اثر حفاظتی اسانس گلپر ایرانی (*Heracleum persicum*) در بروز آسیب کبدی ناشی از تتراکلریدکربن در موش‌های نژاد ویستار

کامبیز روشنایی[1]*، ابوالفضل دادخواه[2]، فائزه فاطمی[3]، سالومه دینی[4]

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
۲- استادیار بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
۳- استادیار بیوشیمی، پژوهشکده چرخه سوخت، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران
۴- کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، باشگاه پژوهشگران و نخبگان جوان، کرج، ایران
* آدرس مکاتبه: قم، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
تلفن: ۰۹۱۲۵۵۱۷۵۶۲، نمابر: ۷۷۷۰۰۰۱ (۰۲۵۳)
پست الکترونیک: Kambizroshanaei@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۲۴ **تاریخ تصویب:** ۹۵/۴/۱

چکیده

مقدمه: امروزه بیماری‌های کبدی یکی از مشکلات جدی و تهدیدکننده سلامتی محسوب می‌شود. گلپر ایرانی (***Heracleum* (*H.*) *persicum***) به عنوان گیاه دارویی بومی، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی به منظور کاهش آسیب‌های کبدی در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت.

هدف: این مطالعه برای اولین بار به بررسی اثر اسانس حاصله از میوه گلپر ایرانی بر روی مسمومیت کبدی ناشی از تزریق تتراکلریدکربن (CCl4) در رت نژاد ویستار پرداخته است.

روش بررسی: در این تحقیق، ۱۰۰ سر رت نر نژاد ویستار به ۲۰ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل منفی (NC) فقط DMSO و روغن زیتون به مدت دو هفته و گروه کنترل مثبت (C)، DMSO روزانه به مدت ۱۴ روز و سپس محلول تتراکلرید کربن (۳ ml/kg b.w) به صورت درون صفاقی (i.p) در روز ۱۵ ام دریافت کردند. گروه استاندارد (BHT) و گروه‌های تیمار (H100 و H200)، اسانس گلپر در دو دز ۱۰۰ mg/kg b.w و ۲۰۰ روزانه به مدت ۱۴ روز و سپس محلول CCL4 به صورت i.p در روز ۱۵ دریافت کردند. سپس، در ساعات ۴، ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت پس از تزریق، اندازه‌گیری گلوتاتیون (GSH)، توتال آنتی‌اکسیدانت (FRAP)، پراکسیداسیون لیپیدها (MDA) و آنزیم‌های کبدی، آلانین ترانس آمیناز (ALT)، آسپارتات ترانس آمیناز (AST) انجام شد.

نتایج: تزریق اسانس به دست آمده از گلپر ایرانی در هر دو دز مورد مطالعه، توانست اختلال در فاکتورهای دخیل در استرس اکسیداتیو و آنزیم‌های کبدی ناشی از CCl4، به طور معنی‌داری تعدیل کند.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان‌دهنده اثر حفاظتی اسانس گلپر ایرانی می‌باشد که احتمالاً بواسطه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه می‌باشد.

گل‌واژگان: گلپر ایرانی، آنزیم‌های کبدی، اسانس، استرس آنتی‌اکسیدانت/اکسیداتیو، مسمومیت کبدی

www.SID.ir

مقدمه

کبد بزرگترین غده بدن است که دارای وظائف متنوع و مهم از جمله بیوسنتز کلیه پروتئین‌ها و دفع غالب سموم می‌باشد. بنابراین، با تهدیدهای بسیاری از سوی مواد شیمیایی، داروها و میکروارگانیسم‌ها مواجه است [۱]. اتانول، تیواستامید، استامینوفن و تتراکلریدکربن از جمله ترکیباتی هستند که پس از ورود به بدن به وسیله سیستم سم‌زدایی سیتوکروم P_{450} در فاز I، متابولیزه می‌شود که محصول متابولیزه آنها، باعث آسیب به بافت‌های مختلف بدن بخصوص کبد می‌شود [۴-۲]. تتراکلرید کربن یکی از مواد شیمیایی شناخته شده بسیار سمی و خطرناک است که مواجه با آن باعث نکروز، سیروز، سرطان کبد و نهایتاً کما یا مرگ می‌شود [۵]. براساس تحقیقات صورت گرفته [۸، ۷، ۶] میزان دز مصرفی تتراکلریدکربن برای القای مسمومیت کبدی در موش‌های آزمایشگاهی، بالاتر از ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن در نظر گرفته شده است. مکانیسم آن بر پایه پراکسیداسیون لیپیدها در غشاء و تولید رادیکال‌های آزاد پراکسی تری کلرومتیل و تری کلرومتیل است که با مولکول‌های مختلف مانند اسیدآمینه، نوکلئوتیدها، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپید واکنش داده و باعث تخریب شدید فرآیندهای سلولی می‌شود [۹].

در مقابل، ترکیبات طبیعی حاوی خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌توانند آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد را کنترل و خنثی می‌نمایند. تحقیقات پیشین، خاصیت محافظت کبدی تعدای از گیاهان از جمله گیاه بیلهر (*Dorema auchri*) [۱۰]، فلفل سبز و جعفری [۱۱] با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل قبول، را گزارش کرده‌اند. بنابراین، باتوجه به غنی بودن کشور ایران از لحاظ پوشش گیاهان دارویی، برای ترویج مصرف این گیاهان در صنایع غذایی و دارویی، بررسی تخصصی خواص بیولوژیکی گیاهان بومی مختلف، همچون گلپر ایرانی ضروری به نظر می‌رسد. گلپر ایرانی (*Heracleum persicum* (*H. persicum*) گیاهی گلدار و چند ساله از خانواده چتریان Apiaceae می‌باشد [۱۲]. این گیاه در مناطق کوهستانی ایران بخصوص در شهرهای آذربایجان، رامسر، فارس، همدان، تهران و دماوند رشد می‌کند [۱۳].

گلپر گیاهی معطر است که از تمام قسمت‌های آن می‌توان در صنعت، غذا و دارو استفاده کرد. از گیاه گلپر به عنوان از بین برنده نفخ شکم و دل درد، رفع سوء هاضمه، اشتهاآور و مقوی معده، ضدغفونی کننده و میکروب‌کشی قوی استفاده می‌شود. عصاره و اسانس این گیاه خاصیت ضد درد و التهاب دارد [۱۴]. در مطالعات قبلی نیز، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدباکتریایی، ضدتشنجی اسانس و عصاره این گیاه، تأیید شده است [۱۷ – ۱۴]. اما تاکنون، اطلاعاتی مبنی برخاصیت محافظت کبدی این گیاه گزارش نشده است. در این راستا، در این مطالعه، اثرات محافظت‌کنندگی اسانس استخراج شده از میوه‌های گلپر بر روی کبد در مقابل سمیت القا شده توسط تتراکلریدکربن در رت‌های نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفته است. از مهم‌ترین معیار فعالیت محافظت کبدی، اندازه‌گیری متغیرهای بیوشیمیایی، پارامترهای دخیل در استرس اکسیداتیو و آنزیم‌های کبدی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و آنالیز اسانس گلپر ایرانی

میوه‌های خشک گیاه گلپر ایرانی (*H. persicum*) خریداری شده و توسط متخصصین مؤسسه جنگل و مراتع استان اصفهان شناسایی شده است. سپس، اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب، توسط دستگاه اسانس‌گیری کلونجر انجام شد. به این صورت که به این صورت که ۵۰ گرم از هر نمونه توسط دستگاه میکسر به صورت جداگانه خرد شدند. سپس دانه‌های پودر شده در بالن دو لیتری دستگاه همراه با ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، قرار داده شده و مدت یک و نیم ساعت جوشانده و سپس در قسمت نزولی دستگاه کلونجر فاز روغنی یا اسانس از آب جدا شد.

ترکیب‌های موجود در اسانس‌ها با استفاده از دستگاه‌های گاز کروماتوگراف (GC) و گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) شناسایی شدند. در این مرحله اسانس حاصله از میوه‌های گل پر ایرانی را به دستگاه کروماتوگرافی گازی (9-A-Shimadzu) مجهز به آشکارساز یونی شعله‌ای، تزریق شد. آنالیز نمونه‌ها بر اساس نرم‌افزار

Archive of SID
www.SID.ir

Euro Chrom 2000 از شرکت KNAUER توسط روش نرمالیزه کردن سطح و با استفاده از ستون سیلیکای مذاب DB-5 (۰/۰۲۵μm ضخامت فیلم، ۶۰m×۰/۲۵ mm) و برنامه دمایی ۲۴۰°C ـ ۴۵ در میزان ۴°C/min، دمای انژکتوری ۲۸۰°C، دمای آشکارساز ۲۶۵°C و گاز حامل هلیم (۹۹/۹۹ درصد) انجام گرفت. دستگاه GC/MS شامل گروماتوگراف گازی Varian-3400 همراه با آشکارساز Saturn II ion trap بوده و ستون مورد استفاده نیز همانند ستون GC با شرایط فوق‌الذکر می‌باشد. اجزاء و ترکیبات اسانس‌ها توسط مقایسه طیف‌سنجی جرمی با استانداردهای موجود شناسایی شدند. شناسایی ترکیبات مجهول با مقایسه شاخص‌های بازداری آنها با ترکیبات استاندارد تأیید شدند [۱۸].

حیوانات آزمایشگاهی

در این مطالعه تجربی، از ۱۰۰ رت نر بالغ نژاد ویستار (تهیه شده از مرکز نگاهداری حیوانات آزمایشگاهی انستیتوپاستور ایران) با وزن تقریبی ۵ ± ۱۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات در اتاقی با حرارت ۲۰ تا ۲۲ سانتی‌گراد، شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و دسترسی آزاد آب و غذا از طریق بطری را داشتند.

تیمار حیوانات و نمونه‌گیری

حیوانات به طور تصادفی به صورت زیر به ۲۰ گروه تقسیم شدند (۵ سر رت در هر گروه)

گروه کنترل منفی؛ DMSO (NC) (۳۰۰ mg/kg b.w) به صورت درون صفاقی (i.p)، روزانه به مدت ۱۴ روز و سپس روغن زیتون (۳ ml/kg b.w) در روز ۱۵ ام، تزریق شد. گروه کنترل مثبت (C)؛ DMSO روزانه به مدت ۱۴ روز متوالی و سپس مخلوط تتراکلریدکربن و روغن زیتون (به نسبت ۱:۱) در دز ۳ ml/kg b.w به صورت درون صفاقی (i.p) در روز ۱۵ ام تزریق شد. گروه‌های تیمار (H100 و H200)؛ اسانس گلپر در دو دز ۱۰۰ mg/kg b.w و ۲۰۰ محلول در DMSO به صورت روزانه به مدت ۱۴ روز متوالی و سپس مخلوط CCL4 و روغن زیتون (به نسبت مساوی ۱:۱) در دز ۳ ml/kg b.w به صورت درون صفاقی (i.p) در روز ۱۵ تزریق شد. گروه استاندارد (BHT)؛ آنتی‌اکسیدان استاندارد BHT در دز ۲۰۰ mg/kg b.w محلول در DMSO به صورت روزانه به مدت ۱۴ روز متوالی و سپس مخلوط CCL4 و روغن زیتون (به نسبت مساوی ۱:۱) در دز ۳ ml/kg b.w به صورت درون صفاقی (i.p) در روز ۱۵ تزریق شد.

سپس در زمان‌های مختلف (۴، ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت) پس از تزریق تتراکلریدکربن، حیوانات توسط دی اتیل اتر بیهوش شدند و از قلب آنها توسط سرنگ هپارینه، خونگیری انجام شد. بافت کبد نیز جدا شد و پس از شستشو در PBS سرد داخل فویل آلومینیوم قرار داده شده و به فریزر ۸۰- منتقل شد.

آزمایشات بیوشیمیایی

تعیین غلظت پراکسیداسیون لیپیدها (MDA)

هموژن بافت کبد در بافر فسفات (100 mM, pH 7.0)، به منظور اندازه‌گیری TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) به عنوان شاخص اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدها مورد استفاده قرار گرفت. غلظت TBARS توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (طول موج ۵۳۵ نانومتر) با استفاده از واکنشگر تیوباربیتوریک اسید (TBA) بر اساس روش Buege and Aust, 1978 انجام شد [۱۹].

تعیین غلظت گلوتاتیون احیاء (GSH) در بافت کبد

گلوتاتیون با استفاده از معرف Ellman's و براساس روش Seldak و Lindsay (1986) در هموژن بافت کبد اندازه‌گیری شد [۲۰]. در این روش، گلوتاتیون با ترکیبی به نام دی تیو نیترو بنزوئیک اسید (DTNB) کمپلکسی را تشکیل می‌دهد که در طول موج ۴۱۲ نانومتر جذب دارد. در نهایت، میزان گلوتاتیون به کمک منحنی استاندارد محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST)

فعالیت این آنزیم به روش اسپکتروفتوتری در طول موج ۳۴۰ نانومتر با استفاده از سوبسترای CDNB (ماده معرف) در هموژن بافت کبد، براساس روش Habig سنجیده شد [۲۱].

Archive of SID
www.SID.ir

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما (آزمون FRAP)

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما با استفاده از روش FRAP که توسط Benzie and Strain معرفی شده است، انجام شد [۲۲]. اساس این روش، توانایی سرم در احیای یون‌های فریک Fe^{3+} به فرو Fe^{2+} در حضور معرف TPTZ (tripyridyl-s-triazine-۲،۴،۶) می‌باشد. میزان قدرت احیاکنندگی سرم، با کمک منحنی استاندارد جذب در مقابل غلظت محلول Fe^{2+}، توسط دستگاه اسپکتروفتومتری (۵۹۳ نانومتر) محاسبه می‌شود.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کبدی در پلاسما

فعالیت آمینوترانسفرازهای سرمی شامل آلانین ترانس آمیناز (ALT) و آسپارتات ترانس آمیناز (AST) به روش اسپکتروفتومتری (۳۴۰ نانومتر) توسط کیت‌های خریداری شده از شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری شد [۲۳].

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۵ استفاده شد. نتایج به دست آمده از این تحقیق توسط آزمون واریانس یک طرفه (One way-ANOVA) و به دنبال آن با استفاده از آزمون تعقیبی توکی مقایسه شدند. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده و مقایسه میانگین داده‌ها در سطح آماری $P< ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. $P< ۰/۰۵$* بیانگر تفاوت معنی‌دار گروه کنترل (C) نسبت به گروه کنترل منفی (NC) و $P< ۰/۰۵$** بیانگر تفاوت معنی‌دار گروه کنترل (C) نسبت به گروه‌های تیمار با اسانس گلپر (H100 و H200) می‌باشد.

نتایج

آنالیز ترکیبات اسانس

کمیت و کیفیت ترکیبات شیمیایی جدا شده از اسانس روغنی استخراج شده از میوه‌های گلپر در جدول شماره ۱ به طور خلاصه نمایش داده شده است. در کل، ۴۵ ترکیب شناسایی شده است که از میان ترکیبات، سه جزء hexyl butyrate (۲۶/۸۷ درصد)، 2-ethylhexyl acetate (۱۸/۶۱ درصد) و heptyl hexanoate (۸/۹۱ درصد) اجزای اصلی می‌باشند (جدول شماره ۱).

تأثیر اسانس گلپر بر روی پارامترهای دخیل در استرس اکسیداتیو در رت‌های مبتلا به مسمومیت ناشی از CCl4

فعالیت GST و غلظت GSH

نتایج آنالیز آزمون‌های بیوشیمیایی در نمودارهای شماره ۱ و ۲ نشان داد که تزریق CCL4 در گروه کنترل مثبت، منجر به کاهش معنی‌داری ($P< ۰/۰۵$) در میزان GSH بعد از تمام زمان‌های مورد آزمایش و نیز فعالیت GST فقط پس از ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل منفی شده است. ولی، غلظت گلوتاتیون در گروه‌هایی که اسانس گلپر با دز mg/kg b.w ۱۰۰ (H100) به مدت ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت دریافت کرده‌اند و همچنین در گروه‌هایی که اسانس گلپر با دز mg/kg b.w ۲۰۰ (H200) همانند آنتی‌اکسیدان استاندارد BHT در تمام ساعات مورد آزمایش دریافت کردند، به طور چشمگیری ($P< ۰/۰۵$) نسبت به گروه کنترل مثبت افزایش داشته است (نمودار شماره، ۱). علاوه بر این، در هر دو گروه (H100 و H200) تیمار شده، اسانس از کاهش فعالیت GST به طور قابل ملاحظه‌ای ($P<۰/۰۵$) جلوگیری کرده است (نمودار شماره ۲) که با نتایج آنتی‌اکسیدانی استاندارد BHT همسانی می‌کند.

غلظت MDA و FRAP

همانطور که نمودارهای شماره ۳ و ۴ نشان می‌دهد، افزایش معنی‌داری ($P< ۰/۰۵$) در سطح MDA (بعد از ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت) و میزان توتال آنتی‌اکسیدانت (بعد از ۱۶ و ۲۴ ساعت) در گروه‌های کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی دیده شد. در حالی که، تجویز اسانس گلپر در گروه H100 بعد از ۱۶ و ۲۴ ساعت و در گروه‌های H200 و BHT بعد از ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت، به صورت قابل توجهی ($P< ۰/۰۵$) موجب کاهش سطح MDA در پلاسما شده است (نمودار شماره ۳). همچنین، تیمار رت‌ها با اسانس گلپر در هر دو گروه H100 و H200 منجر به حفظ تعادل میزان FRAP (نمودار شماره ۴)

Archive of SID
www.SID.ir

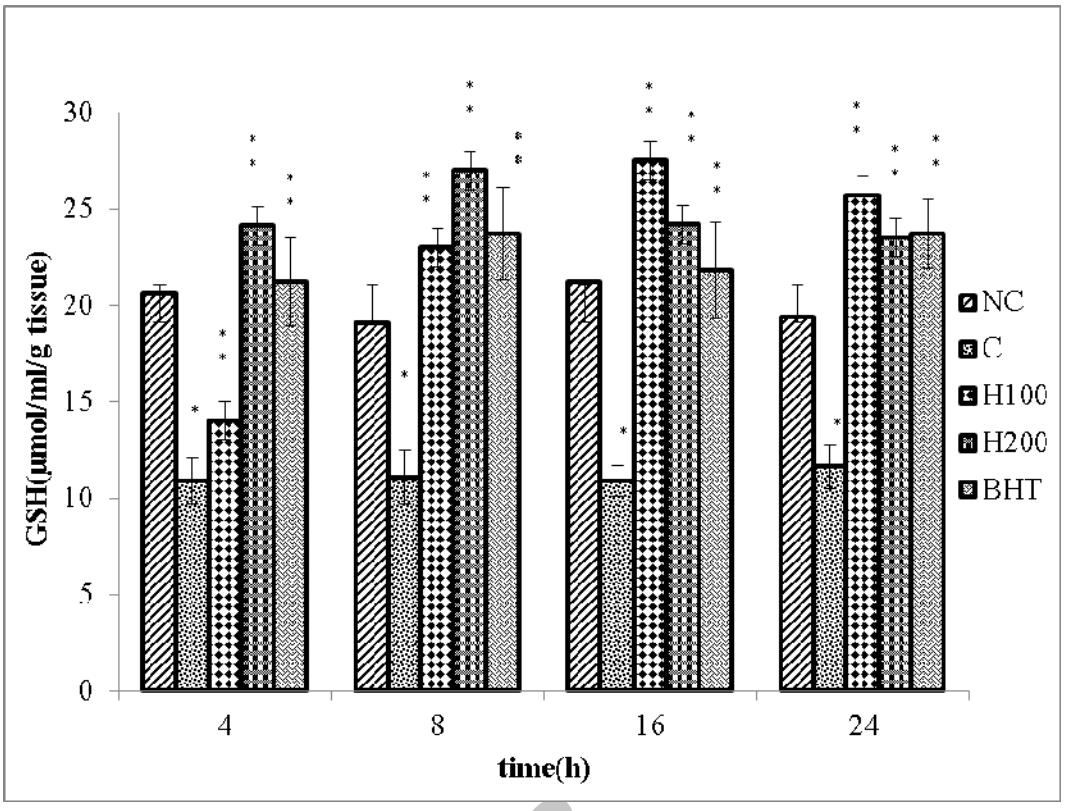
در حد گروه کنترل منفی شده است (P< ۰/۰۵) که با آنتی‌اکسیدان BHT برابری می‌کند.

جدول شماره ۱- ترکیبات اسانس گل پر ایرانی *H. persicum*

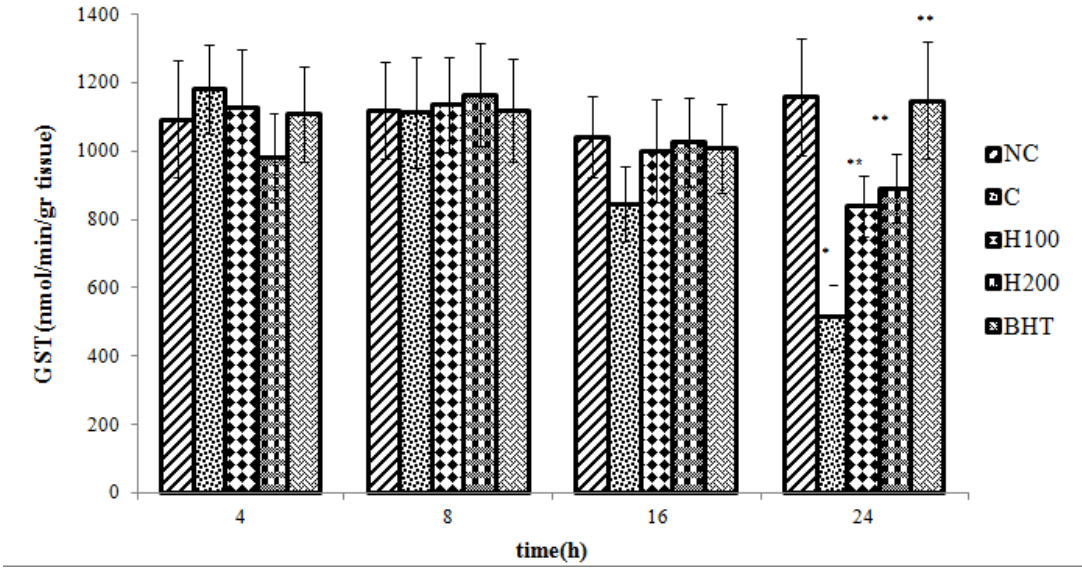
No	Synonyms chemical names of compounds	RI	%
1	isobutyric acid isopropylester	788	0.14
2	hexanal	803	0.22
3	butanoic acid 1-methyl ester	839	0.05
3	isobutyric acid propylester	855	0.06
4	hexanol	875	1.51
5	hexyl 2-methyl butanoate	886	0.12
6	isopropyl isopentanoate	895	0.15
7	butyric acid iso butylester	915	0.66
8	α-thujene	929	0.07
9	α-pinene	939	0.2
10	propyl 2-methylbutyrate	943	0.12
11	butyl2-methyl propionate	949	1.97
12	butanoic acid 2-methyl propyl ester	952	0.31
13	camphene	957	0.04
14	sabinene	974	0.11
15	β-pinene	981	0.24
16	butanoic acid butyl ester	988	1.93
17	butyl 2-methyl butyrate	993	0.56
18	isovaleric acid isobutyl ester	996	0.27
19	octanal	1003	3.25
20	p-cymene	1029	2
21	butyl 2-methyl butanoate	1036	2.22
22	1-butyl isovalerate	1042	1.38
23	3-methyl butyl butanoate	1056	1
24	gamma-terpinene	1066	2.36
25	1-octanol	1077	1.29
26	propionic acid hexyl ester	1106	0.62
27	3-methyl-butyric acid 3-methyl-butyl ester	1111	0.28
28	2-butanoic acid , 3methyl -butyl ester	1131	0.21
29	1-hexyl isobutyrate	1152	5.77
30	acetic acid - decyl ester	1180	0.24
31	butanoic acid hexyl ester	1201	26.87
32	1-ethenyl hexyl butanoate	1210	2.44
33	β-ethyl hexyl acetate	1223	18.16
34	3-decen-1-ol	1232	0.31
35	butyric acid 2-methyl hexyl ester	1245	6.05
36	hexyl-3methylbutanoate	1249	1.53
37	3-octen-1-ol	1339	0.24
38	octyl 2-methyl propionate	1347	1.5
39	hexanoic acid hexyl ester	1356	0.24
40	ethenyl hexyl butanoate	1384	0.77
41	hexanoic acid heptyl ester	1391	8.91
42	octyl 2-methyl butanoate	1437	2.39
43	isovaleric acid octyl ester	1443	0.24
44	2-ethyl cyclohexanol	1453	0.33
45	hexanoic acid octyl ester	1587	0.59
Total			99.92

Archive of SID

www.SID.ir

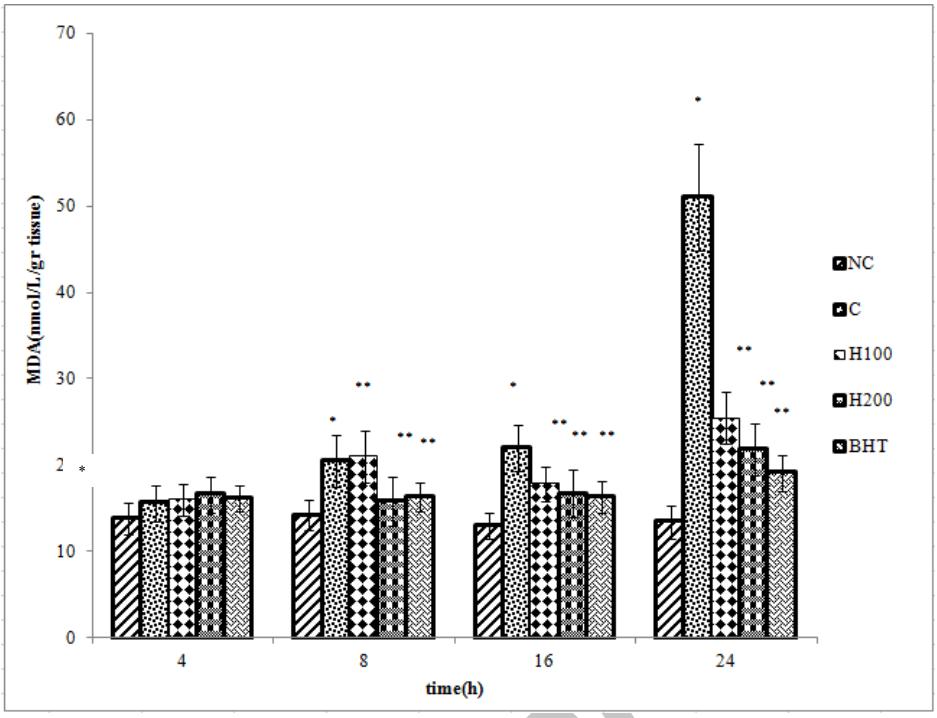


نمودار شماره ۱- اثر اسانس گلپر با دزهای (۲۰۰ mg/kg و ۱۰۰) بر روی غلظت GSH در آسیب کبدی ناشی از CCl4.

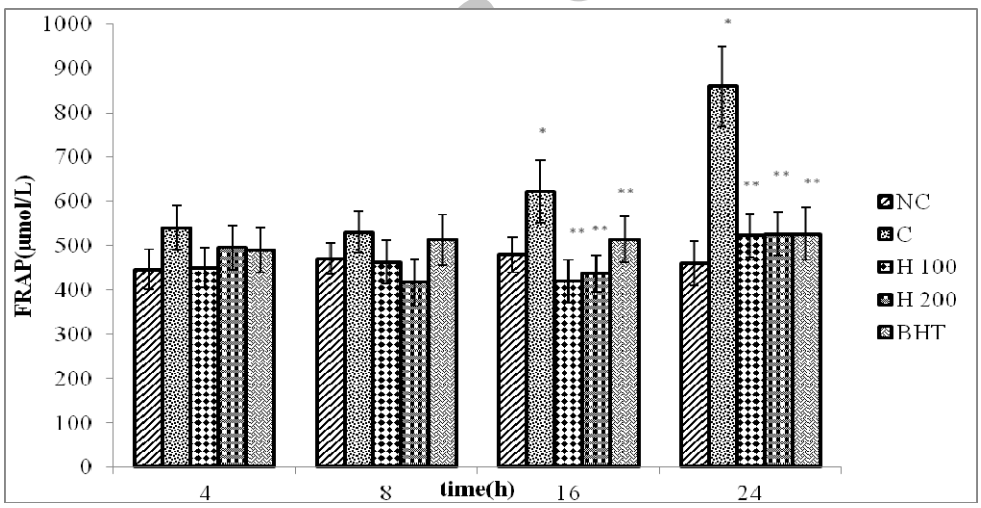


نمودار شماره ۲- اثر اسانس گلپر با دزهای (۲۰۰ mg/kg و ۱۰۰) بر روی فعالیت آنزیم GST در آسیب کبدی ناشی از CCl4

www.SID.ir



نمودار شماره ۳- اثر اسانس گلپر با دزهای (۲۰۰ mg/kg و ۱۰۰) بر روی سطح MDA در آسیب کبدی ناشی از CCl4



نمودار شماره ۴- اثر اسانس گلپر با دزهای (۲۰۰ mg/kg و ۱۰۰) بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (FRAP) در آسیب کبدی ناشی از CCl4

غلظت MDA و FRAP

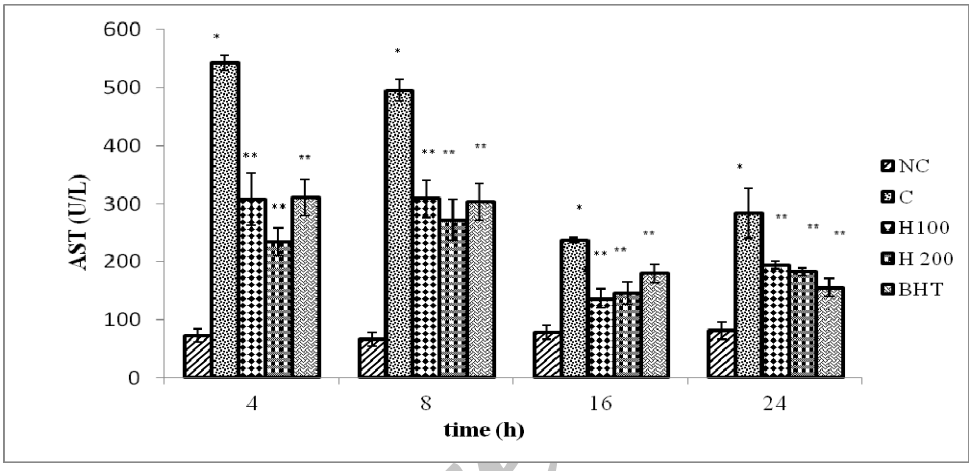
همانطور که نمودارهای شماره ۳ و ۴ نشان می‌دهد، افزایش معنی‌داری (P< ۰/۰۵) در سطح MDA (بعد از ۸ ۱۶ و ۲۴ ساعت) و میزان توتال آنتی‌اکسیدانت (بعد از ۱۶ و ۲۴ ساعت) در گروه‌های کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی دیده شد. در حالی که، تجویز اسانس گلپر در گروه H100 بعد از ۱۶ و ۲۴ ساعت و در گروه‌های H200 و BHT بعد از ۸ ۱۶ و ۲۴ ساعت، به صورت قابل توجهی (P< ۰/۰۵) موجب کاهش سطح MDA در پلاسما شده است (نمودار شماره۳). همچنین، تیمار رت‌ها با اسانس گلپر در هر دو گروه H100 و H200 منجر به حفظ تعادل

www.SID.ir

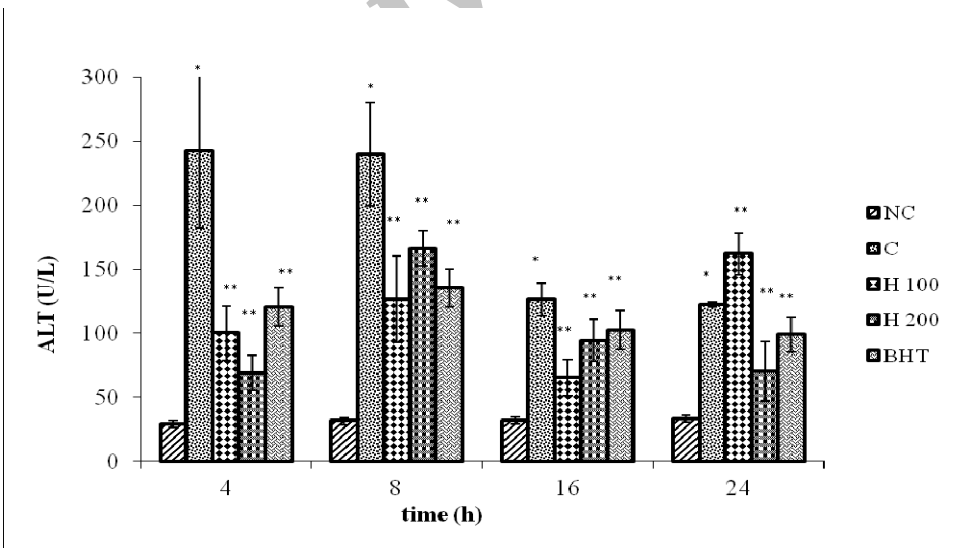
میزان FRAP (نمودار شماره ۴) در حد گروه کنترل منفی شده است (P< ۰/۰۵) که با آنتی‌اکسیدان BHT برابری می‌کند.

تأثیر اسانس گلپر بر روی سطوح مارکرهای آنزیم‌های کبدی در رت‌های مبتلا به مسمومیت ناشی از CCL4

به منظور بررسی آسیب بافت کبدی، مارکرهای آنزیمی پلاسما اندازه‌گیری شدند که نتایج آنها در نمودارهای شماره ۵ و ۶ نشان داده شده است. همانطور که در نمودارهای فوق مشاهده می‌شود، فعالیت آنزیم‌های AST و ALT در رت‌های گروه‌های کنترل مثبت افزایش معنی‌داری داشته است (P<۰/۰۵). تیمار رت‌ها با اسانس گلپر در دو گروه H100 و H200، ۱۴ روز قبل از تزریق، باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در فعالیت آنزیم‌های ALT و AST می‌شود که با نتایج آنتی‌اکسیدان استاندارد BHT مطابقت دارد.



نمودار شماره ۵- اثر اسانس گلپر با دزهای (۲۰۰ mg/kg و ۱۰۰) بر روی فعالیت آنزیم AST در آسیب کبدی ناشی از CCl4



نمودار شماره ۶- اثر اسانس گلپر با دزهای (۲۰۰ mg/kg و ۱۰۰) بر روی آنزیم ALT در آسیب کبدی ناشی از CCl4

www.SID.ir

بحث

نتایج تحقیقات پیشین ما نشان داده است که عصاره یا اسانس به دست آمده از گیاهان دارویی می‌تواند از تخریب بافت کبد توسط دز بالای مواد شیمیایی جلوگیری کرده و اثر محافظت کبدی خود را اعمال کند [۲۶-۲۳]. در ادامه، هدف از این تحقیق، بررسی اثر اسانس میوه‌های گیاه گلپر ایرانی به صورت پیش درمانی در جلوگیری از مسمومیت کبدی ناشی از تتراکلریدکربن، با روند تغییرات در فاکتورهای بیوشیمیایی دخیل در استرس اکسیداتیو و مارکرهای آنزیمی در خون و بافت رت‌های آزمایشگاهی می‌باشد.

به طور کلی، تتراکلرید کربن بعد از ورود و جذب خون به داخل کبد وارد شده و در میکروزوم‌های کبدی توسط سیتوکروم P_{450} به رادیکال‌های آزاد شامل تری کلرومتیل (CCl_3) و پراکسی تتراکلرومتیل ($OOCCl_3$) که به شدت سمی هستند، متابولیزه می‌شوند [۲۷]. این رادیکال‌های آزاد با حمله به غشای سلولی باعث پراکسیداسیون لیپیدی و تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود [۲۸] که در مطالعه حاضر میزان پراکسیداسیون لیپیدها و توتال آنتی‌اکسیدانت در اثر تجویز تتراکلرید کربن نسبت به گروه کنترل منفی افزایش معنی‌داری پیدا کرده است (نمودارهای شماره ۳ و ۴). علاوه براین، رادیکال‌های آزاد روی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش غلظت گلوتاتیون قابل دسترس درون سلولی، تأثیر گذاشته است. گلوتاتیون نقش حفاظتی مهمی را با دفع مواد سمی و نگهداشتن ساختار و وظایف سلولی بازی می‌کند. GST به عنوان آنزیم موجود در فاز II متابولیسم سموم با اتصال به GSH، در دفع مواد سمی نقش دارد [۲۹]. در این پژوهش تغییر قابل ملاحظه‌ی میزان GSH (نمودار شماره ۱) و فعالیت GST (نمودار شماره ۲) در گروه کنترل مثبت در مقایسه با گروه کنترل منفی نشان دهنده آسیب کبدی می‌باشد. همچنین، آنزیم‌های کبدی یا آمینو ترانسفرها (ALT و AST) به طور معمول توسط سلول‌های کبدی به مقدار معینی تولید می‌شوند. زمانی که کبد دچار آسیب می‌شود سلول‌های کبدی ترشح آنزیم فوق را افزایش داده و موجب بالا رفتن سطح پلاسمای آنها می‌شوند که بالا رفتن سطح این آنزیم‌ها در خون، آسیب کبدی را ثابت می‌کند که چنین تغییراتی در سطح آنزیم‌های AST (نمودار شماره ۵) و ALT (نمودار شماره ۶) به طور چشمگیری در این مطالعه مشاهده می‌شود. در مطالعه‌ای که ابوالحسن‌نژاد و همکاران در سال ۱۳۹۳ انجام دادند، در موش‌هایی که به تنهایی CCl_4 با دز یک میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کرده‌اند، نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش آنزیم‌های شاخص کبدی (AST, ALT و ALP) و بیلی‌روبین پلاسما داشته‌اند که آسیب کبدی را تأیید می‌کند [۳۰]. مطالعه دیگری، افزایش و کاهش معنی‌داری به ترتیب در میزان پراکسیداسیون لیپیدها و غلظت گوتاتیون ناشی از مسمومیت تتراکلریدکربن را گزارش کرده‌اند که با نتایج ما کاملاً مطابقت دارد [۲۸]. در تحقیق دیگری نیز نتایج این مطالعه را تأیید می‌کند که تزریق درون صفاقی تتراکلریدکربن مسمومیت کبدی ایجاد می‌کند، به طوری که افزایش قابل توجهی در سطوح آنزیم‌های کبدی MDA و کاهش در فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی (GST) و غلظت گلوتاتیون را نسبت به گروه شاهد رخ می‌دهد [۳۱].

اخیراً، علاقه‌مندی محققین به یافتن منابع طبیعی، بعنوان جایگزین مناسب داروهای شیمیایی، برای بهبود آسیب کبدی ناشی از مواد سمی مختلف، رو به افزایش است. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاهان دارویی به عنوان ممانعت از فرآیند اکسیداسیون با بلوکه کردن زنجیره استرس اکسیداتیو، قادر به محافظت از کبد در برابر آسیب ناشی از تتراکلری کربن می‌باشد [۳۳-۳۲].

گلپر بعنوان یکی از مهمترین گیاهان بومی، دارویی، صنعتی و صادراتی کشور محسوب می‌شود. در گیاه گلپر اسانس روغنی و فرار وجود دارد که در صنایع مختلف غذایی-دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳۴]. نتایج تحقیقات نشان می‌دهند که اسانس این گیاه دارای اثرات ضد دردی و ضد التهابی در موش می‌باشد [۱۴]. همچنین، عصاره استونی این گیاه دارای اثرات ضد تشنجی است [۱۶] اسانس گونه‌های مختلف گلپر دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده که دارای اثرات ضد توموری نیز می‌باشد [۳۵].

Archive of SID
www.SID.ir

ترابی و همکاران در سال ۲۰۱۴، خاصیت آنتی‌باکتریالی و آنتی‌اکسیدانی اسانس گلپر و نقش مؤثر ترکیبات شیمیایی را تأیید کرده است [۳۶].

همچنین، در مطالعه حاضر مشخص شد که تزریق اسانس گلپر در هر دو گروه H100 و H200 توانسته پارامترهای دخیل در استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانت؛ MDA، GSH، GST و FRAP را به حالت نرمال نزدیک کند (نمودارهای شماره ۱-۴). تیمار پیش درمانی با اسانس گلپر سبب کاهش فعالیت سرمی آنزیم‌های AST و ALT به صورت قابل توجهی شده است (نمودارهای شماره ۵ و ۶). از این رو می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تیمار حیوانات با اسانس گلپر، منجر به افزایش توان آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها و در نتیجه حفظ ذخائر گلوتاتیون کبد و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدها در مواجه با CCl4 می‌شود.

از طرفی، اسانس گلپر، علاوه بر تأثیر روی سطح GSH، منجر به افزایش فعالیت آنزیم GST نیز می‌شود. بنابراین احتمالاً بخشی از اثرات محافظتی خود را از طریق افزایش دفع متابولیت‌های فعال CCl4 از کبد اعمال می کنند. در مطالعه‌ای تزریق عصاره *Ginkgo biloba* از نکروز و فیبروز کبد در برابر آسیب القایی از سوی تتراکلرید کربن خودداری کرده و اثر محافظتی گیاه فوق از طریق تقلیل پراکسیداسیون لیپیدها و آنزیم‌های کبدی ایجاد شده است [۳۷] که با نتایج مطالعه حاضر مشابهت دارد. Akram و همکاران [۷] در بررسی خود، به نقش محافظت کبدی عصاره در مسمومیت کبدی ناشی از تتراکلرید کربن در موش‌های صحرایی پرداختند، در این مطالعه سطوح آنزیم‌های کبدی در سرم موش‌های تیمار شده با عصاره گردو به مدت دو هفته به طور چشمگیری تقلیل یافت. در تحقیقی اثبات شد که عصاره هیدروالکلی گیاه پنیرک از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی و جاروکنندگی رادیکال‌های آزاد با کمک آنتی‌اکسیدانت (فنل‌ها، فلاونوئیدها و کارتنوئیدها) دارای فعالیت محافظت بافت کبدی می‌باشد [۶].

نتایج آنالیز فیتوشیمیایی اسانس گلپر ایرانی نشان می‌دهد که ترکیباتی اصلی چون hexyl butyrate (۲۶/۸۷ درصد)، 2-ethylhexyl acetate (۱۸/۱۶ درصد) و heptyl hexanoate (۸/۹۱ درصد) (جدول شماره ۱) در این اسانس وجود دارد که احتمالاً از بافت کبدی در برابر آسیب ایجاد شده توسط CCl4 از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی و حفظ پایداری غشا محافظت کند. علاوه بر این، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گلپر در مطالعه‌ای گزارش شده است [۳۸]. نوع ترکیبات عمده و درصد آنها در اسانس گلپر ایرانی مورد استفاده در این مطالعه در مقایسه با سایر تحقیقات انجام گرفته، متفاوت است. به طور مثال، در پژوهشی که در سال ۲۰۰۴ انجام گرفت، آلیفاتیک استرها، آلیفاتیک الکل‌ها و مونوترپن‌ها مانند هگزیل بوتیرات بعنوان ترکیبات اصلی اسانس گلپر ایرانی شناسایی شد [۳۹]. علت اصلی تفاوت نتایج ما با تحقیقات پیشین می‌تواند در واقع ناشی از عوامل ژنتیکی، روش‌های استخراج، شرایط اکولوژیکی (هوا، خاک و عوامل جغرافیایی)، عوامل محیطی (نور و دما)، مرحله رشدی گیاه، فصل برداشت شرایط نگهداری باشد [۴۳-۴۰]. در مطالعه‌ای اسانس حاصله از این گیاه با ترکیبات اصلی، استرها و hexyle butyrate اثر ضدالتهابی قابل قبولی را نشان داده است [۱۴]. به طور کلی اطلاعات درباره ترکیبات شیمیایی و خاصیت بیولوژیکی گلپر ایرانی بسیار محدود و همچنین متناقض است [۴۴]. به طور کلی، اثرات بیولوژیکی اسانس‌ها ارتباط مستقیمی با نوع ترکیبات شیمیایی دارد، به نحوی که عبادالله‌ی و همکارانش در سال ۲۰۱۴ اثرات حشره‌کشی و ضدعفونی‌کنندگی اسانس گلپر ایرانی را اثبات کردند و این اثر را به ترکیبات اصلی octyl acetate، hexyl butyrate و hexyl hexanoate مربوط دانستند [۴۵]. همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گلپر ایرانی توسط آزمون‌های استاندارد DPPH و LP بررسی شده است [۴۸-۴۶].

نتیجه‌گیری

با توجه به اثرات قابل قبول اسانس گلپر (*H. persicum*) بر روی شاخص‌های دخیل در استرس اکسیداتیو (GSH, MDA, FRAP و GST) و فعایت آنزیم‌های کبدی (AST و ALT) میتوان ابراز کرد که اسانس به دست آمده از میوه‌های گلپر ایرانی اثر محافظت کبدی در برابر آسیب ناشی از مصرف تتراکلریدکربن داشته است که این اثر احتمالاً در ارتباط با

Archive of SID
www.SID.ir

خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فعال موجود در این گیاه می‌باشد.

منابع

1. Klaassen C and Watkins J. Toxic responses of the liver, In: Casaret & Doull's (editor) Essential oftoxicology. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2001, pp: 471 - 91.

2. Columbano GM, Coni P and Curto M. Induction of two different models of cell death, Apoptosis and necrosis in rat liver after a single dose of thioacetamide. *Am. J. Pathol.* 1991; 139: 1099 - 109.

3. Recknagel RO, Glende EA, Jr. Dolak JA and Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol. Therapeut.* 1989; 43: 139 - 54.

4. Mochizuki M, Shimizu S, Urasoko Y, Umeshita K, Kamata T, Kitazawa T and et al. Carbon tetrachlorideinduced hepatotoxicity in pregnant and lactating rats. *J. Toxicol. Sci.* 2009; 34 (2): 175 - 81.

5. Rood A, McGavran P, Aanenson J and Till J. Stochastic estimates of exposure and cancer risk from carbon tetrachloride released to the air from the rocky flats plant. *Risk Anal.* 2001; 21 (4): 675 -95.

6. Terohid SF, Mirazi M and Sarihi A. Study of Hepatoprotective Effect of *Malva neglecta* L. Hydroethanolic Leaf Extract in Male Rat Induced with Carbon Tetrachloride. *JCT.* 2015; 6 (1): 31 - 42.

7. Eidi A, Olamafar S, Zarin ghalam J, Rezazadeh S and Eidi M. Protective effect of Walnut (*Juglans regia* L.) extract against CCl4–induced hepatotoxicity in rats. *Pejouhesh* 2011; 35 (2): 87 -92.

8. Rafiee F, Heidari R, Ashraf H and Rafiee P. Protective Effect of Berberis integerrima Fruit Extract on Carbon-Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Rats, *Journal of Fasa University of Medical Sciences* 2013; 1 (3): 179 - 187.

9. Thomas C and Aust S. Free radicals and environmental toxins *Annals of Emergency Medicine* 1986; 15 (9): 1075 - 83.

10. Adibfard E, Mirzaei A and Pourelmi T. Evaluation of Hepatoprotective Effects of Hydroalcoholic Extract of Green Pepper and Parsley on the Toxicity Induced by Carbon Tetrachloride in Rats. *YUMSJ* 1392; 18 (11): 918-932.

11. Sadeghi H, Gheitasi E, Mazrohgi N and Sabzali S. The evaluation of the hepatoprotective effects of on th toxicity induced by tetrachloride carbon in the mouse. *JSKUMS* 1386; 9 (1): 38 - 43.

12. Parsa A. Flora de Iran 8: index des noms vernacularies locuax-latins. Tehran Publication de universite de Tehran, 1943, p: 105.

13. Mirhosseini M, Barzegari FF. Effect of Persian hogweed (*Heracleum persicum*) on the morphological changes in mice testes and the level of hormone testosterone. *Razi Medical Sciences J.* 2012; 19 (99): 18-24.

14. Hajhashemi V, Sajjadi SE and Heshmati M. Anti-inflammatory and analgesic properties of Heracleum persicum essential oil and hydroalcoholic extract in animal models. *J. Ethnopharmacol.* 2009; 124: 475 - 80.

15. Souri E, Farsam H, Sarkheil P and Ebadi F. Antioxidant activity of some furanocoumarins isolated from *Heracleum persicum*. *Pharmaceutical Biol.* 2004; 6: 396 - 99.

16. Sayyah M, Moaied S and Kamalinejad M. Anticonvulsant activity of Heracleum persicum seed. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 98: 209 - 211.

17. Nazemi A. Hashemi M, Khatami Nejad M.R, Poorshamsian K. Consideration of antibacterial activity of *Heracleum Persicum* extracts, *Medical Sciences Journal of Islamic Azad University* 2005; 15 (2): 91-94.

18. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromato- graphy/Mass

Archive of SID
www.SID.ir

Spectroscopy. Allured Publishing Co. Carol Stream, USA, 1995.

19. Buege JA and Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52: 302 - 310.

20. Seldak J and Lindsay RH. Estimation of total, protein- bond and non protein sulfhydryl groups in tissue with Ell- man's reagent. *Anal. Biochem.* 1968; 25: 192 - 205.

21. Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem*. 1974; 25: 7130 - 39.

22. Benzie IFF and Strain JJ. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 1996; 239: 70 - 6.

23. Attaran HR, Dini S, Fatemi F, Hesaraki S, Parhizkarie M and Dadkhaha A. Hepatoprotective Evaluation of Iranian *Satureja Rechingeri* Essential Oils against Oxidative Injuries Induced by Acetaminophen in Wistar Rats. *Int. J. Rev. Life Sci.* 2015; (5): 204 - 10.

24. Dadkhah A, Fatemi F, Eslami Farsani M, Roshanaei K, Alipour M and Aligolzadeh H. Hepatoprotective Effects of Iranian Hypericum scabrum Essential Oils Against Oxidative Stress Induced by Acetaminophen in Rats. *Braz. Arch. Biol. Technol*. 2014a; 57 (3): 340 - 8.

25. Dadkhah A, Fatemi F, Malayeri M, Jahanbani A, Batebi F and Ghorbanpour Z. The Chemo-preventive Effect of *Nigella sativa* on 1,2-dimethylhydrazine-induced Colon Tumor. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Res.* 2014c; 48 (1): 39 - 48.

26. Dadkhah A, Fatemi F, Ababzadeh S, Roshanaei K, Alipour M and Sadegh Tabrizi B. Potential preventive role of Iranian Achillea wilhelmsii C. Koch essential oils in acetaminopheninduced hepatotoxicity. *Botanical Studies* 2014b; 55: 37.

27. Clawson GA. Mechanism of carbontetrachloride hepatotoxicity. *Pathol. Immunopathol. Res.* 1989; 8: 104 - 12.

28. Bose O, Gupta M, Mazumder U.K, Kumar RS, Sivakumar H and Kumar R.S. Hepatoprotective and Antioxidant Effects of Eupatorium ayapana against Carbon Tetrachloride nduced Hepatotoxicity in Rats. *Iranian J. Pharmacology & Therapeutics* 2007; 6 (1): 27 - 33.

29. Henderson CJ, Wolf CR, Kitteringham N, Powell H, Otto D and Park BK. Increased resistance to acetaminophen hepatotoxicity in mice lacking glutathione S-transferase Pi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 2007; 97: 12741 - 5.

30. Abolhasannezhad M, Sharifzadeh G, Ghasemzadeh R and Zarban A. Assessment of antioxidant properties of berberis vulgarris syrup and their protective effects on hepatic damages induced by CCI4 in the rat. *J. Birjand University of Medical Sci.* 2014; 21 (3): 283 - 91.

31. Hua J, Qiu de K, Li JQ and Li EL. Chen of carbon tetrachloride-induced liverinjury. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2003; 22: 862 - 69.

32. Sheweita SA, Abd ElGabar M and Bastawy M. Carbon tetrachloride-induced changes in the activity of phase II drug-metabolizing enzyme in the liver of male rats: role of antioxidants. *Toxicol.* 2001; 165: 217 - 24.

33. Lee CP, Shih PH, Hsu CL and Yen GC. Hepatoprotection of tea seed oil (Camellia oleifera Abel.) against CCl4-induced oxidative damage in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2007; b45: 888 - 95.

34. Scheffer JJ, Hiltunen R, Aynehchi Y, von Schantz M and Svendsen AB. Composition of Essential Oil of Heracleum persicum Fruits. *Planta Med*. 1984; 50: 56 - 60.

35. Firuzi O, Asadollahi M, Gholami M, Javidnia K. Composition and biological activities of essential oils from four Heracleum species. *Food Chem.* 2010; 122: 117 - 22.

36. Torbati MA, Nazemiyeh H, Lotfipour F,

Archive of SID
www.SID.ir

Nemati M, Asnaashari S and Fathiazad F. Chemical composition and *in vitro* antioxidant and antibacterial activity of *Heracleum transcaucasicum* and *Heracleum anisactis* roots essential oil, *BioImpacts* 2014; 4 (2): 69 - 74.

37. Suresh R and Naik VS. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Ginkgo biloba* phytosomes in carbon tetrachloride-induced liver injury in rodents, *Liver international* 2007; 3: 393 - 99.

38. Coruh N, Sagdicoglu Celep AG and Ozgokce F. Antioxidant properties of *Prangos ferulacea* (L.) Lindle., *Charophyllum macropodum* Boiss. and *Heracleum persicum* Desf. from Apiacea family used as food in Eastern Anatolia and their inhibitpry effects on glutathione-S-transferase. *Food Chem*. 2007; 100: 1237 - 42.

39. Sefidkon F, Dabiri M and Mohammad N. Analysis of the Oil of *Heracleum persicum* L. (Seeds and Stems). *Journal of Essenial oil Research* 2004;16: 296 - 8.

40. Mohajeri D, Dustar Y, Rezaei A and Mesgari A. Hepatoprotective effect of Saffron ethanolic extract induced with Rifampin in comparision with silimarin in rat. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 2010; 12 (5): 53 - 59.

41. Reichert S, Wust M, Beck T and Masandl A. Stereoisomeric flavor conpounds LXXXI: dill ether and its cis-Stereoisomers: synthesis and enantioselective analysis. *J. High Resol. Chromatogr*. 1998; 21 (3): 185 - 9.

42. Aleksovski S, Sovova H, Poposka FA, Kulevanova S and Ristic M. Comparison of essential oils obtained from *Mentha piperita* L.using supercritical carbondioxide extraction and hydro distillation, *Acta Pharmaceutica* 1999; 49 (1): 51 - 57.

43. Sefidkon F, Rahimi-Bidgoly A. Quantitative and qualitative variation of essential oil of thymus kotschyanus by different methods of distillation and stage of plant growth. *J. Iranian Medicinal and Aromatic Plants Res.* 2007; 15: 1 - 22.

44. Rezayan A and Ehsani A. Evaluation of the Chemical Compounds and Antibacterial Properties of the Aerial Parts of Persian Heracleum Persicum Essence, *J. Babol Univ. Med. Sci*. 2015 (6); 26 - 32.

45. Ebadollahi A, Zavieh EA, Nazifi A, Sendi JJ, Farjaminezhad M, Samadzadeh A and Tajmiri P. Chemical composition and bio-pesticidal values of essential oil isolated from the seed of *Heracleum persicum* Desf. ex Fischer (Apiaceae), *Spanish Journal of Agricultural Research* 2014; 12 (4): 1166 - 74.

46. Coruh N, Sagdicoglu CAG and Ozgokce F. Antioxidant properties of *Prangos frulacea* (L.), *Chaerophyllum macropodum* Boiss. And *Heracleum persicum* Desf. From Apiaceae family usedas food in Eastern Anatolia and their inhibitory effects on glutathione-S-transferase. *Food Chem*. 2007; 100: 1237 - 42.

47. Mozaffarian VA (1996). Dictionary of Iranian plant names. Farhang Moasser. Tehran, 1996, pp: 271 - 72.

48. Zargari A. Medicinal plants. Tehran Univ. Press, 1998, p: 619.

Archive of SID

www.SID.ir