxidative stress induced by BDL rats. Journal of Advances in Medicine and Medical Research 2016: 5: 1-10.
43.Sadeghi H, Jahanbazi F, Sadeghi H, Omidifar N, Alipoor B, Kokhdan EP, et al. Metformin attenuates oxidative stress and liver damage after bile duct ligation in rats. Research in Pharmaceutical Sciences 2019; 14(2): 122.

44.Copple BL, Jaeschke H, Klaassen CD, editors. Oxidative stress and the pathogenesis of cholestasis. Seminars in liver Disease 2010; 30: 1-10.
45.Brioukhanov AL, Netrusov RI. The catalase and superoxide dismutase genes are transcriptionally up-regulated upon oxidative stress in the strictly anaerobic archaeon Methanosarcina barkeri. Microbiology 2006; 152(Pt 6): 1671-7.
46.Prasad PR, Singh RJ. Butcher S. Structure and Antioxidant Activity of Cyclohexene-Fused Selenuranes and Related Derivatives. Molecules 2015; 20(7): 12670-85.
47.Orellana M. Bile duct ligation and oxidative stress in the rat: effects in liver and kidney. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2000; 126(2): 105-11.
48.Ale-Ebrahim M. Hepatoprotective and antifibrotic effects of sodium molybdate in a rat model of bile duct ligation. J Trace Elem Med Biol 2015; 29: 242-8.
49.Mansourian MH, Sadeghi AH. Doustimotlagh. Activation of the Glutathione Peroxidase by Metformin in the Bile-duct Ligation induced Liver Injury: In vivo Combined with Molecular Docking Studies. Curr Pharm Des 2018; 24(27): 3256-63.
50.Kim HG. CGX, a multiple herbal drug, improves cholestatic liver fibrosis in a bile duct ligation-induced rat model. Journal of Ethnopharmacology 2013; 145(2): 653-62.
51.Parola MaGR. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. Journal of Hepatology 2001; 35(2): 297-306.
52.Yang SY. The hepatoprotection of caffeic acid and rosmarinic acid, major compounds of Perilla frutescens, against t-BHP-induced oxidative liver damage. Food Chem Toxicol 2013:55: 92-9.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Hepatoprotective and Antioxidative Effect of Rosmarinic Acid Against Bile Duct Ligated (BDL)-Induced Cholestatic in Male Rats

Azarmehr N[1], Bardestani F[1], Jafari M[2], Dousti Motlagh AH[3]*

[1]Student Research Committee, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [2]Cellular and Molecular Research Centers, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, [3]Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 11 May 2019 Accepted: 21 July 2019

Abstract

Background & Aim: Cholestasis is a type of liver disease due to structural damage and dysfunction of hepatobiliary system which at first results in accumulation of bile acids and other toxins in plasma and hepatic tissue. The aim of the current study was to investigate the possible hepatoprotective effects of rosmarinic acid against oxidative stress and liver injury in bile duct ligation (BDL)- induced cholestatic rats.

Methods: In the present experimental study, twenty-four male Wistar rats (200±25 g) were randomly divided into three groups; control (N=6), cholestatic (N=9), cholestatic + rosmarinic acid at dose of 20 mg/kg/day (N=9). Biochemical tests (including aspartate amino transferase, AST; alanine amino transferase, ALT; alkaline phosphatase, ALP), oxidative stress markers (such as protein carbonyl, PCO; total thiol, TSH and ferric reducing antioxidant capacity; FRAP) and antioxidant enzymes (including catalase, CAT; super oxide dismutase, SOD; and glutathione peroxidase, GPx) activity were estimated. Also, hematoxylin and eosin staining were determined in the hepatic tissue.

Results: There was a significant increase in AST, ALT, ALP and CAT activity, as well as plasma PCO and FRAP level in cholestatic group as compared to control rats, while the level of TSH, FRAP and GPX in hepatic tissue significantly decreased ($P < 0.05$). Administration of the rosmarinic acid in the cholestatic group significantly decreased activity of ALT and ALP, however it had no a significant effect on oxidative stress markers. As determined by hematoxylin and eosin staining, BDL considerably induced the liver necrosis which markedly alleviated by rosmarinic acid.

Conclusions: In summary, the results indicated that rosmarinic acid administration attenuated liver damage in BDL rats by decreasing common biochemical tests such as ALT, ALP activity and histopathological indexes. However, in spite of significant increase in oxidative stress markers such as PCO and the significant reduction of TSH, FRAP and GPX in the BDL group, rosmarinic acid at a dose of 20 mg /kg had no significant effect on these oxidant/ antioxidant balance parameters.

Keywords: Liver, Cholestasis, Bile duct ligation, Rosmarinic acid

***Corresponding author: Dousti Motlagh AH,** Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.
Email: amirhosseindoustimotlagh@gmail.com

Please cite this article as follows:
Azarmehr N, Bardestani F, Jafari M, Dousti Motlagh AH. Hepatoprotective and Antioxidative Effect of Rosmarinic Acid Against Bile Duct Ligated (BDL)-Induced Cholestatic in Male Rats. Armaghane-danesh 2020; 24(6): 1039-1053.