

اثر محافظت کبدی عصاره هیدروالکلی چتر گندمی رفیع (*Bupleurumexalatum*) بر آسیب های ناشی از تتراکلریدکربن در موش های صحرائی نر

سحر روزبهی^۱، نعمت الله رزمی^۱، مهدی اکبرتبار طوری^۲، هیبت الله صادقی^{۳*}

^۱گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، فارس، ایران، ^۲مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، ^۳مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۳/۴/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۱۵

چکیده:

مقدمه و هدف: برخی از ترکیب های طبیعی و سنتتیک دارای خواص آنتی اکسیدانی می باشند که در محافظت از کبد در مقابل عوامل مخرب نقش مهمی را دارند. هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظت کبدی عصاره هیدروالکلی چتر گندمی رفیع در موش های صحرائی بود.

روش بررسی: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۲ در دانشگاه علوم پزشکی یاسوج بر روی ۵۰ سر موش صحرائی نر بالغ و سالم از نژاد ویستار انجام شد. موش ها به طور تصادفی به ۵ گروه مساوی شامل: گروه شاهد (دریافت کننده روغن زیتون)، گروه کنترل (دریافت کننده روغن زیتون و تتراکلرید کربن) و سه گروه آزمون (دریافت کننده روغن زیتون و تتراکلرید کربن) تقسیم شدند. به موش های گروه های آزمون به ترتیب عصاره گیاه چتر گندمی رفیع با دوزهای ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن به صورت گاوژ داده شد. بعد از دو ماه میزان آنزیم های کبدی، پروتئین تام، آلبومین و بیلی روبین سرم موش ها اندازه گیری شدند. مطالعه های هیستوپاتولوژی کبد موش ها نیز انجام گرفت. داده ها با آزمون های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: در گروه CCl₄ افزایش قابل توجهی در سطوح سرمی آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز، بیلی روبین تام، بیلی روبین مستقیم و کاهش قابل توجهی در سطح سرمی توتال پروتئین و آلبومین در مقایسه با گروه نرمال مشاهده شد ($P < 0.05$). عصاره هیدروالکلی گیاه چتر گندمی رفیع در هر سه دوز باعث کاهش سطوح آنزیم های کبدی، بیلی روبین گردید، در حالی که توتال پروتئین و آلبومین در مقایسه با گروه هیپاتوتوکسیک افزایش یافت ($P < 0.05$). بیشترین میزان کاهش در آنزیم های کبدی و بیلی روبین تام مربوط به دوز ۳۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش ها بود و همین طور بیشترین افزایش در غلظت سرمی پروتئین تام و آلبومین نیز مربوط به همین دوز بود.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که عصاره هیدرو الکی گیاه چتر گندمی رفیع دارای اثر محافظت کبدی قابل توجهی در موش های هیپاتوتوکسیک شده به وسیله CCl₄ است که به ترکیب های آنتی اکسیدانی این گیاه نسبت داده می شود.

واژه های کلیدی: چتر گندمی رفیع، محافظت کبدی، تتراکلریدکربن، آنتی اکسیدان

* نویسنده مسئول: هیبت الله صادقی، یاسوج، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج

مقدمه

کبد یکی از ارگان‌های حیاتی با چندین مسئولیت مهم هموستتازی است. از این رو در سیستم‌های فیزیولوژیکی اهمیت دارد. یکی از عملکردهای اولیه و اساسی کبد کمک به متابولیسم مواد هضم شده از جمله؛ مواد غذایی، مکمل‌های غذایی، الکل و اکثریت داروها است. با این حال، عوامل متعددی که باعث عوارض کبدی متوسط تا شدید می‌شوند شناخته شده‌اند. برخی ترکیب‌ها از جمله داروهای بالینی مفید می‌توانند از طریق فعال‌سازی ترکیب‌های اولیه متابولیک به مواد شدیداً واکنش‌پذیر و همچنین از طریق تحریک تولید رادیکال‌های آزاد مشتق از اکسیژن باعث آسیب کبدی بشوند. اگر این داروها (مثل داروهای ضد سل و غیره) بیش از حد و یا به مدت طولانی مورد مصرف قرار بگیرند، افراد کبدی با عملکرد ضعیف خواهند داشت و به شدت از این دارو رنج خواهند برد که به علت مشکلات کبدی غیر قابل پیش‌بینی است. گزارش شده است که این داروها می‌توانند انواع مختلفی از آسیب‌های کبدی را باعث شوند، که شامل عملکرد غیر طبیعی خفیف مثل افزایش فعالیت آمینوترانسفرازهای سرم تا صدمات شدید ارگان مثل نکروز هپاتوسلولار یا کلاستاز داخل کبدی می‌باشد(۱). آسیب کبدی همیشه همراه با نکروز سلولی، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش در سطوح گلوکوتیون احیاء بافت است. علاوه بر این سطوح سرمی بسیاری از مارکرهای بیوشیمیایی مانند

آلانین آمینوترانسفراز و آسپارات آمینوترانسفراز، گاما گلوتامیل ترانس پپتیداز، تری گلیسیرید، کلسترول، بیلی‌روبین و آلکالین فسفاتاز بالا می‌رود و سنتز آلبومین و توتال پروتئین کاهش می‌یابد. علی‌رغم پیشرفت فوق‌العاده طب مدرن، داروهای سنتتیک کمی برای درمان اختلالات کبدی وجود دارد. با این حال ادعا می‌شود که گیاهان متعددی وجود دارند که فعالیت سودمند در درمان اختلالات کبدی را دارا می‌باشند(۲ و ۳)، اما این گیاهان نیاز دارند تا از نظر علمی برای اطمینان از توانایی خود به منظور حفظ اثر درمانی، تأیید شوند.

Bupleurum یک گروه بزرگ و قابل شناسایی از خانواده *Apiaceae* است که بیش از ۱۹۰-۱۸۰ گونه دارد(۴). گیاه چتر گندمی رفیع^(۱) گیاهی چند ساله و با ساقه‌های نازک و شکننده، برگ‌ها خطی باریک‌اند، برگ‌ها ۵ تایی، بیضوی یا سرنیزه‌ای هستند. گل‌برگ‌ها زرد کم‌رنگ، میوه‌ها به طول ۳-۵ میلی‌متر، تخم مرغی یا مستطیلی بیضوی می‌باشد. فصل گل و میوه‌دهی این گیاه تابستان است. این گیاه در اغلب نقاط ایران یافت می‌شوند(۵). *Bupleurum* یک گیاه سنتی چینی است که قدمت آن به قرن اول قبل از میلاد می‌رسد و یکی از شایع‌ترین گیاهان مورد استفاده در طب سنتی چینی است و بخش جدایی‌ناپذیر بسیاری از داروهای طب کامپو می‌باشد(۶ و ۷). *Bupleurum* را به عنوان یک ضد التهاب و ضد تب و همچنین برای

1- *B. exelatum*

سایکوساپونین‌های a و d دو ترکیب‌اند که از ریشه *Bupleurum* مشتق شده‌اند و نشان داده شده که اعمال ضد سرطانی دارند با این حال اثر ترکیبی سایکوساپونین با داروهای شیمی درمانی بر روی سلول‌های سرطانی هرگز کار نشده بود، پس نتایج نشان دادند که اثر ترکیبی سایکوساپونین‌های a و d و سیس پلاتین بر روی سلول‌های سرطانی می‌تواند دارای یک اثر درمانی مؤثر و مفید باشد (۱۳).

در مطالعه پری‌تو و همکاران، اثر عصاره متانولی بخش‌های هوایی *Bupleurum fruticosens* را در مهار سیکلوآکسیژنازها و لیپوآکسیژنازها مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان دادند که این عصاره باعث مهار سیکلوآکسیژنازها و لیپوآکسیژنازها می‌شوند (۱۴).

در مطالعه جین کیان یو و همکاران، ۵ Saikosaponin جدید b1, e, b2 و w را از ریشه *Bupleurum chinense* جدا کردند و بر اساس آنالیز دقیق اسپکتروسکوپی ساختار آنها را مشخص کردند و بعد در محیط *invitro* اثر این سایکوساپونین‌ها را روی استئوکلاست‌ها بررسی کردند و نتایج نشان داد که این مواد فعالیت مهار کننده استئوکلاست‌ها را دارا می‌باشند (۱۵).

گونه دیگری از این گیاه به نام *Bupleurum falcatum* قبلاً مورد مطالعه قرار گرفته و امروز به عنوان یک مکمل دارویی برای آسیب‌های کبدی در بازار وجود داد (۱۶) در این مطالعه از ریشه

برطرف کردن احساس درد در قفسه سینه به کار می‌برند (۸). از *Bupleurum* برای درمان هپاتیت در کودکان و بزرگسالان استفاده می‌شود (۹). از ترکیب‌های شیمیایی اصلی مشخص شده در *Bupleurum* می‌توان ساپونین‌ها، کومارین‌ها، پلی‌ساکاریدها، اسیدهای چرب، فلاونوئیدها، استروئیدها و لیگنان‌ها را نام برد (۱۰). با توجه به این که فلاونوئیدها، لیگنان‌ها و ساپونین‌های موجود در این گیاه خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند و همچنین مطالعه‌های بسیاری بر روی گونه‌های مختلف این گیاه انجام شده که این مطلب را تأیید می‌کند. در مطالعه چنگ و همکاران، ارتباط میان ریشه *Bupleurum* و آسیب کبدی در بیماران مبتلا به هپاتیت B را بررسی کردند، نتایج نشان دادند که فرمول گیاهی CHPS حاوی ریشه *Bupleurum* به کاهش سمیت کبدی کمک می‌کند و در بیماران مبتلا به هپاتیت B و ویروسی مؤثر است (۱۱).

در مطالعه یو و همکاران، اثر عصاره *Bupleurum Scorzonifolium* و *Bupleurum Longiradiatum* را در موش‌های مبتلا به سرطان ریه بررسی کردند، نتایج نشان دادند که عصاره این گیاهان اثر ضد تکثیری وابسته به دوز در رشد تومور و ضد رگ‌زایی در تومور دارند (۱۲).

در مطالعه کیونگ وانگ و همکاران، اثر Saikosaponin های a و d به همراه سیس پلاتین را بر روی سلول‌های سرطانی بررسی کردند،

Bupleurum falcatum استفاده شد. رویش گیاه *Bupleurum exelatum* در ایران و در منطقه کهگیلویه بسیار بیشتر از گیاه *Bupleurum falcatum* است و به علاوه استفاده از بخش‌های هوایی گیاه آسیبی به بقای گیاهان نمیزند. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی نقش آنتی‌اکسیدانی و محافظت کبدی عصاره بخش‌های هوایی گیاه چتر گندمی رفیع بر آسیب‌های ناشی از مصرف تراکلرید کربن در موش‌های صحرایی می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی بر روی ۵۰ سر موش صحرایی نر بالغ و سالم از نژاد ویستار در سال ۱۳۹۲ در دانشگاه علوم پزشکی یاسوج انجام شد. بخش‌های هوایی گیاه چتر گندمی رفیع را در اواخر فصل بهار در سال ۱۳۹۲ از کوه‌های اطراف شهر یاسوج مرکز استان کهگیلویه و بویراحمد جمع‌آوری و در شرایط مناسب، دور از نور آفتاب خشک و پودر شد. ۶۰۰ گرم پودر گیاه در اتانول ۷۰ درصد خیسانده شد و در انکوباتور ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. پس از صاف کردن عصاره با کاغذ صافی اتانول موجود به وسیله دستگاه تقطیر در خلاء تبخیر گردید. بعد از تغلیظ نسبی، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کاملاً تغلیظ و اتانول آن تبخیر شود. عصاره به دست آمده برای

دوزهای مورد نیاز توزین و در آب مقطر به خوبی حل و مورد استفاده قرار گرفت (۱۷ و ۱۸).

۵۰ سر موش‌های صحرایی آلبینو نر از نژاد ویستار و با وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم از انیستیتو پاستور شیراز خریداری و به حیوان‌خانه دانشکده پزشکی یاسوج منتقل گردید. حیوانات به صورت چرخه ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری که از نظر رژیم غذایی و آب محدودیتی نداشتند. بعد از یک هفته سازگاری حیوانات با شرایط جدید، موش‌ها به طور تصادفی به پنج گروه ده تایی تقسیم شدند. گروه نرمال (شاهد)؛ در این گروه هفته‌ای دو بار به مدت ۲ ماه به صورت درون صفاقی، روغن زیتون تزریق و هم‌زمان با تجویز عصاره به سایر گروه‌های آزمون، به این گروه نیز آب مقطر گاوآژ شد (۱۷ و ۱۸).

گروه CCl_4 (کنترل)، در این گروه هفته‌ای دو بار به مدت ۲ ماه به صورت درون صفاقی، محلول روغن زیتون و CCl_4 (به نسبت ۵۰:۵۰)، به میزان ۱ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم)، تزریق شد. به این گروه هم، هم‌زمان با تجویز عصاره به سایر گروه‌های آزمون، آب مقطر گاوآژ شد.

گروه‌های آزمون I، II، III؛ در این سه گروه تزریق درون صفاقی محلول CCl_4 و روغن زیتون (به نسبت ۵۰:۵۰)، هفته‌ای دو بار به مدت ۲ ماه به طور هم‌زمان انجام شد. عصاره گیاه چتر گندمی رفیع در

شد. نمونه برش‌های کبدی گروه‌های مختلف بررسی و با همدیگر مقایسه شد. هم‌چنین قبل از تثبیت در فرمالین کبد موش‌ها براساس تغییرات مورفولوژیکی از جمله؛ سختی کبد، تغییر رنگ، افزایش نسبت وزن کبد به وزن موش در گروه کنترل نسبت به گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفت (۱۷).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

فعالیت آنزیم‌های آسپارات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز در موش‌های هپاتوتوکسیک (گروه کنترل) در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$)، ولی فعالیت آنزیم‌های آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز در تمام گروه‌های آزمون I، II و III که عصاره گیاه چتر گندمی رفیع را دریافت و هم‌زمان با تراکلرید کربن توکسیک شده بودند، نسبت به گروه کنترل که تنها تراکلرید کربن می‌گرفت، کاهش معنی‌داری یافته‌اند ($p < 0.05$). علاوه بر این نتایج نشان دادند که فعالیت این آنزیم‌ها در گروه آزمون III (دریافت کننده دوز بالای ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش) کاهش بهتری نسبت به سایر گروه‌های آزمون داشته است (جدول ۱).

دوزهای ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش‌ها هر روز و به مدت ۲ ماه گاوژ شد (۱۷ و ۱۸).

دو ماه بعد از شروع مطالعه، موش‌ها با دی‌اتیل‌اتر بیهوش و از قلب آنها خون‌گیری شد. کبد موش‌ها به صورت کامل از بدن جدا و بعد از اندازه‌گیری وزن آنها، لب چپ کبدی برای مطالعه‌های هیستوپاتولوژی در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری گردید. نمونه خون‌های به دست آمده ۲۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه نگهداری و بعد از لخته‌گیری به مدت ۱۵ دقیقه با ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سرم هر لوله جمع‌آوری و به وسیله کیت‌های پارس آزمون شدند (۲۰ و ۱۹).

محتوای توتال فنلی گیاه چتر گندمی رفیع با استفاده از معرف Foline Ciocalteu با استفاده از منحنی استاندارد کالیبراسیون اسید گالیک تعیین شد (۲۱ و ۲۲). اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از *DPPH scavenging assay* طبق روش شرح داده شده به وسیله براکا و همکارانش محاسبه گردید (۲۳ و ۲۴).

برای انجام مطالعه هیستوپاتولوژیکی کبد موش‌ها در فرمالین ۱۰ تثبیت گردید. سکشن‌های مناسب تهیه و بعد از پارافین‌زدایی و آب‌زدایی به وسیله دستگاه Tissue process، قالب‌گیری نمونه‌ها صورت گرفت. برش‌های مناسب با میکروتوم تهیه، لام‌گیری و با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین رنگ

سطوح بیلی روبین تام و بیلی روبین کنژوگه در گروهی که CCl_4 را به تنهایی دریافت کرده‌اند (گروه کنترل) در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری را نشان می‌داد ($p < 0/05$). میانگین غلظت بیلی روبین تام و بیلی روبین کنژوگه سرم در گروه‌های آزمون I، II و III که عصاره گیاه چتر گندمی رفیع را دریافت می‌کردند و هم‌زمان با تتراکلرید کربن توکسیک شده بودند، نسبت به گروه کنترل که تنها تتراکلرید کربن می‌گرفت، کاهش قابل ملاحظه‌ای داشته است ($p < 0/05$).

میانگین غلظت پروتئین تام سرم در گروهی که CCl_4 را به تنهایی دریافت کرده‌اند (گروه کنترل) در مقایسه با گروه شاهد کاهش داشته است، اما داده‌ها تفاوت معنی داری را نشان نمی‌دهند ($p > 0/05$). میانگین غلظت پروتئین تام سرم در گروه‌های آزمون I، II و III که عصاره گیاه چتر گندمی رفیع را دریافت می‌کردند و هم‌زمان با تتراکلرید کربن توکسیک شده بودند، نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است که این افزایش غلظت پروتئین تام در گروه‌های آزمون I و II تفاوت معنی داری را نشان نمی‌دهد ($p > 0/05$)، اما این افزایش غلظت پروتئین تام سرم در گروه آزمون III نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد ($p < 0/05$).

میانگین غلظت آلبومین سرم در گروهی که CCl_4 را به تنهایی دریافت کرده‌اند (گروه کنترل) در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی داری داشته است ($p < 0/05$)، اما میانگین غلظت آلبومین سرم در

گروه‌های آزمون I، II و III که عصاره گیاه چتر گندمی رفیع را دریافت می‌کردند و هم‌زمان با تتراکلرید کربن توکسیک شده بودند، نسبت به گروه کنترل که تنها تتراکلرید کربن می‌گرفت، افزایش معنی داری داشته است ($p < 0/05$) (جدول ۲).

محتوای توتال فنلی عصاره گیاه *Bupleurum exelatum* برابر ۱۱۵/۵ میکرو گرم گالیک اسید بر گرم عصاره بود.

میانگین IC_{50} برای فعالیت DPPH radical scavenging از عصاره هیپروالکلی *Bupleurum exelatum* برابر ۴۹۸۰/۲ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود (جدول ۳).

تغییرات مرفولوژیکی سختی کبد، تغییر رنگ، افزایش نسبت وزن کبد به وزن موش در گروه کنترل نسبت به گروه شاهد را نشان دادند. هم‌چنین نمونه‌های پاتولوژی بیانگر ایجاد نکروز، واکوئل شدن کبد و التهاب سلول‌های کبدی در گروه کنترل نسبت به گروه شاهد می‌باشد. علاوه بر این مطالعه‌های هیستوپاتولوژی نشان دادند که تیمار موش‌ها به وسیله عصاره گیاه چتر گندمی رفیع در گروه‌های آزمون وضعیت سلول‌های کبدی از جمله التهاب در سلول‌ها و میزان واکوئل شدن سلول‌های کبدی را به صورت وابسته به دوز کاهش داده است. البته در گروه آزمون III که عصاره با دوز بالا را دریافت کرده بودند کمترین شدت آسیب سلول‌های کبدی را نسبت به گروه کنترل بیمار نشان دادند (تصویر ۱).

جدول ۱: مقایسه میانگین و انحراف معیار غلظت آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز، آسپارات آمینو ترانسفراز، آلکالین فسفاتاز

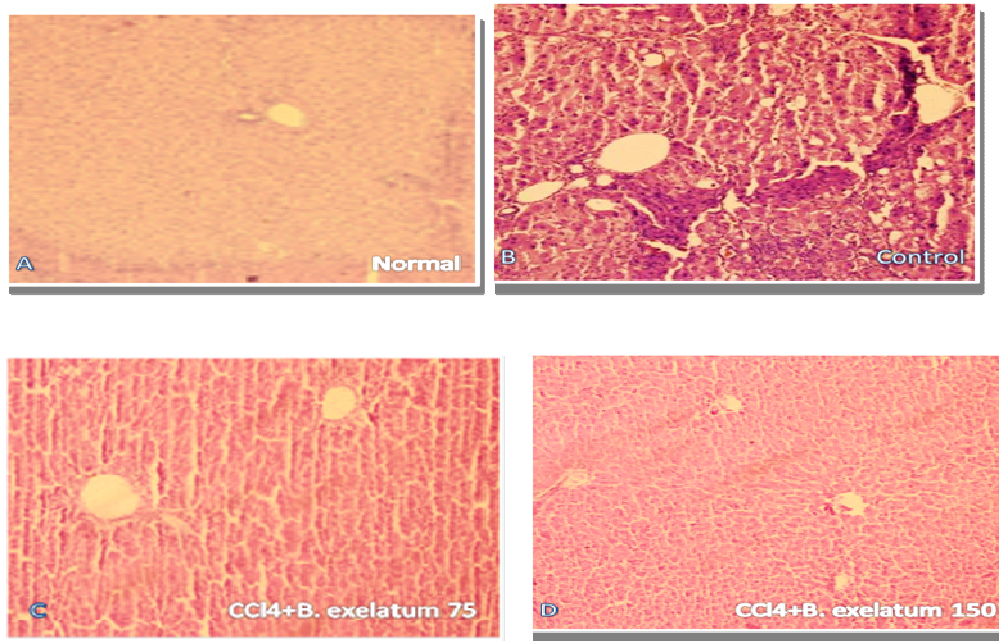
گروه	آنزیم	آلانین آمینو ترانسفراز (واحد بین المللی بر لیتر) انحراف معیار ± میانگین	آسپارات آمینو ترانسفراز (واحد بین المللی بر لیتر) انحراف معیار ± میانگین	آلکالین فسفاتاز (واحد بین المللی بر لیتر) انحراف معیار ± میانگین
شاهد		۷۶ ± ۴	۱۴۶/۵۷ ± ۱۸/۳۷	۲۵۹/۴۳ ± ۴۴
کنترل		۱۶۷/۲۲ ± ۲۱/۴۱ ^a	۲۵۲ ± ۳۲/۴۶ ^a	۵۹۱/۴۳ ± ۴۶/۹۹ ^a
آزمون یک		۱۲۳/۲۹ ± ۸/۶۹	۲۱۴ ± ۲۲/۳	۵۲۹/۴۳ ± ۴۵/۸۴
آزمون دوم		۱۱۲/۲۹ ± ۶/۰۷ ^b	۱۸۳/۴۳ ± ۱۳/۶۹ ^b	۴۷۹/۱۴ ± ۲۱/۰۲ ^b
آزمون سوم		۸۴/۴۳ ± ۱۳/۸۶ ^{b,c}	۱۴۴ ± ۱۳/۵۶ ^{b,c}	۳۲۲/۹۲ ± ۱۴۱/۸۸ ^{b,c}

جدول ۲: مقایسه میانگین تغییرات سطح سرمی غلظت پروتئین تام، آلبومین، بیلی روبین تام و بیلی روبین مستقیم در گروه های مورد مطالعه.

گروه	پروتئین تام (گرم بر دسی لیتر) انحراف معیار ± میانگین	آلبومین (گرم بر دسی لیتر) انحراف معیار ± میانگین	بیلی روبین تام (گرم بر دسی لیتر) انحراف معیار ± میانگین	بیلی روبین مستقیم (گرم بر دسی لیتر) انحراف معیار ± میانگین
شاهد	۶/۹۵ ± ۰/۳۲	۳/۲۵ ± ۰/۱۵	۰/۱۵ ± ۰/۰۲	۰/۰۵۱ ± ۰/۰۱۱
کنترل	۶/۳۴ ± ۰/۲۴	۲/۶ ± ۰/۲۲	۰/۷۶ ± ۰/۱۴	۰/۱۶۵ ± ۰/۰۵
آزمون یک	۷ ± ۰/۴۵	۳/۳۴ ± ۰/۲۱	۰/۱۷ ± ۰/۰۳	۰/۰۴۵ ± ۰/۰۱۵
آزمون دوم	۷/۰۷ ± ۰/۳۸	۳/۳۸ ± ۰/۲۱	۰/۱۶۱ ± ۰/۰۲۹	۰/۰۴۸ ± ۰/۰۱۷
آزمون سوم	۷/۳۷ ± ۰/۵۰	۳/۵۲ ± ۰/۳۷	۰/۱۵۴ ± ۰/۰۵۳	۰/۰۵۷ ± ۰/۰۱۳

جدول ۳: فعالیت آنٹی اکسیدانی گیاه چتر گندمی رفیع

دارو	جذب/ فعالیت بدام انداختن رادیکال				غلظت (میکروگرم/ میلی لیتر)	غلظت مهارى حداکثر	محتوای توتال فنلی
	۱۰۰	۲۵۰۰	۵۰۰۰	۱۰۰۰۰			
جذب ۱	۰/۴۷	۰/۴۶۴	۰/۱۵۶	۰/۱۰۲			
جذب ۲	۰/۴۳۴	۰/۳۹۷	۰/۲۱	۰/۱۱۱			
جذب ۳	۰/۴۴۱	۰/۴۱۶	۰/۱۹۴	۰/۱۰۷			
فعالیت بدام انداختن رادیکال ۱٪	۱۵/۰۹	۱۵/۶۳	۷۱/۶۳	۸۱/۴۵			
فعالیت بدام انداختن رادیکال ۲٪	۲۱/۰۹	۲۷/۸۱	۶۱/۸۱	۷۹/۸۱			
فعالیت بدام انداختن رادیکال ۳٪	۱۹/۸۱	۲۴/۳۶	۶۴/۷۲	۸۰/۵۴			
چتر گندمی رفیع					۴۹۸۰/۲	۱۱۵/۵	



تصویر ۱: بررسی‌های پاتولوژیکی نمونه‌های کبدی در تمام گروه‌های مورد مطالعه. نمونه‌های پاتولوژی بیانگر ایجاد نکروز، واکوتله شدن کبد و التهاب سلول‌های کبدی در گروه کنترل نسبت به گروه شاهد می‌باشد. علاوه بر این مطالعه‌های هیستوپاتولوژی نشان دادند که تیمار موش‌ها به وسیله عصاره گیاه چتر گندمی رفیع در گروه‌های آزمون وضعیت سلول‌های کبدی از جمله التهاب در سلول‌ها و میزان واکوتله شدن سلول‌های کبدی را به صورت وابسته به دوز کاهش داده است. البته در گروه آزمون III که عصاره با دوز بالا را دریافت کرده بودند کمترین شدت آسیب سلول‌های کبدی را نسبت به گروه کنترل توکسیک بیمار نشان می‌دهد.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که تغییرات میزان

آنزیم‌های کبدی در گروه کنترل (CCl4) نسبت به گروه شاهد (نرمال) افزایش معنی‌داری داشته است، در موش‌هایی که علاوه بر تتراکلریدکربن عصاره گیاه چتر گندمی را نیز دریافت کرده‌اند فعالیت این آنزیم‌ها به صورت وابسته به دوز عصاره در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد است.

تغییرات ناشی از تتراکلریدکربن شبیه بیماری‌های کبدی مزمن ناشی از ویروس‌ها می‌باشد. تتراکلریدکربن به وسیله سیستم سیتوکروم P450 به رادیکال‌های آزاد تری‌کلرومتیل تبدیل می‌شود. رادیکال‌های آزاد تولید شده به طور کووالانسی با غشاءهای سلولی و اندامک‌ها متصل می‌شود و باعث پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع و اختلال

کبد اندام اصلی متابولیسم، ترشح و دفع مواد است و به طور مداوم در معرض انواع مختلف ترکیب‌های درونی و بیرونی قرار می‌گیرد. شیوع بیماری‌های کبدی در جهان رو به گسترش است و داروهای شیمیایی مصنوعی علاوه بر این که کارآیی کاملاً مطمئن در درمان این بیماری‌ها ندارند، اثرات جانبی ناخواسته‌ای را به دنبال دارند، به همین دلیل ضرورت دارد که جایگزین واقعی برای درمان بیماری‌های کبدی به دنیای علم پزشکی وارد شود (۱). بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظت کبدی عصاره گیاه چتر گندمی رفیع در موش‌های صحرایی بود.

دریافت کرده‌اند غلظت بیلی‌روبین توتال و مستقیم در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد است.

کاهش پروتئین تام و آلبومین از جمله علایم پیشرفت بیماری‌های مزمن کبدی است و میزان این کاهش شدت آسیب کبدی را نشان می‌دهد (۲۶). در این مطالعه غلظت پروتئین تام و آلبومین در گروه کنترل که فقط تتراکلرید کربن دریافت نمودند، نسبت به گروه شاهد کاهش پیدا کرده است، که به نظر می‌رسد ناشی از تخریب سلول‌های کبدی می‌باشد، اما در موش‌هایی که علاوه بر تتراکلریدکربن عصاره گیاه چتر گندمی رفیع را نیز دریافت کرده‌اند غلظت پروتئین تام و آلبومین افزایش یافته و به گروه نرمال نزدیک شده است.

تتراکلریدکربن با ایجاد آسیب در سلول‌های کبدی باعث می‌شود فاکتورهای مورد مطالعه در موش‌های گروه کنترل (CCI4) در مقایسه با گروه شاهد تغییرات معنی‌داری نشان دهد، ولی عصاره گیاه چتر گندمی رفیع ضمن کاهش تغییرات ناشی از تجویز تتراکلریدکربن وضعیت فاکتورهای بیوشیمیایی مذکور را به حالت نرمال نزدیک می‌کند. برگشت فعالیت آنزیم‌های کبدی به حالت طبیعی و همچنین کاهش غلظت بیلی‌روبین و افزایش پروتئین تام و آلبومین سرم از شاخص‌های اصلی درمان کبد و بازیابی سلامت این ارگان مهم بدن است.

بررسی‌های هیستوپاتولوژی نمونه‌های کبدی در موش‌های گروه شاهد وجود کبد چرب، از بین

در هموستاز کلسیم و در نهایت مرگ سلولی می‌گردد. رادیکال‌های آزاد حاصل از CCl4 با تخریب غشاء هپاتوسیت افزایش آزادسازی آنزیم‌های کبدی به درون خون را سبب شده و همین عامل باعث شده آنزیم‌هایی که در حالت طبیعی درون سیتوزول سلولی قرار دارند وارد جریان خون شوند و افزایش فعالیت این آنزیم‌ها بیانگر میزان و نوع آسیب‌های کبدی است (۲۴ و ۲۵). کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی و بازگشت آنها به مقادیر نزدیک به حالت نرمال و همچنین کاهش غلظت بیلی‌روبین و افزایش غلظت پروتئین تام و آلبومین از شاخص‌های اصلی درمان کبد و بازیابی سلامت این ارگان مهم در بدن است.

در مطالعه وانگ و همکاران، اثر هپاتوپروتکتیو فرمول گیاهی چینی Longyin Decoction که حاوی ریشه Bupleurum است را روی کبد تخریب شده به وسیله تتراکلریدکربن در جوجه بررسی کردند، نتایج نشان دادند که تغییرات پاتولوژیکال کبد آسیب دیده کاهش یافته و فعالیت‌های آمینوترانسفرازها در سرم به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد و همچنین نکروز کبدی هم کاهش یافت است (۲۶).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غلظت بیلی‌روبین توتال و مستقیم در گروه کنترل که فقط تتراکلرید کربن دریافت نمودند، نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است، که به نظر می‌رسد ناشی از تخریب سلول‌های کبدی به وسیله CCl4 و عدم وجود ماده حفاظتی باشد، ولی در موش‌هایی که علاوه بر تتراکلریدکربن عصاره گیاه چتر گندمی رفیع را نیز

مطالعه‌های بیشتری بر روی ترکیب‌های مؤثره گیاه چتر گندمی رفیع و چگونگی مکانیسم اثر حفاظتی آن بر روی سمیت سلول‌های کبدی ضروری به نظر می‌رسد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی مصوب دانشگاه دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، فارس بود.

رفتن تمامیت هسته سلولی و فیبروزیس را نشان می‌دهد. عدم وجود و یا کاهش این تغییرات در گروه‌هایی که علاوه بر تتراکلریدکربن عصاره گیاه چتر گندمی رفیع را دریافت کرده‌اند بیانگر خاصیت محافظت کبدی این گیاه می‌باشد که ممکن است با تثبیت غشاءهای سلولی صورت گیرد. همچنین عصاره این گیاه از افزایش وزن کبد ناشی از تأثیر تتراکلریدکربن به میزان قابل توجهی جلوگیری می‌کند. نتایج مطالعه آیت الهی و همکاران نشان داد که عصاره الکی گیاه سیلی مارین در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تا حد زیادی از گسترش نکروز کبدی و افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی ناشی از تزریق تتراکلریدکربن جلوگیری به عمل آورده و روند دژنراسیون و ترمیم ضایعه‌های بافتی را به طور چشمگیری بهبود و تسریع می‌بخشد (۲۷). در مطالعه دیگری نشان داده شد که عصاره الکی گیاه فوماریا قادر است، نکروز، تغییرات چربی و تورم هیپاتوسیت‌ها را کاهش دهد این گیاه ممکن است تا حدودی اثرات جمع‌کننده رادیکال‌های آزاد داشته و یا ممکن است تولید آنها را مهار کند (۲۸).

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره گیاه چتر گندمی رفیع اثر محافظت کبدی در برابر آسیب‌های ناشی از مصرف تتراکلریدکربن داشته است که احتمالاً در ارتباط با خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیب‌های موجود در این گیاه می‌باشد.

REFERENCES

1. Chatterjee M, Sarkar K, Sil PC. Herbal (Phyllanthusniruri) protein isolate protects liver from nimesulide induced oxidative stress. *Pathophysiology* 2006; 13(2): 95-102.
2. Ahmed B, Alam T, Khan SA. Hepatoprotective activity of Luffaechinata fruits. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 76(2): 187-9.
3. Ramachandra Setty S, Quereshi AA, ViswanathSwamy A, Patil T, Prakash T, Prabhu K. Hepatoprotective activity of Calotropisprocera flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. *Fitoterapia* 2001; 78(7): 451-4.
4. Hou Song-Dong, Liu Ting-Yu, Pang Yun-Li, Wu Yun-Ke and He Xing-Jin, 2008, Phylogeny and classification of Chinese Bupleurum based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and rps16, *Acta Biologica Sinica Series Botanica*, vol 50(2): 105-116.
5. Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian plant names. Farhang Moaser Publications, Tehran, Iran. 1996.
6. Chang H, But PP, Yao S, Wang L, Shem CY. Pharmacology and applications of Chinese medicinal herbs. World Scientific 1987; 2: 978-97.
7. HX Sun. Haemolytic activities and adjuvant effect of Bupleurum chinensesaponins on the immune responses to ovalbumin in mice. *Vaccine* 2006; 24(9): 1324-31.
8. Ikegami F, Sumino M, Fujii Y, Akiba T, Satoh T. Pharmacology and toxicology of Bupleurum root-containing Kampo medicines in clinical use. *Hum Exp Toxicol* 2006; 25(8): 481-94.
9. Tian RT, Xie PS, Liu HP. Evaluation of traditional Chinese herbal medicine: Chaihu (Bupleuri Radix) by both high-performance liquid chromatographic and high-performance thin-layer chromatographic fingerprint and chemometric analysis. *J Chromatogr A* 2009; 1216(1): 2150-5.
10. Liang H, Zhao Y, Bai Y, Zhang R, Tu G. A new saikosaponin from Bupleurum chinense DC. *Pubmed Yao Xue Xue Bao* 1998; 33(4): 282-5.
11. Lee C, Wang J, Chen P. Risk of Liver Injury Associated with Chinese Herbal Products Containing Radix bupleuri in 639,779 Patients with Hepatitis B Virus Infection. *PLoS ONE* 2011; 6(1): e16064.
12. You YJ, Lee IS, Kim Y, Bae KH, Ahn BZ. Antiangiogenic activity of Bupleurum longiradiatum on human umbilical venous endothelial cells. *Arch Pharm Res* 2002; 25(5): 640-2.
13. Wang Q, Xue-lian Z, Lan Y, Fang S, Lin-bo G, Ying-jia Z, et al. Reactive oxygen species-mediated apoptosis contributes to chemosensitization effect of saikosaponins on cisplatin-induced cytotoxicity in cancer cells. *Fitoterapia* 2010; 29(1): 1756-9966.
14. Prieto JM, Giner RM, Recio MC, Máñez S, Ríos JL. Dual inhibition of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase by aerial part of Bupleurum fruticosum methanol extract. *Fitoterapia* 2004; 75(2): 179-86.
15. Yu J, Deng A, Wu L, Zhang Z, Liu Y, Wang W, et al. Osteoclast-inhibiting saikosaponin derivatives from Bupleurum chinense. *Fitoterapia* 2013; 85: 101-8.
16. Seong-Mo K, Sang-Chan K, In-Kwon C, Woo-Hyun C, Sae-Kwang K. Antioxidant and protective effects of bupleurumfalcatum on the I-thyroxine-induced hyperthyroidism in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012; 1-12.
17. Abe H, Sakaguchi M, Odashima S, Arichi S. Protective effect of saikosaponin-d isolated from bupleurumfalcatum l. on ccl4-induced liver injury in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1982; 320: 266-71.
18. Sadeghi H, Yazdanparast R. Effect of Dendrostella lessertii on the intracellular alkaline phosphatase activity of four human cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 86(1): 11-4.
19. Sadeghi H, Nikbakht MR, Izadpanah G, Sohaila S. Hepatoprotective effect of Cichorium intybus on CCl4-induced liver damage in rat. *African Journal of Biochemistry Research* 2008; 2(6): 141-4.
20. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Foline Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology: Oxidant and Antioxidants*; 1999; 152-177.
21. Rao Ganga B, Rao Umamaheswara P, Rao Sambasiva E, Rao Mallikarjuna T, Praneeth D VS. Studies on phytochemical constituents, quantification of total phenol, alkaloid content and in-vitro anti-oxidant activity of Coccinia cordifolia. *IJPLS* 2011; 2(10): 1177e-82.

22. Braca A, Fico G, Morelli I, De Simone F, Tome F, De Tommasi N. Antioxidant and free radical scavenging activity of flavonol glycosides from different *Aconitum* species. *J Ethnopharmacol* 2003; 86: 63e-7.
23. Murali, Anita; Ashok, Purnima, Madhavan V. In vitro antioxidant activity and HPTLC studies on the roots and rhizomes of *Smilax zeylanica* L. (smilacaceae). *Int J Pharm PharmSci* 2011; 3(1): 192e-5.
24. Haouzi D, Lekehal M, Moreau A, Moulis C, Feldmann G, Robin MA. Cytochrome P450-generated reactive metabolites cause mitochondrial permeability transition, caspase activation, and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 2000; 32(2): 303-11.
25. Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S. Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992; 32(1): 449-70.
26. Wang Ch, Zhang T, Cui X, Li S, Zhao X, Zhong X. Hepatoprotective effects of a Chinese herbal formula, longyin decoction, on carbon-tetrachloride-induced liver injury in chickens. *Evidence-Based Complement Alternat Med* 2013; 1-9.
27. Ayatollahi H, Abbasali O, Kasebi M. Hepatic protection effects of plant *Silybum marianum* on liver toxicity induced by carbon tetrachloride in mice. *Journal of University of Medical Sciences of Gorgan* 2007; 4: 56.
28. JamshidNejad A, Nick nahad H. Hepatic protection effects of plant *Fumaria officinalis* on liver toxicity induced by carbon tetrachloride in rats. *Journal of Medicinal Plants* 2006; 19(5): 34-9.

Hepatoprotective Effects of *Bupleurum exalatum* Extracts against Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury in Rats

Roozbehi S¹, Razmi N¹, Akbartabar Touri M², Sadeghi H^{*3}.

¹Department of Biochemistry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran, ²Social Determinants of Health Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ³Medicinal Plant Research Center, Yasuj university of Medical Sciences Yasuj, Iran

Received: 20 July 2014

Accepted: 6 Dec 2014

Abstract

Background & aim: Some natural and synthetic products have antioxidant properties which protect the liver against the destructive factors. This study aimed to investigate the effect of *Bupleurum exalatum* (*B. exalatum*) extracts on rat liver.

Material and method: The present experimental study was conducted at Yasuj University of Medical Sciences in 2013 on 50 healthy adult male Wistar rats. The animals were randomly divided into five equal groups: the normal group (receiving, olive oil), control and experiment groups receiving different dose of carbon tetrachloride and olive oil. The experiment group was given daily doses of 75, 150 and 300 mg per Kg of *B. exalatum* extract by gavage respectively. After two months, the liver enzymes, total protein, albumin and bilirubin in animal's sera were measured. Data were analyzed using the SPSS software, using ANOVA and t-ky-test.

Result: The toxicant significantly ($P < 0.05$) increased the levels of ALT, AST, ALP, TB, DB, and decrease the level of TP and ALB. Oral administration of *B. exalatum* extracts showed a significant ($P < 0.05$) decrease in all the elevated serum and significant increase ($P < 0.05$) in TP and ALB levels at all usage doses. These results indicate the maximum recovery was observed in 300 mg/kg/day. The histopathological changes i.e. fatty changes, necrosis etc were partly or fully prevented in animals treated with the extracts.

Conclusion: These findings suggest that the extract of *B. exalatum* possessed hepatoprotective activity, which could be linked to their phytochemical constituents and antioxidant activity; this therefore requires further in-depth studies.

Keywords: *Bupleurum exalatum*, Hepatoprotective, Carbon tetrachloride, Antioxidant

***Corresponding Author:** Sadeghi H, Medicinal Plant Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Email: hsadeghim@yahoo.com

Please cite this article as follows:

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(12): 1069-1081.