

## اثر حفاظتی کبدی عصاره پلی فنلی خارمریم *Silybum marianum* و همیشه بهار *Callendula officinalis* در موش صحرایی

حسین مدنی<sup>۱</sup>، صدیقه عسگری<sup>۲</sup>، غلامعلی نادری<sup>۲</sup> و ملیحه طالب الحسینی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات قلب و عروق، اصفهان

### چکیده

گیاهانی که انسان مصرف می‌کند شامل هزاران نوع ترکیبات مختلف از جمله پلی فنلها می‌باشند. فنل‌های موجود در رژیم غذایی بدلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی و احتمالاً ضد سرطانی، قابل توجهند. یکی از اندامهای درگیر بدن با مقادیر بالای اکسیدانها و مواد سرطانزا کبد است که ترکیبات آنتی اکسیدانی می‌تواند اثرات مفیدی بر سلامت این عضو داشته باشد. در این مطالعه اثر حفاظتی عصاره پلی فنلی همیشه بهار و خارمریم در برابر مسمومیت کبدی ایجاد شده با تیواستامید در موشهای صحرایی (رت) مورد بررسی قرار گرفته است. عصاره‌ها پس از استخراج و خلص سازی با دوز ۲۵ mg/kg همراه با تیواستامید با دوز ۵۰ mg/Kg و بصورت درون صفاقی تزریق گردید. پس از خون گیری و جداسازی سرم، میزان فعالیت آمینوترانسفرازهای سرمی (SGOT و SGPT)، آلکالین فسفاتاز، بیلی روبین، سدیم و پتاسیم درون سرم اندازه‌گیری شد. کاهش میزان فعالیت آمینوترانسفرازهای سرمی، آلکالین فسفاتاز و بیلی روبین در گروههای دریافت کننده عصاره نسبت به گروه تیمار شده با تیواستامید به تنهایی، معنی دار بود. این نتایج نشان دهنده اثر حفاظتی این عصاره‌ها بر روی کبد می‌باشد که احتمالاً بواسطه توانایی آنها در مهار فعال سازی زیستی تیواستامید و در نتیجه مهار فعالیت سیتوکروم P450 و اثر خنثی کنندگی رادیکالهای آزاد می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: حفاظت کننده کبدی، تیواستامید، *Callendula officinalis*, *Silybum marianum*

### مقدمه

رادیکالهای آزاد می‌شوند (۱۹، ۲۵ و ۲۷). برخی عصاره‌های خام گیاهی مورد استفاده در طب سنتی، منبعی غنی از ترکیباتی با خواص پیش گیری کننده و حفاظت کننده بویژه در کبد هستند (۱، ۲ و ۱۴). عصاره بسیاری از گیاهان از جمله خارمریم، کاسنی، شیرین بیان، همیشه بهار و شاه تره دارای خواص آنتی اکسیدانی اثبات شده هستند (۲۰، ۲۳ و ۲۶). عصاره بذر خارمریم دارای فلاونوئیدهای متعدد از جمله سیلی بین، سیلی کریستین، سیلی دیانین و ایزوسیلی بین می‌باشد و این فلاونوئیدها اثرات آنتی اکسیدانی قوی دارند (۱۸). استفاده از خارمریم در طب سنتی به قبل از میلاد مسیح بر می‌گردد (۲۴). در مطالعات

مطالعه ترکیبات با منشاء گیاهی شاخه‌ای بسیار جالب در علوم پزشکی می‌باشد (۴). بسیاری از این ترکیبات دارای اثرات پیش گیری کننده بوده و می‌توانند در برخی جوامع با احتمال زیاد در مهار بیماریهای خاص مورد استفاده قرار گیرند (۲۹). در حال حاضر استفاده از میوه‌جات و سبزیجات بعلا اثرات حفاظتی آنها در برابر بیماریهای نظیر سرطان و بیماریهای قلبی- عروقی و کبدی روز به روز افزایش می‌یابد (۲۱ و ۱۰). این خاصیت اغلب بعلا وجود ترکیبات آنتی اکسیدانی در گیاهان از جمله ویتامین C، ویتامین B، کاروتنوئیدها، لیکوپنها و فلاونوئیدهایی می‌باشد که موجب جلوگیری از آسیبهای ناشی از

شد و تغذیه آنها با غذای استاندارد و بدون محدودیت انجام گرفت.

**تیمار موشهای صحرایی:** موشهای صحرایی بطور تصادفی به چهار گروه تقسیم و با علامتهایی بر روی دم نشانه گذاری شد. هر گروه در قفس جداگانه نگهداری شدند. گروه اول بعنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد که در هر بار تزریق سرم فیزیولوژی هم حجم محلول تزریقی سایر گروه ها دریافت کرد، این عمل بمنظور ایجاد شوک حاصل از تزریق انجام گرفت (۱۵). به گروه دوم تیواستامید (تهیه شده از شرکت مرک آلمان) با دوز  $mg/kg$  ۵۰ در سه روز متوالی بصورت درون صفاقی تزریق گردید. گروههای سوم و چهارم بترتیب عصاره پلی فنلی خارمریم (شاهد مثبت) و همیشه بهار را با دوز  $mg/kg$  ۲۵ همراه با تیواستامید با دوز  $mg/kg$  ۵۰ بصورت درون صفاقی دریافت کردند. دوز مناسب برای عصاره با انجام آزمایشات مقدماتی تعیین شد. عصاره خارمریم بدلیل اثر مشخص آن بعنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد.

**بررسیهای بیوشیمیایی:** ۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق موشهای صحرایی با کلروفورم بیهوش شده و خونگیری از طریق قلب انجام گرفت. خونها جمع آوری شده ۴۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری و سپس با ۴۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و سرم آنها جدا گردید. بمنظور ارزیابی و مقایسه عملکرد کبد در گروههای مختلف ترانس آمینازهای سرمی شامل آلانین آمینوترانسفراز و آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و بیلیروبین بروش آنزیمی و با استفاده از کیتهای تجاری اندازه گیری شد. این فاکتورها از شاخصهای کلینیکی در تشخیص بیماریهای کبدی هستند (۲۲). در این مطالعه همچنین سدیم و پتاسیم سرم توسط دستگاه فلیم فتومتر اندازه گیری شد.

**بررسیهای بافت شناسی:** پس از خونگیری موشها، کبد آنها خارج و بطور دقیق وزن گردید. سپس بمنظور انجام

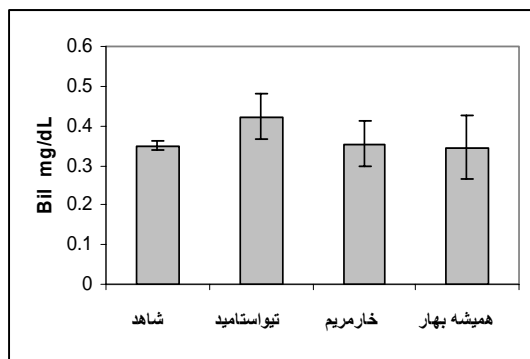
سالهای اخیر این گیاه در درمان بسیاری از بیماریها از جمله سرطان، ایدز، هپاتیت و مسمومیتهای کبدی مؤثر تشخیص داده شده است (۲۳ و ۲۴). از جمله اثرات این عصاره می توان به اثر آنتی اکسیدانی، آنتی ویروسی، ضد التهابی، تنظیم کننده سیستم ایمنی اشاره نمود (۵، ۶، ۱۱ و ۱۳). همیشه بهار نیز از جمله گیاهان دارویی شناخته شده است. گلهای همیشه بهار دارای ترکیبات بسیاری از جمله ساپونینها، گلیکوزیدها و فلاونوئیدها می باشند (۱۰ و ۲۸). اثرات ضد ویروسی، ضد توموری، آنتی موتازنی و آنتی اکسیدانی گلهای همیشه بهار مشخص شده است اما در حال حاضر یکی از مهمترین استفاده های این گیاه در درمان بیماریهای پوستی و التهابی می باشد (۱۰، ۲۸، ۷، ۱۶ و ۸). در مطالعه حاضر اثر آنتی اکسیدانی عصاره پلی فنلی خارمریم و همیشه بهار در برابر ماده اکسید کننده تیواستامید بر روی سلولهای کبدی رت بررسی شده است.

## مواد و روشها

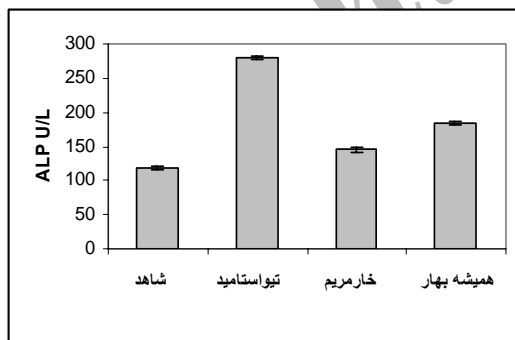
**تهیه عصاره گیاهی:** بذر خارمریم و گل همیشه بهار از مرکز تحقیقات جهاد سازندگی اصفهان تهیه گردید. سپس این گیاهان در سایه و دمای زیر ۵۰ درجه سانتی گراد خشک و بصورت پودر در آورده شدند. مقدار مورد نیاز از هر گیاه وزن و توسط الکل اتیلیک با درصدهای متفاوت در دو نوبت خیسانده و صاف شد. سپس عصاره الکلی بدست آمده توسط دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ و با کلروفورم دکانته شد. فاز آبی حاصل تحت شرایط مناسب خشک گردید. عصاره خشک شده در سرم فیزیولوژی حل و برای تزریق محلولی با غلظت مشخص تهیه شد.

**حیوانات آزمایشگاهی:** بمنظور انجام این مطالعه از موشهای صحرایی (رت) نر بالغ از نژاد Wistar با وزن حدود ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. موشها از انستیتو پاستور تهران خریداری و در حیوانخانه دانشکده داروسازی اصفهان تحت شرایط ۱۲ ساعت نور و تاریکی، دمای حدود ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت مناسب نگهداری

میزان بیلی‌روبین کل و فعالیت آلکالین فسفاتاز در گروه شاهد  $0/3498 \text{ mg/dL}$  و  $118 \text{ U/L}$  می‌باشد در صورتیکه در گروه تیواستامید با یک افزایش معنی‌دار به  $0/4226 \text{ mg/dL}$  و  $279 \text{ U/L}$  می‌رسد (نمودارهای ۳ و ۴). این مقادیر در گروه شاهد مثبت (خارمریم)  $0/3542 \text{ mg/dL}$  و  $145 \text{ U/L}$  و در گروه دریافت‌کننده عصاره همیشه بهار  $0/3458 \text{ U/L}$  و  $184 \text{ U/L}$  می‌باشد که کاهش آن نسبت به گروه تیمار شده با تیواستامید به تنهایی در ( $P < 0/001$ ) معنی‌دار است (نمودارهای ۳ و ۴).



نمودار ۳- مقایسه میانگین بیلی‌روبین سرم



نمودار ۴- مقایسه میانگین میزان فعالیت ALP

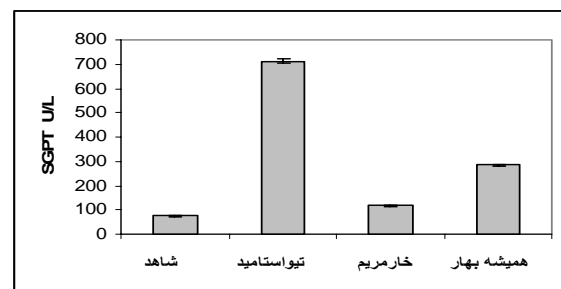
میزان سدیم، پتاسیم و درصد وزنی کبد نیز در گروه‌های مختلف اندازه‌گیری شد اما تلفات معنی‌داری بین گروه‌های مختلف مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ) (نمودارهای ۵ و ۶).

آزمایشات بافت‌شناسی کبد در محلول فرمالین ۱۰ درصد ثابت و نگهداری شد.

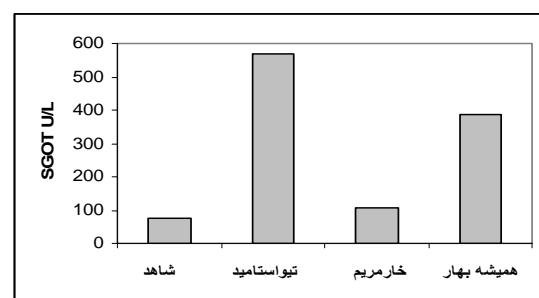
**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** جهت آنالیز داده‌ها از برنامه نرم‌افزاری SPSS استفاده شد. ابتدا داده‌های خام به رایانه داده شد و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه بر روی آنها انجام گرفت. به منظور بررسی معنی‌داری اختلافات از آزمون Tukey استفاده شد. معنی‌دار بودن اختلاف میانگینها در سطح  $p < 0/05$  بررسی شد.

## نتایج

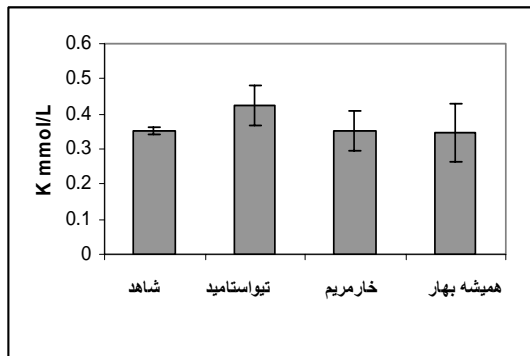
میانگین میزان فعالیت SGPT و SGOT در گروه شاهد به ترتیب  $76 \text{ U/L}$  و  $75 \text{ U/L}$  می‌باشد، این میزان در گروه تیواستامید  $568 \text{ U/L}$  و  $711 \text{ U/L}$  است (نمودارهای ۱ و ۲) که نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $P < 0/001$ ). در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره خارمریم و همیشه بهار همراه تیواستامید میزان فعالیت SGOT  $105$  و  $387 \text{ U/L}$  و میانگین فعالیت SGPT  $117$  و  $284 \text{ U/L}$  است که نسبت به گروه تیواستامید کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $P < 0/001$ ) (نمودارهای ۱ و ۲).



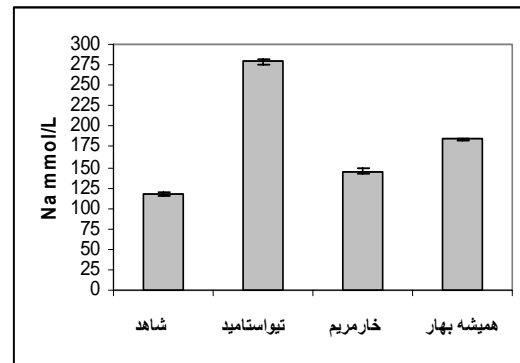
نمودار ۱- مقایسه میانگین میزان فعالیت SGPT



نمودار ۲- مقایسه میانگین میزان فعالیت SGOT



نمودار ۶- مقایسه میانگین میزان پتاسیم سرم



نمودار ۵- مقایسه میانگین میزان سدیم سرم

### بحث

آسیب کبدی ایجاد شده توسط تیواستامید بخوبی سمیت کبدی ایجاد شده توسط گزنوبیوتیکها را نشان می‌دهد و بطور معمول از آن بعنوان یک مدل مناسب برای مطالعه اثرات ضد سمیت کبدی و حفاظت کننده کبدی داروها و ترکیبات مختلف استفاده می‌شود (۱ و ۱۵).

در مطالعه حاضر افزایش میزان فعالیت آمینوترانسفرازها، آلکالین فسفاتاز و بیلی روبین بر اثر تیمار با تیواستامید مشخص کننده آسیب سلولهای کبدی توسط تیواستامید می‌باشد. زیرا این آنزیمها درون سلول جای دارند و در مواردی که سلول دچار آسیب شود وارد سرم می‌شوند (۲۲). تیواستامید علاوه بر اینکه یک سم کبدی است یک ماده پیش سرطانزا نیز می‌باشد که توسط آنزیمهای P450 موجود در میکروزومهای کبدی متابولیزه می‌شود، و در اثر اکسیداسیون به تیواستامید S-اکسید تبدیل می‌گردد (۹) و (۱۷). تیواستامید S-اکسید با ایجاد استرس اکسیداتیو موجب آسیب سلولهای کبدی و آپوپتوز و در نهایت نکروز این سلولها می‌شود. تماسهای طولانی مدت با تیواستامید منجر به سیروز یا سرطان کبد می‌گردد (۱۷ و ۳۰).

در مطالعه حاضر مشخص گردید که تیمار با عصاره پلی فنلی خارمریم و همیشه بهار موجب حفاظت سلولهای کبدی در برابر اثرات اکسیدانی تیواستامید می‌شود. احتمالاً این اثر بواسطه وجود ترکیبات فلاونوئیدها است. رادیکالهای آزاد ناشی از متابولیسم تیواستامید همانند سایر رادیکالهای آزاد از راههای مختلف پراکسیداسیون لیپیدها، واکنش با DNA و پروتئینهای غشایی موجب آسیب سلول می‌شوند (۳۰ و ۳). ترکیبات پلی فنلی، و بویژه فلاونوئیدها در مرحله نخست بر روی سیستم سیتوکروم P450 اثر مهاری داشته و از متابولیسم بیشتر تیواستامید جلوگیری می‌کنند و در نتیجه تولید رادیکالهای آزاد کاهش می‌یابد (۱۲). این ترکیبات همچنین بواسطه خاصیت آنتی اکسیدانی قادر هستند رادیکالهای آزاد موجود در محیط را خنثی کرده و از اثرات مخرب آنها جلوگیری بعمل آورند (۲۱، ۲۵ و ۲۴). ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدها همچنین می‌توانند سلول را در برابر تخلیه گلوتاتیون احیاء، با افزایش ظرفیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی (گلوتاتیون، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسید و کاتالاز) محافظت نمایند (۳ و ۳۱).

## منابع

- 1- Ahmad, A., Pillai, K. K., Najmi, A. K. and Pal, S. N. 2002. Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. *J. Ethnopharmacology*, 79: 35-41.
- 2- Ahmed, B., Alam, T. and Varshney, M. 2002. Hepatoprotective of two plants belonging to the Apiaceae and the Euphorbiaceae family. *J. Ethnopharmacology*, 79: 313-316.
- 3- Baer-Dubowska, W., Szafer, H. and Krajka-Kuzniak, V. 1998. Inhibition of murin hepatic cytochrom P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica*, 28: 735-743.
- 4- Barcelo, S., Gardiner, J. M., Gesher, A. and Chipman, J. K. 1996. CYP2E1-mediated mechanism of antigenotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane. *Carcinogenesis*, 17: 277-282.
- 5- Bartholomaeus, A. R., Bolton, R. and Ahokas, J. T. 1994. Inhibition of rat liver cytosolic glutathion S-transferase by silybin. *Xenobiotica* 24,(1): 17-24.
- 6- Basaga, H., Poli, G., tekkaya, C. and Aras, I. 1997. Free radical scavenging and antioxidative properties of silibin complexes on microsomal lipid peroxidation. *Cell Biochem. Funct.*, 15(1): 27-33.
- 7- Bilia, A. R., Bergonzi, M. C., Gallori, S., Mazzi, G. and Vincieri, F. F. 2002. Stability of the constituents of Calendula, Milk-thistle and Passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30: 613-624.
- 8- Boucaud-Maitre, Y., Algernon, O. and Raynaud, J. 1988. Cytotoxic and antitumoral activity of *Calendula officinalis* extracts. *Pharmazie*, 43: 220-221.
- 9- Bruck, R., Shirin, H., Aeed, H. and Matas, Z. 2001. Prevention of hepatic cirrhosis in rats by hydroxyl radical scavengers. *J. Hepatology* 35, 457-464.
- 10- Carreon, J. P., Iimenez, G. C. and Vega, J. L. 2002. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicology in vitro* 16, 235-258.
- 11- Comoglio, A., Tomasi, A., Malandrino, S., Poli, G. and Albano, E. 1995. Scavenging effect of silipide, a new silybin-phospholipid complex, on ethanol-derived free radicals. *Biochem. Pharmacol.* 50(8), 1313-1316.
- 12- Cordova, C. A., Siqueira, I. R., Netto, C. A., Yunes, R. A. and Volpato, A. M. 2002. Protective properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. *Redox Rep.*, 7 (2): 95-102.
- 13- Dehmlow, C., Murawski, N. and Groot, H. 1996. Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of silibinin in human cells. *Life Sci.*, 58(18), 1591-1600.
- 14- Germano, M. P., Sanogo, R. and Costa, C. 1999. Hepatoprotective properties in the rat of *Mitracarpus scaber* (rubiceae). *J. Pharm. Pharmacol.*, 51:729-734.
- 15- Jeong, J. S., Han, S. Y., Kim, Y. H. and Choi, Y. C. 2001. Altered remodeling of nucleolar machineries in cultured hepatocytes treated with thioacetamide. *J. Korean Med. Sci.*, 16(1): 75-82.
- 16- Kalvatchev, Z., Walder, R. and Garzaro, D. 1997. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flower. *Biomedical Pharmacotherapy* 51, 176-180.
- 17- Kim, K. H., Bae, J. H., Cha, S. W. and Han, S. S. 2000. Role of metabolic activation by cytochrome P450 in thioacetamide-induced suppression of antibody response in male BALB/C mice. *Toxicology Letters*, 114: 225-235.
- 18- Leng-Peschlow, E. and madause, A. G. 1996. Properties and medical use of flavonolignans from *Sylibum marianum*. *Phytotherapy Res.*, 1: 25-26.
- 19- Mitra, S. K., Venkataranganna, M. V., Sundaram, R. and Gopumadhavan, S. 1998. Protective effect of HD-03, a herbal formulatin, against various hepatotoxic agents in rats. *J. Ethnopharmacology*, 63: 181-186.
- 20- Papetti, A., Daglia, M. and Gazzani, G. 2002. Anti-and pro-oxidant activity of water soluble compounds in *Cichorium intybus* var. *Silvestre*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30: 939-945.
- 21- Pyo, Y. H., Lee, T. C., Logendra, L. and Rosen, R. T. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris*

- subspecies *cycla*) extracts. Food Chemistry 85, 19-26.
- 22- Sallie, R., Tredger, J. M. and William, R. 1991. Drug and the liver. Biopharmaceutical Drug Disposition, 12: 251-259.
- 23- Schonfeld, J. V., Weisbrod, B. and Muller, M. K. 1997. Silibinin, a plant extract with antioxidant and membrane stabilizing properties, protects exocrine pancreas from cycloporin A toxicity. CMLS Cellular and Molecular Life Sciences, 53: 917-920.
- 24- Schuppan, D., Jia, J. D., Brinkhaus, B. and Hahn, E. G. 1999. Herbal products for liver diseases. Hepatology, 30(4): 1099-1104.
- 25- Sun, F.. 2000. Evaluation of oxidative stress based on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apoptosis and necrosis caused by thioacetamide in rat liver. Biochimica et Biophysica Acta ,1500: 181-185.
- 26- Toit, R., Volstedt, Y. and Apostolides, Z. 2001. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. Toxicology ,166: 63-69.
- 27- Yang, Ch. S., Landau, J. M., Huang, M. T. and Newmark, H. L., (2001), Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, Annu. Rev. Nut., 21 : 381-406.
- 28- Yoshikawa, M., Murakami, T., Kishi, A., Kageura, T. and Matsuda, H. 2001. Medicinal flowers III. Marigold. (1): hypoglycemic, gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin ,49: 863-870.
- 29- Yuspa, S. H. 2000. Overview of carcinogenesis : past present and future. Carcinogenesis,21; 341-344.
- 30- Zaragoza, A., Andres, D., Sarrion, D. and Cascales, M. 2000. Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by phenobarbital pretreatment in rats, inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. Chemico-Biological Interactions ,124: 87-101.
- 31- Zix, M. H. and Agarwal, R. 1997. Novel cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin. Biochim. Biophys. Res. Commun., 239: 334-339.

## Hepatoprotective effects of *silybum marianum* and *callendula officinalis* polyphenolic extracts in rat

Madani, H.<sup>1</sup>, Asgari, S.<sup>2</sup>, Naderi, GH.A.<sup>2</sup>, and Taleb Al Hosseinni, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biology Dept., Science Faculty, Isfahan Univ., Isfahan, I.R. of Iran.

<sup>2</sup>Research Center Of Heart, Isfahan, I.R. of Iran.

### Abstract

Plants consumed humans contain thousands of phenolic compounds. The effects of dietary polyphenols are of great current interest due to their antioxidative and possible anticarcinogenic activities. Liver is one of the organ in body that exposure with many of oxidant and carcinogen agents thus antioxidant compounds are beneficial for liver health. In this study was investigation protective effects of *silybum marianum* and *callendula officinalis* against thioacetamide-induced hepatotoxicity in rat. After extraction and purification, the extracts were injected at a dosis of 25mg/Kg together with thioacetamide at a dosis of 50mg/Kg (P.C.). After blood collection and separation of serum, activities of aminotrasferases (SGOT and SGPT), alkalin phosphatas, Bilirubin, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> were measured in serum. Significant decrease in activity of aminotrasferases, alkalin phosphatas and Bilirubin were observed in groups treated with extracts in compared with thioacetamide treated group. These result show that protective effects of these extracts against the thioacetamide induced hepatotoxicity that may be due to its ability to block the bioactivation of thioacetamide, primarily by inhibiting the activity of Cyt P450 and its free radical scavenging.

Key words: Hepatoprotective. Thioacetamide. *silybum marianum*. *callendula officinalis*.