

## تأثیر محافظت کبدی عصاره‌ی هیدروالکی گیاه پنج برگ (*Potentilla reptans*) بر بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در مدل سمیت کبدی القاء شده توسط تتراکلریدکربن در موش صحرایی

حسام کاملی<sup>۱</sup>، زهره عبدالملکی<sup>۲\*</sup> و سیده پرستو یاسینی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۱۴

تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۷

### چکیده

تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و القای استرس اکسیداتیو، مکانیسم‌های اصلی ایجاد آسیب کبدی توسط بسیاری از سموم کبدی است. در مطالعه‌ی حاضر، اثر محافظتی عصاره‌ی گیاه پنج برگ بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو آسیب کبدی القا شده توسط تتراکلریدکربن (CCl<sub>4</sub>) در موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار آلبینو (۲۵۰-۲۳۰ گرم) به پنج گروه تقسیم شدند؛ گروه اول: آب مقطر خوراکی، سپس ۱ ml/kg نرمال سالین ۰/۹ درصد در روز ۱۶ به صورت داخل صفاقی (IP) دریافت کردند. گروه دوم: آب مقطر به صورت خوراکی، به دنبال آن در روز ۱۶ ۱ ml/kg روغن زیتون به صورت IP دریافت کردند. گروه سوم: آب مقطر به صورت خوراکی دریافت کردند، سپس در روز ۱۶ تک دوز از مخلوط ۵۰ CCl<sub>4</sub> درصد در روغن زیتون به صورت IP دریافت کردند. گروه‌های چهارم و پنجم: روزانه به ترتیب دوزهای ۱۰۰ mg/kg و ۲۵۰ عصاره به صورت خوراکی، سپس در روز ۱۶ تک دوز از مخلوط CCl<sub>4</sub> و روغن زیتون IP دریافت کردند. سپس فعالیت سرمی فراسنجه‌های بیوشیمیایی کبد آسپاراتات آمینوترانسفرازها (AST) و آلانین ترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، بیلی‌روبین (TB)، پروتئین تام (TP) و سطوح سرمی آنزیم‌های اکسیداتیو سوپراکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوکاتیون پراکسیداز (GPX) اندازه‌گیری شد. نتایج تحقیق نشان داد که تتراکلریدکربن در موش‌های گروه شاهد سبب افزایش سرمی آنزیم‌های ALT, AST, ALP و بیلی‌روبین تام، کاهش سطح پروتئین تام و فعالیت آنزیم‌های SOD, CAT و GPX گردید. درمان با عصاره در دوز ۲۵۰ mg/kg سطوح افزایش یافته سرمی آنزیم‌های ALT, AST و ALP ناشی از تتراکلریدکربن را به صورت معنی‌دار متعادل ساخت. همچنین عصاره‌ی گیاه در دوزهای ۱۰۰ mg/kg و ۲۵۰ mg/kg سبب افزایش سرمی آنزیم‌های SOD و GPX گردید. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد عصاره‌ی هیدروالکی گیاه پنج برگ احتمالاً از طریق تعدیل آنزیم‌های سم‌زدایی کننده و فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی سبب محافظت از کبدی می‌شود.

کلمات کلیدی: عصاره هیدروالکی پنج برگ، تتراکلرید کربن، بیومارکر، سمیت کبدی، استرس اکسیداتیو

### مقدمه

باعث ایجاد متابولیت‌های سمی و فعال از جمله رادیکال‌های آزاد می‌شود که می‌تواند موجب آسیب بافت‌های مختلف از جمله کبد شود (Jaeschke et al., 2002). رادیکال‌های آزاد، اتم یا مولکول‌های فعالی هستند که میل ترکیبی شدیدی با سایر مولکول‌های اطراف

یکی از مهم‌ترین اعمال کبد علاوه بر سوخت و ساز مواد مختلف، سم‌زدایی گزنوبیوتیک‌ها، مواد آلوده‌کننده‌ی محیطی و داروهای شیمیایی می‌باشد (Braet and Wisse, 2002). در اکثر موارد طی فرآیند سم‌زدایی، فعالیت متابولیکی آنزیم‌های سیتوکروم P450 میکروزوم‌های کبدی

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

<sup>۲\*</sup> استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

(نویسنده‌ی مسئول) E-mail: zohreh.abdolmaleki@kiau.ac.ir

<sup>۳</sup> استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

گاه چالش‌هایی در درمان ایجاد می‌شود که استفاده از طب سنتی یا مکمل به همراه طب نوین می‌تواند آن را حل نماید (Batey et al. 2005, Stickel and Schuppan).  
2010, Ferrucci et al. (2007).

مطالعات قبلی نشان داده است که اغلب ترکیبات طبیعی و به خصوص گیاهان دارویی می‌توانند منبع بسیار مهمی به منظور یافتن ترکیبات جدیدتر داروها باشند. یکی از مهم‌ترین گیاهان در بین گیاهان دارویی گیاه پنچ برگ با نام علمی *Potentilla reptans*، نام انگلیسی Five leaf از تیره‌ی گل سرخ (Rosaceae) است (Zargari 2007, De Natale and Pollio 1995). این گیاه علفی، پایا با ساقه‌های منشعب و خوابیده بر روی زمین است که در مزارع مرطوب ایران، آمریکای شمالی و نواحی معتدل آسیا و ایران می‌روید. در ایران در مناطقی همچون گرگان، همدان، اراک و لرستان یافت می‌شود. در طب سنتی ایران از این گیاه به عنوان ضدالتهاب، تصفیه‌کننده‌ی خون، قطع‌کننده‌ی خون‌ریزی‌های داخلی استفاده شده است (Zargari 1995). در چندین سال اخیر مطالعه بر روی خواص ضد میکروبی، ضد سرطانی بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی و نیز خواص آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مختلف گیاه *Potentilla* مورد توجه قرار گرفته است (Tomczyk et al. 2008, Tomczyk et al. 2011, Paduch 2015, Tomovic et al. 2015, et al.).

نظر به این که گونه‌ای از گیاه پنچ برگ با نام علمی *Potentilla reptans* بومی مناطق مختلفی از ایران است و مطالعه‌ای در خصوص نقش عصاره‌ی *Potentilla reptans* در افزایش یا کاهش شاخص‌های دخیل در استرس اکسیداتیو وجود ندارد، انجام مطالعاتی در خصوص بررسی اثرات محافظت یا عدم محافظت از کبد در نتیجه مسمومیت کبدی، ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این تحقیق، مطالعه‌ی تأثیر عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه پنچ برگ (*Potentilla reptans*) بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو از جمله سوپراکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) و نیز

خود دارند و در صورت عدم جلوگیری از فعالیت آن‌ها، می‌توانند منجر به آسیب اکسیداتیو شوند. تخریب بافتی حاصل از آسیب‌های اکسیداتیو سبب پیری، بیماری‌های تحلیل‌برنده و نیز افزایش احتمال بروز بیماری‌های قلبی-عروقی و انواع سرطان‌ها می‌شود (Jaeschke et al. 2002, Kohen and Nyska 2002).

در حالت طبیعی رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر ایجاد شده در بدن به وسیله‌ی دفاع آنتی-اکسیدانی بدن از بین می‌روند. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی حاوی یک مجموعه از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی متشکل از ویتامین‌های A، E و C، گلوکاتایون، فلاونوئیدها و یوبی‌کینون (کوآنزیم کیو 10) می‌باشد. عدم تعادل در میزان تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی موجب بروز استرس اکسیداتیو و آسیب‌های جدی به سیستم بیولوژیک می‌شود. در نتیجه جهت از بین بردن رادیکال‌های آزاد، رژیم غذایی حاوی مواد آنتی‌اکسیدانی مورد نیاز است (Kohen and Nyska 2002, Gebicki 2016).

تراکلریدکربن یکی از مواد شیمیایی بسیار سمی و خطرناک است که مواجهه با آن منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی به همراه افزایش سطح آنزیم‌های کبدی و در ادامه نکرروز، سیروز، سرطان کبد و در نهایت کما یا مرگ می‌شود (Weber et al. 2003). رادیکال‌های آزاد مشتق از تراکلریدکربن در نهایت باعث کاهش و یا غیرفعال شدن آنزیم‌های دخیل در واکنش‌های اکسیداتیو می‌گردند (Ha and Lee 2003, Lin, Tseng et al. 2008).

به همین دلیل تلاش در پی کشف و استفاده از ترکیباتی که اثر حفاظت کبدی داشته باشند رو به افزایش می‌باشد. از این رو در سال‌های اخیر، توجه به طب‌های مکمل و اثرات درمانی ترکیبات طبیعی با منشاء گیاهی افزایش یافته است (Brewer 2011). علی‌رغم پیشرفت‌های قابل توجهی که در طب مدرن برای درمان یا کاهش سرعت پیشرفت بیماری‌های گوناگون حاصل شده،

روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند، همچنین آب و غذا به صورت روزانه و آزاد در اختیار آنها قرار داده شد. پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی و همچنین اخذ کد اخلاق با شناسه‌ی IR.IAU.K.REC.1396,41 از کمیته‌ی اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج انجام گرفت.

پیش از شروع تحقیق به منظور سازگاری حیوانات با محیط جدید، موش‌ها به محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی در دانشکده‌ی دامپزشکی منتقل و سپس به صورت تصادفی به ۵ گروه ۷ تایی تقسیم‌بندی شدند: ۱- گروه یک (گروه کنترل)، ۱۶ روز آب مقطر به صورت خوراکی با سرنگ گاوژ و در روز ۱۶ ml/kg B.W از نرمال سالین ۰/۹ درصد به شکل تزریقی داخل صفاقی (IP) دریافت کردند.

۲- گروه دوم (گروه دریافت کننده‌ی روغن زیتون)، ۱۶ روز آب مقطر به صورت خوراکی با سرنگ گاوژ و در روز ۱۶ روغن زیتون ۱ ml/kg B.W به شکل IP دریافت کردند (از روغن زیتون به عنوان حلال CCl<sub>4</sub> استفاده می‌شود).

۳- گروه سوم (گروه شاهد، دریافت کننده CCl<sub>4</sub>)، ۱۶ روز آب مقطر به صورت خوراکی با سرنگ گاوژ و در روز ۱۶ مخلوط ۵۰ CCl<sub>4</sub> درصد در روغن زیتون را که با فیلتر سرسرنگی استریل شده با نسبت (۱:۱) با دوز ۱ ml/kg B.W به شکل IP دریافت کردند.

۴- گروه چهارم، گروه تیمار اول بوده و به مدت ۱۶ روز از عصاره‌ی گیاه با دوز ۱۰۰ mg/kg B.W به صورت خوراکی و با سرنگ گاوژ دریافت کردند، سپس در روز ۱۶ مخلوطی از ۵۰ CCl<sub>4</sub> درصد و روغن زیتون را که با فیلتر سرسرنگی استریل شده با نسبت (۱:۱) با دوز ۱ ml/kg B.W به شکل IP دریافت کردند.

۵- گروه پنجم، گروه تیمار دوم بوده و که به مدت ۱۶ روز از عصاره‌ی گیاه با دوز ۲۵۰ mg/kg B.W به صورت خوراکی و با سرنگ گاوژ دریافت کردند سپس در روز

فراسنجه‌های بیوشیمیایی نظیر آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین ترانسفراز (ALT) و آلکالین ترانسفراز (ALP)، بیلی‌روبین (TB) و پروتئین تام (TP) در نمونه‌های سرمی در موش‌های صحرایی نر هپاتوتوکسیک ناشی از تتراکلریدکربن بود.

## مواد و روش کار

برای انجام این تحقیق نمونه‌های گیاه پنج برگ با نام علمی *Potentilla reptans* از استان گرگان، حوالی شهرستان گلستان، منطقه‌ی تنگراه توسط آقای دکتر اجنی دکترای سیستماتیک گیاهی، جمع‌آوری شد و برای تأیید به هرباریوم مرکزی دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران ارجاع شد، بعد از تأیید و اخذ کد هرباریومی با مشخصه‌ی (THE 6912) گیاه در آزمایشگاه در دمای اتاق، خشک و سپس توسط آسیاب مکانیکی آسیاب و غربال شد و پودری یک دست حاصل گردید.

برای تهیه‌ی عصاره، ۱۵۰ گرم از برگ خشک گیاه به مدت ۷۲ ساعت در مجاورت با ۳۰۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد + ۲۰ درصد آب مقطر قرار داده شد تا مواد مؤثره‌ی گیاه استخراج گردد، سپس مخلوط به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شد. در مرحله‌ی آخر، مجموعه‌ی حلال آلی و عصاره به مدت یک هفته در زیر هود درون ظرف پتری قرار داده و کاملاً خشک شد. پس از گذشت یک هفته عصاره‌ی به دست آمده در یک ظرف درب‌دار شیشه‌ای ریخته و در جایی دور از نور و در دمای یخچال نگهداری شد. به منظور تیمار موش‌های صحرایی نر، دوزهای ۱۰۰ mg/kg B.W و ۲۰۰ از عصاره در مقدار مناسب از آب مقطر (Distilled water) حل شد.

در این تحقیق از ۳۵ موش صحرایی نر بالغ نژاد Wistar در محدوده‌ی وزنی ۲۳۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات از مؤسسه‌ی انستیتوپاستور ایران خریداری شدند و در دمای حدود ۲۲±۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت

مطابق با دستور سازنده‌ی کیت بر اساس روش رنگ سنجی استفاده گردید. فعالیت آنزیم SOD در طول موج ۴۲۰nm، آنزیم GPX در طول موج ۴۱۲nm و آنزیم CAT در طول موج ۴۰۵nm با استفاده از دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری شد (Hosseini-Zijoud et al. 2016).

نتایج به دست آمده به کمک نرم‌افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۲۵ مورد تحلیل قرار گرفت. تفاوت متغیرها بین گروه‌های مختلف مطالعه برای شاخص‌های پیوسته به کمک آزمون واریانس یک‌طرفه ANOVA و برای شاخص‌های ناپیوسته به کمک آزمون کروسکال وایس با سطح معنی‌داری  $P < 0/05$  انجام شد. همچنین همبستگی بین دوز عصاره‌ی گیاه و مقادیر هر یک از شاخص‌های بیوشیمیایی به کمک آزمون اسپیرمن با سطح معنی‌داری  $P < 0/05$  مورد بررسی قرار گرفت.

### نتایج

فعالیت سرمی آنزیم‌های AST، ALT و ALP در موش‌هایی که CCl<sub>4</sub> را به تنهایی دریافت کرده‌اند (گروه شاهد) در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت. در موش‌های هپاتوتوکسیک با CCl<sub>4</sub>، تیمار با عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه پنج برگ با دوز ۱۰۰mg/kg/B.W سطوح افزایش یافته آنزیم‌های کبدی را نسبت به گروه شاهد کاهش داد، اما اختلاف معنی‌دار فقط در مورد سطح سرمی آنزیم ALP مشاهده گردید ( $P < 0/05$ ). همچنین نتایج نشان داد که تیمار با دوز ۲۵۰mg/kg/B.W سبب کاهش معنی‌دار سطوح سرمی افزایش یافته آنزیم‌های کبدی AST، ALT و ALP گردید ( $P < 0/001$ ) (جدول ۱).

۱۶ مخلوطی از CCl<sub>4</sub> ۵۰ درصد و روغن زیتون را که با فیلتر سرسرنگی استریل شده با نسبت (۱:۱) با دوز ml/kg B.W ۱ به شکل IP دریافت کردند.

پس از گذشت ۴۸ ساعت، با رعایت اصول اخلاقی با استفاده از ترکیب کتامین ۱۰ درصد (۸۰mg/kg) و زایلازین ۲ درصد (۱۰mg/kg) به صورت داخل صفاقی بیهوش شدند. پس از اطمینان از بیهوشی کامل، نواحی سینه و شکم حیوانات شکافته شد و با استفاده از سرنگ انسولین، خون‌گیری مستقیم از قلب صورت گرفت. پس از اخذ خون حیوانات با استفاده از تکنیک جا به جایی مهره‌های گردن کشته شدند. نمونه‌های خون به دست آمده در داخل لوله‌های آزمایش فاقد ماده‌ی ضد انعقاد هپارین به مدت ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند. سپس سرم نمونه‌های خون با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ (دور  $3000 \times g$  به مدت ۵ دقیقه و دمای  $4^{\circ}C$ ) جمع‌آوری شد و به میکروتیوب ۲ml منتقل شد. میکروتیوب‌های حاوی سرم خون در دمای  $20^{\circ}C$  تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند.

سطح سرمی آنزیم‌های کبدی آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین ترانسفراز (ALT) و آلکالین ترانسفراز (ALP)، مقادیر پروتئین تام (TP) و بیلی‌روبین تام (TB) با استفاده از کیت‌های بیوشیمیایی پارس آزمون ایران مطابق با دستورالعمل شرکت‌های سازنده با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر مدل BT-3000 کمپانی BIOTECNICA ایتالیا مورد سنجش قرار گرفتند (Sadeghi et al. 2008, Panahi Kokhdan et al. 2017).

جهت سنجش فعالیت سرمی آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز (SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) از کیت‌های شرکت Zellbio GmbH, Germany

جدول ۱: تغییرات میانگین  $\pm$  انحراف معیار یا خطای استاندارد در موش‌های صحرایی هیپاتوتوکسیک ناشی از تراکلریدکربن تحت

درمان با عصاره‌ی هیدروالکلی *Potentilla reptans*

ALP (iu/l)	ALT (iu/l)	AST (iu/l)	TB (mg/dl)	TP (g/dl)	پارامتر / گروه
289/3 ± 62/9	69/8 ± 10/45	134/7 ± 31/2	0/50 ± 0/01	6/60 ± 0/11	اول (کنترل)
278/7 ± 63/7	65/5 ± 10/09	126/6 ± 21/7	0/51 ± 0/01	6/27 ± 0/12	دوم (روغن زیتون)
706/7 ± 131/6***	243/0 ± 32/3***	336/0 ± 92/12***	0/58 ± 0/01*	5/34 ± 0/25**	سوم (گروه شاهد)
369/7 ± 49/7##	147/6 ± 28/4	207/0 ± 37/3	0/50 ± 0/01	6/40 ± 0/12	چهارم (100 mg/kg)
279/6 ± 29/1###	133/5 ± 32/6###	168/4 ± 30/5###	0/48 ± 0/01	6/41 ± 0/06	پنجم (250 mg/kg)

TP = پروتئین تام، TB = بیلی‌روبین تام، AST = آسپاراتات آمینوترانسفراز، ALT = آلانین ترانسفراز و ALP = آلکالین ترانسفراز کلیه‌ی داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار می‌باشد.

\* P < 0/05 نسبت به گروه کنترل، \*\* P < 0/01 نسبت به گروه کنترل و \*\*\* P < 0/001 نسبت به گروه کنترل # P < 0/05 نسبت به گروه شاهد، ## P < 0/01 نسبت به گروه شاهد و ### P < 0/001 نسبت به گروه شاهد

در موش‌های صحرایی هیپاتوکسیک گروه شاهد سطح سرمی آنزیم‌های SOD، CAT و GPX در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت (P < 0/05). تجویز عصاره‌ی گیاه در دوزهای 100 mg/kg B.W و 250 در موش‌های هیپاتوتوکسیک سبب افزایش معنی‌دار آنزیم‌های SOD و GPX نسبت به گروه شاهد گردید (P < 0/05). مقدار سرمی آنزیم CAT در گروه تیمار دریافت‌کننده‌ی دوز 100 mg/kg B.W عصاره نسبت به گروه شاهد افزایش یافت اما اختلاف آماری بین دو گروه معنی‌داری نبود، در حالی که فعالیت سرمی آنزیم CAT در گروه تیمار دریافت‌کننده‌ی دوز 250 mg/kg B.W نسبت به گروه تیمار اول و گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (P < 0/05)، تجویز عصاره در دوز 250 mg/kg B.W نتوانست فعالیت سرمی آنزیم SOD را به طور معنی‌داری تا حد نرمال افزایش دهد (P < 0/01). همچنین فعالیت سرمی آنزیم‌های اکسیداتیو SOD، CAT و GPX در گروه دریافت‌کننده‌ی روغن زیتون با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

غلظت پروتئین تام سرم در موش‌های گروه شاهد در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد (P < 0/05). در حالی که استفاده هم‌زمان از CCl4 و عصاره‌ی گیاه در گروه‌های تیمار اول و دوم به ترتیب با دوزهای 100 mg/kg B.W و 250 باعث افزایش سرمی پروتئین تام گردید، اما در مقایسه با گروه شاهد این اختلاف معنی‌دار نبود. برعکس غلظت بیلی‌روبین تام سرم در گروه شاهد در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت و تجویز عصاره‌ی گیاه در دوزهای 100 mg/kg B.W و 250 در موش‌های هیپاتوتوکسیک نتوانست به شکل معنی‌داری سبب کاهش غلظت بیلی‌روبین تام سرم گردد. همچنین مقایسه‌ی فراسنجه‌های بیوشیمیایی مانند آنزیم‌های کبدی AST، ALT و ALP و پروتئین تام و بیلی‌روبین تام سرمی، بین گروه موش‌های دریافت‌کننده‌ی روغن زیتون با گروه کنترل نشان داد که اختلاف این دو گروه معنی‌داری نبود (جدول ۱).

جدول ۲: میانگین  $\pm$  انحراف معیار یا خطای استاندارد بر میزان سرمی آنزیم‌های کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز در موش‌های صحرائی هپاتوتوکسیک ناشی از تراکلریدکربن تحت درمان با عصاره‌ی هیدروالکلی *Potentilla reptans*

گروه	آنزیم	Cat (iu/ml)	GPX (iu/ml)	SOD (iu/ml)
اول (کنترل)		۱۶/۹ $\pm$ ۰/۹۷	۶۵۶/۸ $\pm$ ۲۳/۵۸	۵۴/۶ $\pm$ ۱/۰۷
دوم (روغن زیتون)		۱۶/۲ $\pm$ ۱/۱۹	۶۲۰/۸ $\pm$ ۲۲/۸۰	۵۴/۳ $\pm$ ۲/۴۰
سوم (گروه شاهد)		۱۰/۱ $\pm$ ۱/۱۲**	۴۳۱/۲ $\pm$ ۴۵/۰۵**	۴۲/۱ $\pm$ ۰/۷۰*
چهارم (۱۰۰ mg/kg)		۱۱/۲ $\pm$ ۰/۹۹	۵۷۰/۴ $\pm$ ۱۸/۸۳#	۵۱/۵ $\pm$ ۰/۹۸#
پنجم (۲۵۰ mg/kg)		۱۴/۳ $\pm$ ۱/۲۷#	۵۸۳/۵ $\pm$ ۲۴/۵۸###	۵۴/۰ $\pm$ ۱/۱۸###

کلیدی داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار می‌باشد.

\*  $P < 0/05$  نسبت به گروه کنترل و \*\*  $P < 0/01$  نسبت به گروه کنترل

#  $P < 0/05$  نسبت به گروه شاهد، ##  $P < 0/01$  نسبت به گروه شاهد و ###  $P < 0/001$  نسبت به گروه شاهد

## بحث

افزایش می‌یابد و این حالت سبب آزادسازی آنزیم‌هایی به جریان خون می‌شوند که در حالت طبیعی درون سیتوزول سلولی هستند. در نتیجه به منظور تشخیص آسیب‌های کبدی، سطوح سرمی آنزیم‌های ALT، AST و ALP به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند. در واقع افزایش سطح سرمی آنزیم‌های فوق‌الذکر بیانگر آسیب ساختار و در نتیجه اختلال عملکرد غشای سلولی در کبد و معرف درجه و نوع آسیب کبدی می‌باشد. همچنین کاهش پروتئین تام و افزایش غلظت بیلی‌روبین سرم نشان دهنده‌ی آسیب به سلول‌های کبدی ناشی از سموم هپاتوتوکسیکی همانند CCl<sub>4</sub> است (Drotman and Lawhorn 1978, Soni et al. 2008).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، تراکلریدکربن با ایجاد آسیب در سلول‌های کبدی سبب افزایش معنی‌داری غلظت سرمی آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP در موش‌های گروه شاهد در مقایسه با گروه کنترل شد. در موش‌های هپاتوتوکسیک که عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه پنج برگ دریافت کرده‌اند، فعالیت سرمی آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP به صورت وابسته به دوز در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش نشان یافت.

درمان بیماری‌های کبدی یکی از چالش‌های مهم به شمار می‌رود. از آن جایی که اکثر داروهای سنتتیک مورد استفاده برای درمان این بیماری‌ها دارای عوارض جانبی هستند، تلاش‌ها به سمت یافتن داروهای مناسب گیاهی دارای عوارض جانبی کم‌تر، سمیت کم‌تر و قیمت ارزان‌تر، سوق داده می‌شود (Luk et al. 2007). در بدن سمیت‌زدایی توسط آنزیم‌های سیتوکروم اکسیداز P450 کبدی صورت می‌گیرد که بسته به نوع متابولیت اولیه، گاهی سبب تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی فعال و سمی می‌شود که به کبد و دیگر بافت‌های بدن آسیب می‌رساند (Kim et al. 2000). از جمله ترکیباتی که توسط سیستم سیتوکروم اکسیداز تجزیه می‌شود، تراکلریدکربن به عنوان یک ترکیب هپاتوتوکسیک است. این ترکیب سبب می‌شود آسیب کبدی از استئاتوز به سرعت به نکروز لوپول مرکزی تبدیل شود. علت سمیت CCl<sub>4</sub> شکسته شدن پیوند کربن - کلر است که به دنبال آن رادیکال آزاد تری کلرومتیل ایجاد می‌شود (Ha and Lee 2003, Weber et al. 2003, Lin et al. 2008). اتصال رادیکال‌های آزاد به غشای هپاتوسیت‌ها سبب آسیب غشا و نکروز می‌شود، در نتیجه فعالیت آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP

نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت. به دلیل تشکیل فراوان آنیون‌های سوپراکسید، به نظر می‌رسد که غیرفعال شدن سوپراکسید دسموتاز توسط آنیون‌های افزایش یافته سوپراکسید، منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌های کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز می‌شود. در این مطالعه، تجویز خوراکی عصاره‌ی برگ گیاه پنج برگ احتمالاً از طریق جبران فعالیت سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی و از طریق خشی سازی رادیکال‌های آزاد اثرات حفاظتی خود را اعمال کرده است و تیمار با دوزهای ۱۰۰ mg/kg B.W و ۲۵۰ mg/kg B.W عصاره‌ی گیاه پنج برگ در موش‌های هپاتوتوکسیک با CCl<sub>4</sub> سبب افزایش معنی دار فعالیت سرمی آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز (فقط در دوز ۲۵۰ mg/kg B.W) شد. به نظر می‌رسد بخشی از خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه پنج برگ به علت وجود ترکیبات فنولیک و فلاونوئید موجود در گیاه است. در مطالعات متعدد جهت شناسایی پروفایل فیتوشیمیایی گونه‌های مختلف جنس *Potentilla* ثابت شده است که این گیاه حاوی ترکیباتی همچون فنول، فلاونوئیدها (نظیر کومیفروول، کیورستین و انواع گلیکوزیدها)، کوماریک اسید، کافئیک اسید، فرولیک اسید است (Tomczyk and Latté 2009) که نقش مواد فنولیک و فلاونوئیدی در کاهش رادیکال‌های آزاد مشتق از اکسیژن، همچنین کاهش آزادسازی پروستاگلاندین-2 و مهار فعالیت آنزیم دخیل در پاتوژن التهاب (۵- لپوکسیژناز) و در نتیجه دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی کاملاً به اثبات رسیده است (Liu 1995, Nijveldt et al. 2001, Ikeda et al. 2008). در مطالعات مختلف به منظور ارزیابی ترکیبات فعال با خواص فارماکولوژیکی موجود در گونه‌های مختلف گیاه پنج برگ تأیید شد که عصاره‌ی گیاه دارای ترکیباتی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی بالایی است و غلظت این مواد در ریزوم و ریشه‌ی گیاه بیش از اندام‌های هوایی مانند ساقه‌ها و برگ‌های آن است و پیشنهاد کردند که این گیاه می‌تواند گزینه‌ی مناسبی جهت درمان بیماری‌های التهابی

کاهش فعالیت سرمی آنزیم‌های کبدی و نزدیک شدن به مقادیر گروه کنترل توسط عصاره‌ی گیاه پنج برگ می‌تواند به دلیل خاصیت محافظت کننده‌ی کبدی عصاره‌ی گیاه پنج برگ باشد. همچنین در موش‌های هپاتوتوکسیک که CCl<sub>4</sub> را به تنهایی دریافت کردند (گروه شاهد)، در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری غلظت بیلی‌روبین تام سرمی افزایش و سطح سرمی پروتئین تام کاهش یافت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تیمار با دوزهای ۱۰۰ mg/kg B.W و ۲۵۰ mg/kg B.W عصاره‌ی گیاه پنج برگ سبب افزایش غلظت سرمی پروتئین تام و کاهش غلظت سرمی بیلی‌روبین تام شده است اما در مقایسه با گروه شاهد این اختلاف معنی دار نبود.

سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که یک سیستم تدافعی را علیه گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (Reactive oxygen species; ROS) تشکیل داده‌اند (Gebicki 2016). کاهش فعالیت سوپراکسید دسموتاز شاخصی حساس در مورد آسیب سلول‌های کبدی است. این آنزیم یکی از مهم‌ترین عوامل در سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی آنزیماتیک است. سوپراکسید دسموتاز آنیون سوپراکسید را از طریق تبدیل آن به پراکسید هیدروژن پاکسازی نموده و بدین ترتیب اثرات توکسیک آن را کاهش می‌دهد (Szymonik-Lesiuk et al. 2003, Naik and Panda 2007, Yang et al. 2008). کاتالاز نیز آنزیم آنتی‌اکسیدانی است که در بافت‌های حیوانی به طور گسترده‌ای منتشر بوده و دارای بیش‌ترین فعالیت در کبد و گلبول‌های قرمز است. کاتالاز پراکسید هیدروژن را تجزیه می‌کند و باعث محافظت بافت‌ها از رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل می‌شود. بنابراین کاهش فعالیت کاتالاز می‌تواند منجر به برخی اثرات مخرب ناشی از رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن گردد (Szymonik-Lesiuk et al. 2003). در تحقیق حاضر، میزان سرمی آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز، همچنین فعالیت آنزیم‌های زدا کننده پراکسید هیدروژن یعنی کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز در موش‌های گروه شاهد

کلسترول تام (TC)، تری‌گلیسرید (TG) و LDL-c در موش‌های صحرایی دیابتیک تحت درمان با TFE یا TTE کاهش یافت و سطح HDL-c بیش‌تر از موش‌های دیابتیک گروه کنترل گردید، به علاوه سطح MDA و NO را کاهش داد، در حالی که سطح SOD و GSH در موش‌های دیابتیک تحت درمان با عصاره‌ی افزایش پیدا کرد. همچنین در مشاهدات هیستوپاتولوژیک مشخص شد عصاره‌ی اثرات محافظتی بر روی سلول‌های بتا لوزالمعده‌ی موش‌های دیابتیک دارد (Zhang et al. 2010).

در یک نتیجه‌گیری کلی از این مطالعه می‌توان دریافت که عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه پنج برگ توانست اثرات سمی ناشی از تتراکلریدکربن را در کبد کاهش دهد. هر چند که مکانیسم دقیق عملکرد عصاره‌ی گیاه مشخص نیست، اما با توجه به نتایج مطالعات فیتوشیمیایی می‌توان این گونه استنباط کرد که ترکیبات فنولیک موجود در گیاه مسوول خواص آنتی‌اکسیدانی آن به شمار می‌رود و پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آتی مکانیسم‌های عملکرد آنتی‌اکسیدان‌های موجود در گیاه مورد ارزیابی قرار گیرد.

باشد (Damien Dorman et al. 2011, Tomovic et al. 2015).

مطالعات محدودی درباره‌ی اثرات فارماکولوژیک گیاه *Potentilla* در ایران و جهان صورت گرفته است. مطالعه‌ی خواص آنتی‌اکسیدانی و همچنین بررسی اثرات عصاره‌ی آبی و الکلی گیاه *Potentilla reptans* بر فاکتورهای HDL، LDL، کلسترول و تری‌گلیسرید و نیز آنزیم‌های کبدی موش‌های سوری نشان داد که عصاره‌ی اتانولی گیاه سبب افزایش معنی‌دار سطح HDL همچنین کاهش معنی‌دار آنزیم‌های کبدی ALT و AST و افزایش میزان نیتریک اکساید گردید (Avcı et al. 2006). در تحقیق جامعی که برای بررسی اثرات ضدالتهاب و آنتی-اکسیدانی عصاره‌ی *Potentilla discolor* بر موش دیابتی شده توسط استریتوزوتوسین همراه با دریافت رژیم غذایی با چربی بالا انجام شد، محققین به این نتیجه رسیدند که موش‌های دیابتیک که تحت درمان با total (TFE) flavonoids extract یا total tripenoids extract (TTE) قرار داشتند، غلظت FBG (fasting blood glucose) و GSP (glycosylated serum proterin) در گروه‌های درمان نسبت به گروه کنترل کاهش یافت و همچنین سطح

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از زحمات جناب آقای دکتر اجنی از اعضای بانک گیاهی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## منابع

- Avcı, G.; Kupeli, E.; Eryavuz, A.; Yesilada, E. and Kucukkurt, I. (2006). Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3): 418-423.
- Batey, R.G.; Salmond S.J. and Bensoussan, A. (2005). Complementary and alternative medicine in the treatment of chronic liver disease. *Current Gastroenterology Reports*, 7(1): 63-70.
- Braet, F. and Wisse, E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comparative Hepatology*, 1(1): 1.
- Brewer, M. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4): 221-247.
- Damien Dorman, H.J.; Shikov, A.N.; Pozharitskaya, O.N. and Hiltunen, R. (2011). Antioxidant and Pro-Oxidant Evaluation of a *Potentilla alba* L. Rhizome Extract.. *Chemistry and Biodiversity*, 8(7): 1344-1356.

- De Natale, A. and Pollio, A. (2007). Plants species in the folk medicine of Montecorvino Rovella (inland Campania, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2): 295-303.
- Drotman, R. and Lawhorn G. (1978). Serum enzymes as indicators of chemically induced liver damage. *Drug and Chemical Toxicology* 1(2): 163-171.
- Ferrucci, L.M.; Bell, B.P.; Dhotre, K.B.; Manos, M.M.; Terrault, N.A.; Zaman, A. et.al. (2010). Complementary and alternative medicine use in chronic liver disease patients. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 44(2): e40.
- Gebicki, J.M. (2016). Oxidative stress, free radicals and protein peroxides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595: 33-39.
- Ha, B.J. and Lee J.Y. (2003). The effect of chondroitin sulfate against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(5): 622-626.
- Hosseini-Zijoud, S.M.; Ebadi, S.A.; Goodarzi, M.T.; Hedayati, M.; Abbasalipourkabir, R.; Mahjoob, M.P. et al. (2016). Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with medullary thyroid carcinoma: A case-control study. *Journal of clinical and diagnostic research, Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(2): BC04.
- Ikeda, Y.; Murakami, A. and Ohigashi, H. (2008). Ursolic acid: An anti-and pro-inflammatory triterpenoid. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(1): 26-42.
- Jaeschke, H.G.; Gores, J.; Cederbaum, A.I.; Hinson, J.A.; Pessayre, D. and Lemasters, J.J. (2002). Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 65(2): 166-176.
- Kim, K.H.; Bae, J.H.; Cha, S.W.; Han, S.S.; Park K.H. and Jeong T.C. (2000). Role of metabolic activation by cytochrome P450 in thioacetamide-induced suppression of antibody response in male BALB/c mice. *Toxicology Letters*, 114(1-3): 225-235.
- Kohen, R. and Nyska, A. (2002). Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6): 620-650.
- Lin, H.M.; Tseng, H.C.; Wang, C.J.; Lin, J.J.; Lo, C.W. and Chou, F.P. (2008). Hepatoprotective effects of *Solanum nigrum* Linn extract against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative damage in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 171(3): 283-293.
- Liu, J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 49(2): 57-68.
- Luk, J.M.; Wang, X.; Liu, P.; Wong, K.F.; Chan, K.L.; Tong Y. et al. (2007). Traditional Chinese herbal medicines for treatment of liver fibrosis and cancer: from laboratory discovery to clinical evaluation. *Liver International*, 27(7): 879-890.
- Naik, S.R. and Panda V.S. (2007). Antioxidant and hepatoprotective effects of Ginkgo biloba phytosomes in carbon tetrachloride-induced liver injury in rodents. *Liver International*, 27(3): 393-399.
- Nijveldt, R.J.; Van Nood, E.D.; Van Hoorn, E.; Boelens, P.G.; Van Norren, K. and Van Leeuwen, P.A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4): 418-425.
- Paduch, R.; Wiater, A.; Locatelli, M. and Tomczyk, M. (2015). Aqueous extracts of selected *Potentilla* species modulate biological activity of human normal colon cells. *Current Drug Targets*, 16(13): 1495-1502.
- Panahi Kokhdan, E.; Ahmadi, K.; Sadeghi, H.; Sadeghi, H.; Dadgary, F.; Danaei N. and Aghamaali M.R. (2017). Hepatoprotective effect of *Stachys pilifera* ethanol extract in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Pharmaceutical Biology*, 55(1): 1389-1393.
- Sadeghi, H.S.; Nikbakht, M.R.; Izadpanah, G. and Sabzali, S. (2008). Hepatoprotective effect of *Cichorium intybus* on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats. *African Journal of Biochemistry Research*, 2(6): 141-144.
- Soni, B.; Visavadiya, N.P. and Madamwar, D. (2008). Ameliorative action of cyanobacterial phycoerythrin on CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in rats. *Toxicology*, 248(1): 59-65.
- Stickel, F. and Schuppan, D. (2007). Herbal medicine in the treatment of liver diseases. *Digestive and Liver Disease*, 39(4): 293-304.
- Szymonik-Lesiuk, S.; Czechowska, G.; Stryjecka-Zimmer, M.; Słomka, M.; MAldro, A.; Celiński, K. and Wielosz, M. (2003). Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 10(4): 309-315.
- Tomczyk, M. and Latté, K.P. (2009). *Potentilla*—A review of its phytochemical and pharmacological profile. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2): 184-204.

- Tomczyk, M.; Leszczyńska, K. and Jakoniuk, P. (2008). Antimicrobial activity of *Potentilla* species. *Fitoterapia* 79(7-8): 592-594.
- Tomczyk, M.; Wiater, A. and Pleszczyńska, M. (2011). In vitro anticariogenic effects of aerial parts of *Potentilla recta* and its phytochemical profile. *Phytotherapy Research*, 25(3): 343-350.
- Tomovic, M.T.; Cupara, S.M.; Popovic-Milenkovic, M.T.; Ljubic, B.T.; Kostic M.J. and Jankovic, S.M. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Potentilla reptans* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 72: 137-145.
- Weber, L.W.; Boll, M. and Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*, 33(2): 105-136.
- Yang, Y.S.; Ahn, T.H.; Lee, J.C.; Moon, C.J.; Kim, S.H.; Jun, W. et al. (2008). Protective effects of Pycnogenol® on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1): 380-387.
- Zargari, A. (1995). Medicinal plants, Tehrani University Publications. ISBN, Pp: 602-605.
- Zhang, L.; Yang, J.; Chen, X.-q.; Zan, K.; Wen, X.-d.; Chen, H. et al. (2010). Antidiabetic and antioxidant effects of extracts from *Potentilla discolor* Bunge on diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(2): 518-524.

## Hepatoprotective effect of Hydroalcoholic extract of *Potentilla reptans* on oxidative stress biomarkers in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity model in Rat

Kameli, H.<sup>1</sup>; Abdolmaleki, Z.<sup>2</sup> and Yasini, S.P.<sup>3</sup>

Received: 04.05.2018

Accepted: 28.11.2018

### Abstract

Production of reactive oxygen species (ROS) and induction of oxidative stress are the main mechanisms of xenobiotics-induced liver injury. In the present study, the effect of hydroalcoholic extract *Potentilla reptans* on oxidative stress indices in carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) induced liver toxicity in male rats was investigated. Thirty five male Wistar-albino rats (200-250 g) were divided into five experimental groups; Group I was treated with distilled water via gavage daily, followed by Normal saline 0.9%, 1ml/kg B.W, intraperitoneal (i.p) on day 16. Group II received distilled water via gavage daily, followed by olive oil, i.p on day 16. Group III treated with distilled water via gavage daily, followed by a single dose of CCl<sub>4</sub> with olive oil 50%, i.p on day 16. Group IV and V received extract at doses of 100 and 250 mg/kg via gavage daily, followed by a single dose of CCl<sub>4</sub> with olive oil 50%, i.p on day 16. Then serum levels of biochemical liver parameters such as, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total protein (TP) and total bilirubin (TB) and serum level of oxidative enzymes, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) and catalase (CAT) were performed. The results of our research showed that CCl<sub>4</sub> in the hepatotoxic group caused a significant increase in the serum levels of AST, ALT, ALP and TB as well as decreased TP, SOD, GPX and CAT serum levels. Treatment with the extract at dose 250 mg/kg/d significantly normalized the CCl<sub>4</sub>-elevated serum levels of ALT, AST and ALP. The extract (100 and 250mg/kg) also increased levels of SOD and GPX. Results of the present study indicated that the extract had antioxidant properties and reduced the toxic effects of carbon tetrachloride in the liver.

**Key word:** Hydro-alcoholic extract of *Potentilla reptans*, Carbon-tetrachloride, Biomarker, Hepatotoxicity, Oxidative Stress

---

1- DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

2- Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

3- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

**Corresponding Author:** Abdolmaleki, Z., E-mail: zohreh.abdolmaleki@kiaou.ac.ir