مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵

محتوای فنل و فلاونوئید کل در عصاره گونه *Meristotropis xanthioides Vassilcz.* و اثر حفاظتی آن بر مسمومیت کبدی القا شده با اتانول

سیامک یاری Ph.D.*، رویا کرمیان Ph.D.، مصطفی اسدبگی Ph.D.

- دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، همدان، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: yarisiamak@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۱۱

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی نفش حفاظتی عصاره گونه *M. xanthioides* در برابر مسمومیت کبدی القا شده با اتانول می‌باشد.

مواد و روش‌ها: محتوای فنل و فلاونوئید کل به‌ترتیب به‌روش‌های فولن-سیوکالتو و کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری شدند. در جهت سنجش اثر حفاظتی عصاره گونه مورد نظر، رَت‌های نر نژاد ویستار به سه گروه ۶ تایی تقسیم شدند: گروه ۱(گروه کنترل)، گروه ۲ با اتانول تیمار شدند و گروه ۳ به‌طور همزمان با اتانول و عصاره گیاه *M. xanthioides*، تیمار شدند. رَت‌ها همه تیمارها را از طریق دهان دریافت کردند. در این تحقیق سیلی‌مارین به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در پایان پارامترهای بیوشیمیایی، هیستولوژیکی و مورفولوژیکی در گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان دادند که گونه مورد مطالعه دارای محتوای بالای فنل و فلاونوئید می‌باشد. بررسی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مشخص نمود که نسبت وزن کبد به وزن بدن، مقادیر مالون دی آلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن بافتی و همچنین آنزیم‌های کبدی موجود در سرم خون رَت‌های تیمار شده با اتانول به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های دیگر، افزایش می‌یابد. همچنین نتایج حاصل از مطالعات هیستولوژیکی مشخص کرد که بافت کبدی رَت‌های تیمار شده با اتانول، در مقایسه با رَت‌های گروه کنترل، دچار آسیب‌های شدیدی شدند. فعالیت‌های بیوشیمیایی و آسیب‌های بافتی بوسیله تیمار با عصاره و سیلی‌مارین کاهش یافت.

نتیجه گیری: این مطالعه اثبات کرد که عصاره *M. xanthioides* می‌تواند نقش حفاظتی بر علیه سمیت کبدی القا شده با الکل داشته باشد و به‌عنوان یک منبع طبیعی برای مکمل‌ها غذایی و دارویی به‌شمار آید.

واژگان کلیدی: Meristotropis xanthioides، فنل، اتانول، سمیت کبدی، آنتی اکسیدانت

مقدمه

گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی حاکی از آن است که ۶ درصد از کل مرگ و میرها وابسته به مصرف الکل می‌باشد (۱). مصرف الکل تغییرات مخربی را در فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی تمامی ارگانیسم ایجاد می‌کند (۲). اتانول موجود در مشروبات الکلی به‌طور عمده از طریق روده جذب می‌شود و قبل از ورود به سیستم گردش خونی، نخست وارد کبد می‌شود. کبد مهم‌ترین اندام جهت متابولیسم، سمیت‌زدایی و ذخیره‌ی و ترشح مواد گزنوبیوتیک و متابولیت‌های آن‌ها می‌باشد. چون بسیاری از این مواد و متابولیت‌های حاصل از فرآیندهای متابولیکی آسیب‌زا هستند در نتیجه کبد مستعد آسیب‌های مختلف می‌باشد (۳). اتانول نیز همچون دیگر مواد گزنوبیوتیک در کبد متابولیزه می‌شود. مکانیسمی که اتانول و متابولیت‌های حاصل از آن موجب آسیب کبدی می‌شوند به‌طور کامل روشن نیست. با این‌حال، مطالعات چندی نشان داده‌اند که اتانول با القای تولید رادیکال‌های آزاد می‌تواند سبب آسیب‌های بافتی و سلولی شود. رادیکال‌های آزاد مانند گونه‌های فعال اکسیژن به‌طور طبیعی در سلول‌های زنده تولید می‌شوند و نقش مهمی در فرآیند علامت رسانی سلول‌ها دارند. همچنین در طبیعت عواملی وجود دارند که ممکن است رادیکال آزاد داشته باشند یا سلول‌ها را برای تولید رادیکال آزاد تحریک کنند (۴). مقادیر بالای این ترکیبات برای سلول‌ها خطرناک می‌باشند و ممکن است به کل اجزای آن از جمله: پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها، فسفولیپیدها، و غشاهای سلولی آسیب برسانند و نقش مهمی در پیشرفت بیماری‌هایی مانند سرطان، مسمومیت کبدی و... دارند (۵). در مشروبات الکلی در واقع، اکسیداسیون اتانول پس از جذب از طریق لوله گوارشی، در کبد، توسط چندین سیستم آنزیمی که مهم‌ترین آن‌ها، الکل دهیدروژناز می‌باشد، صورت می‌گیرد و در نهایت موجب ایجاد رادیکال‌های آزاد مانند پراکسید هیدروژن، در بافت کبدی و آسیب به آن می‌شود (۶ و ۷). آنتی اکسیدانت‌ها ترکیباتی مهمی هستند که می‌توانند برای پیش‌گیری و درمان این آسیب‌ها مفید باشند. تحقیقات در زمینه پیشرفت بر روی شناسایی و کاربرد این ترکیبات در جلوگیری و درمان بیماری‌های مختلف از جمله انواع سرطان متمرکز شده است (۸). آنتی اکسیدانت‌ها ممکن است به‌عنوان یک جاروب کننده، احیا کننده و یا فعال کننده آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی سلول برای جلوگیری از آسیب رادیکال‌های آزاد در سیستم‌های زیستی ایفای نقش کنند (۹-۱۱). گیاهان منبع طبیعی برای این ترکیبات هستند (۱۲). آنتی اکسیدانت‌های مهمی که در گیاهان وجود دارند عبارتند از: توکوفرون‌ها (ویتامین E)، فولیک اسید (ویتامین B_9)، آسکوربیک اسید (ویتامین C)، کاروتنوئیدها، فنیل آکریلیک اسیدها و فلاونوئیدها مانند آنتوسیانین‌ها که به‌عنوان بزرگ‌ترین گروه فنل‌های طبیعی می‌باشند. جنس شیرین بیان شامل ۲۰ گونه متعلق به خانواده بقولات و بومی بیشتر نقاط جهان، مخصوصا آسیا می‌باشد (۱۳). گونه . *Merstotropis xanthioides* Vassilcz متعلق به جنس شیرین بیان است. این گونه شامل ترکیبات مختلفی مانند اسانس‌ها، ترکیبات فنلی و ساپونین‌های گلیکوزید می‌باشد (۱۴، ۱۵). هدف از این مطالعه تعیین محتوای فنلی در عصاره گونه *M. xanthioides* و نقش حفاظتی آن در برابر سمیت کبدی القا شده با الکل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: همه مواد شیمیایی و حلال‌های استفاده شده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان و سیگما (آمریکا) با درصد خلوص بالا تهیه شده است.

مواد گیاهی: گونه‌های مطالعه شده از زیستگاه‌های طبیعی خود (خراسان) در سال ۱۳۹۴ جمع آوری شد و در هرباریوم دانشگاه بوعلی سینا (BASU) نگه‌داری شدتد.

استخراج عصاره گیاهی: برای تهیه عصاره، بخش هوایی گونه مورد مطالعه توسط آسیاب برقی، سه بار و در هر بار به‌مدت ۱۰ ثانیه آسیاب شد. استخراج عصاره از ۲۵ گرم پودر خشک گیاه توسط ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول خالص و به‌وسیله دستگاه استخراج کننده سوکسله به‌مدت ۶ ساعت انجام شد. به‌منظور حذف ذرات ریز عصاره از کاغذ صافی وات من استفاده شد. سپس عصاره‌ها تا زمان استفاده داخل فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) ذخیره شدند.

محتوای فنل کل: ۰/۱۲۵ میلی‌لیتر عصاره گونه مورد مطالعه شده با ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. سپس مقدار ۰/۱۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو همراه با ۱/۲۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷ درصد به نمونه اضافه شد

و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری گردید. مخلوط حاصل را با آب مقطر به حجم ۳ میلی‌لیتر رسانده و به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد و در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار فنل کل از طریق منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه گردید و مقادیر آن بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک عصاره گزارش شد (۱۶).

محتوای فلاونوئید کل: ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲ درصد متانولی مخلوط گردید و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد و پس از این مدت جذب در طول موج ۳۶۸ نانومتر خوانده شد. مقدار فلاونوئید کل از طریق منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه گردید و مقادیر آن بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک عصاره گزارش شد (۱۷).

حیوانات آزمایشگاهی و گروه‌بندی حیوانات: در این مطالعه رَت نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد از نظر دوره روشنایی-تاریکی، دما و رطوبت نگه‌داری شدند و دسترسی نامحدود به آب و غذا داشتند. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی که مورد تایید کمیته اخلاق گروه زیست شناسی دانشگاه بوعلی سینا همدان بود، هنگام کار با رت‌ها رعایت شد. رت‌ها به سه گروه، که هر گروه شامل ۶ سر بود تقسیم شدند. گروه اول (گروه کنترل): روزانه ۱ میلی‌لیتر آب با گاواژ دریافت نمود. گروه دوم (گروه اتانول): روزانه ۱ میلی‌لیتر اتانول ۵۰ درصد به روش گاواژ دریافت نمودند. گروه سوم (گروه اتانول و عصاره): که به‌صورت روزانه ابتدا ۵۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره دریافت نمود و با فاصله زمانی ۴ ساعت، ۱ میلی‌لیتراتانول ۵۰ درصد نیز از طریق دهانی دریافت نمود. یک گروه از رَت‌ها نیز به همراه اتانول ۵۰ درصد، داروی استاندارد سیلی‌مارین را با دوز ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به‌صورت دهانی دریافت نمود. پس از طی شدن دوره مطالعه (۱۴ روز)، حیوانات با تنفس دوز بالای اتر کشته شدند. کبدها بلافاصله خارج شدند و پس از شستشو، وزن شدند. بخشی از کبد هر حیوان جهت مطالعات بیوشیمیایی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد و بخش دیگر جهت مطالعات هیستوپاتولوژیکی در فرمالین ۱۰ درصد نگه‌داری شد.

بررسی پارامترهای مورفولوژیکی: پارامترهای مورفولوژیکی مانند وزن کبد و نسبت وزن کبد به ۲۰۰ گرم وزن بدن نیز به‌عنوان یکی از شاخص‌های مورد نظر برای بررسی اثر حفاظتی عصاره گونه مورد مطالعه بر سمیت کبد ارزیابی شد.

آنالیزها بیوشیمیای

آنزیم‌های کبدی: پس از بی‌هوش نمودن حیوانات با تزریق کتامین/زایلزین، نمونه‌های خونی از حیوانات متعلق به تمامی گروه‌ها جمع‌آوری شد، سپس سرم خون جدا شد برای آنالیزهای بیوشیمیایی بلافاصله به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پارامترهای کبدی سرم، شامل آلانین آمینو ترانسفراز (Alanine aminotransferase = ALT)، آسپارتات آمینو ترانسفراز (Spartat amino transferase = AST) و آلکالین فسفاتاز (Alkaline phosphatase = ALP) با استفاده از کیت‌های تشخیصی مورد ارزیابی قرار گرفت و مقادیر آن‌ها بر حسب واحد بین‌المللی آنزیمی بر لیتر (U/L) گزارش شد.

سنجش مالون‌دی‌آلدئید (MDA): نمونه‌ها در هاون چینی و حاوی ازت مایع ۵ دقیقه سائیده شدند. ۰/۱ گرم بافت کبد سائیده شده درون میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری ریخته و ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد (w/v) به آن اضافه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول روشناور به لوله آزمایش منتقل شد و ۴ میلی‌لیتر TCA ۲۰ درصد محتوای ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید به آن اضافه شد. نمونه‌ها در بن ماری و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس بلافاصله نمونه‌ها را در حمام آب یخ گذاشته و پس از سرد شدن با دور ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. جذب نمونه‌ها در ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. مقادیر MDA بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن بافت گزارش شد (۱۸).

سنجش پراکسید هیدروژن: برای سنجش مقادیر پراکسید هیدروژن، ۰/۱ گرم از بافت کبد در ۱ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۰/۱ مولار (TCA) سائیده شد و بعد عصاره‌های حاصل با دور ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول سانتریفوژ شده به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۰/۵ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار اضافه شد

و جذب مخلوط واکنش در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. مقادیر پراکسید هیدروژن در هر نمونه با استفاده از ضریب خاموشی $M^{-1}cm^{-1}$ ۰/۲۸ محاسبه گردید و بر حسب میکرو مول بر گرم وزن بافت گزارش شد (۱۹).

H_2O_2 غلظت = ضریب خاموشی/ تغییرات جذب نمونه

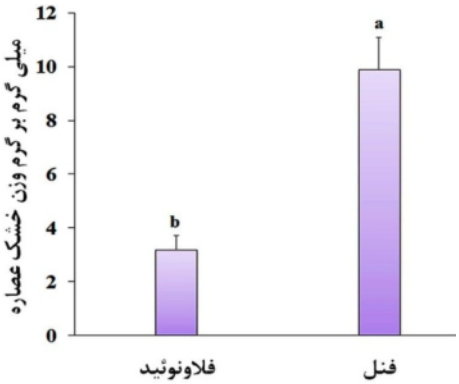
بررسی‌های هیستولوژیکی: بافت کبد جدا شده با استفاده از سرم فیزیولوژیکی شستشو شد و در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد. سپس با درجات صعودی اتانول، آبگیری و توسط پارافین قالب‌گیری شد. نمونه‌های قالب‌گیری شده با پارافین توسط دستگاه میکروتوم با ضخامت ۵ میکروگرم برش‌گیری و با رنگ هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شد. برش‌های رنگ آمیزی شده توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت و عکس‌برداری شد. پارامترهای مانند نکروز هپاتوسیت‌ها، اتساع ورید مرکزی، ارتشاح سلول‌های التهابی، به‌هم ریختگی آرایش بافتی و انباشت چربی در هپاتوسیت‌ها (میکرو وزیکولار استاتوزیس) در تصاویر مورد نظر از مقاطع بافتی مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز آماری: داده‌های حاصل از آزمایش با نرم افزار Excelتحلیل شد. سپس، مقایسه میانگین‌ها به‌روش دانکن در سطح $p< ۰/۰۵$ انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد.

نتایج

محتوای فنل و فلاونوئید کل

پلی‌فنل‌ها به‌ویژه فلاونوئیدها دارای فعالیت‌های زیستی فراوانی هستند. گونه مطالعه شده دارای محتوای فنل (۱/۶ ± ۹/۹ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک عصاره) و فلاونوئید (۰/۵ ± ۳/۲ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک عصاره) بالایی می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱: محتوای فنل و فلاونوئید عصاره گونه *M. xanthioides*

بررسی پارامترهای مورفولوژیکی

نتایج حاصل از مطالعات مورفومتریک در این تحقیق نشان داد که نسبت وزن کبد به وزن بدن در رت‌های تیمار شده با اتانول، به‌طور معنی‌داری نسبت به رت‌های گروه کنترل و تیمار شده با عصاره و سیلی‌مارین افزایش پیدا کرده است (جدول ۱).

جدول ۱: تغییرات وزن کبد در رت‌های کنترل و تیمار شده را نشان می‌دهد.

نمونه‌ها	وزن (گرم)	
	کبد	نسبت وزن کبد به بدن (٪)
اتانول	۱۱/۶۴ ± ۰/۵	۵/۸۲ ± ۰/۳
اتانول + عصاره	۸/۵۰ ± ۱/۰	۴/۲۵ ± ۰/۵
کنترل	۹/۹۶ ± ۱/۵	۴/۹۸ ± ۰/۷
سیلیمارین + اتانول	۷/۹۰ ± ۱/۱	۳/۹۵ ± ۰/۵

مقادیر، میانگین ۳ تکرار SD ± است.

این افزایش وزن می‌تواند ناشی از التهاب، ارتشاح و تجمع چربی‌ها در هپاتوسیت‌های بافت کبد رَت‌های تیمار شده با اتانول باشد.

آنالیزهای بیوشیمیایی

آنالیزهای بیوشیمیایی نشان دادند که مقادیر MDA و پراکسید هیدروژن بافت کبد و همچنین مقادیر سه آنزیم کبدی ALT، AST و ALP در سرم خون رت‌های تیمار شده با اتانول به‌طور معنی‌داری ($p \leq ۰/۰۵$) نسبت به گروه کنترل، گروه تیمار شده با عصاره و اتانول و همچنین گروه تیمار شده با داروی استاندارد کبدی (سیلی‌مارین)، افزایش نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۲: تاثیر عصاره گیاه *M. xanthioides* بر پارامترهای بیوشیمیایی بافت کبد رَت‌ها در آسیب ناشی از اتانول.

نمونه‌ها	بیوشیمیایی پارامترهای				
	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	MDA (mg/g wt)	H_2O_2 (µM/g wt)
اتانول	۷۵۳ ± ۱۱/۷^{a}	۶۰ ± ۲/۲^{a}	۱۴۶ ± ۰/۷^{a}	۰/۱۰۲ ± ۰/۰۰۵^{a}	۰/۵۲ ± ۰/۰۹^{a}
اتانول + عصاره	۶۸۵ ± ۱۲/۲^{b}	۵۱ ± ۲/۵^{b}	۱۳۳ ± ۱/۰^{b}	۰/۱۰۰ ± ۰/۰۰۲^{a}	۰/۲۶ ± ۰/۰۸^{b}
کنترل	۴۹۰ ± ۶/۷^{d}	۴۱ ± ۱/۲^{c}	۱۰۰ ± ۰/۹^{c}	۰/۰۸۱ ± ۰/۰۰۷^{b}	۰/۲۳ ± ۰/۰۴^{b}
سیلیمارین + اتانول	۵۹۱ ± ۹/۴^{c}	۴۶ ± ۰/۹^{c}	۱۳۴ ± ۱/۴^{b}	۰/۰۹۴ ± ۰/۰۰۱^{ab}	۰/۳۱ ± ۰/۰۳^{b}

مقادیر، میانگین ۳ تکرار SD ± است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ است.

افزایش میزان MDA (۰/۰۰۵ ± ۰/۱۰۲ میلی‌گرم بر گرم بافت) و پراکسید هیدروژن (۰/۰۹ ± ۰/۵۲ میکروگرم بر گرم بافت) می‌تواند نشان دهنده القا و افزایش استرس اکسیداتیو در بافت کبد رت‌های تیمار شده با اتانول باشد که در نهایت منجر به تخریب هپاتوسیت‌ها می‌شود. به‌دنبال تخریب هپاتوسیت‌ها مقادیر سرمی سه آنزیم کبدی ALT، AST و ALP نیز افزایش نشان می‌دهد (جدول ۲). تیمار رت‌ها با عصاره گونه مورد مطالعه در این تحقیق باعث کاهش معنی‌دار مقادیر فاکتورهای بیوشیمیایی مذکور شده که نشان دهنده نقش حفاظتی عصاره در کاهش استرس اکسیداتیو و تخریب هپاتوسیت‌ها می‌باشد (جدول ۲).

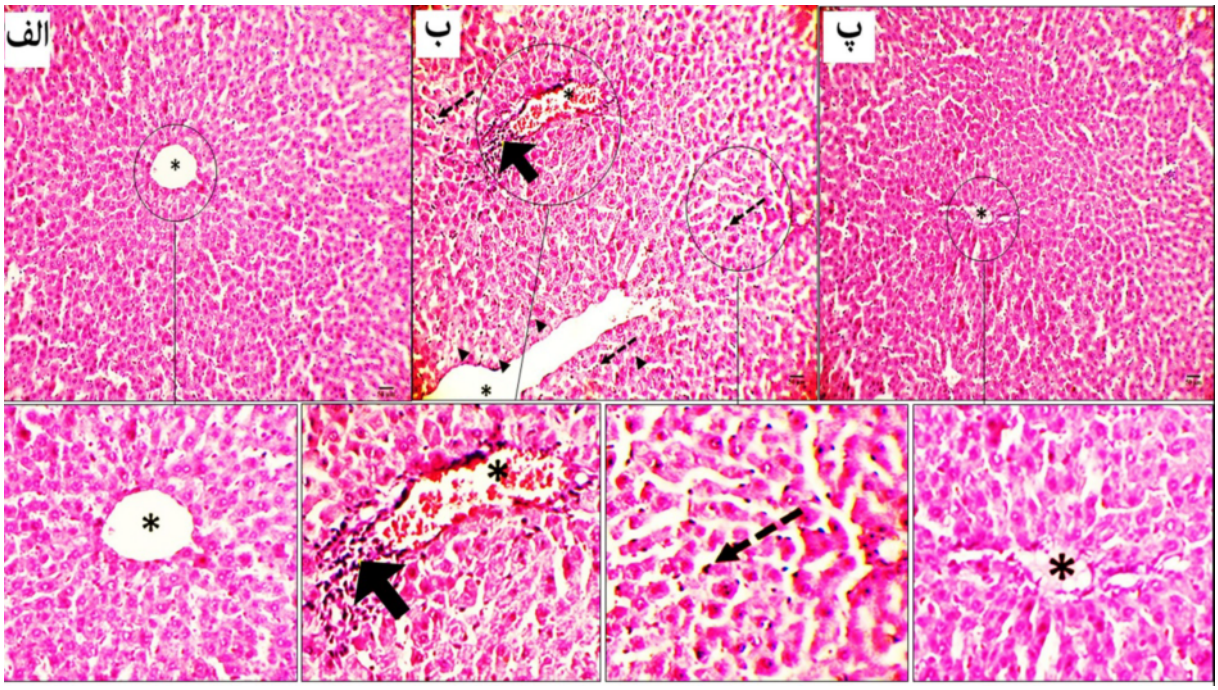
بررسی‌های هیستولوژیکی

بررسی نتایج حاصل از مطالعات هیستولوژیکی بافت کبد در گروه رت‌های تیمار شده با اتانول، در مقایسه با ساختار طبیعی بافت کبد رت‌های گروه کنترل (شکل۲، الف و ب)، به‌هم ریختگی شدید در چیدمان سلول‌ها در بافت کبد، نکروز بافتی، اتساع و تخریب ونول مرکزی (علامت ستاره سیاه رنگ) و ارتشاح سلول‌های التهابی (پیکان مشکی ضخیم) و همچنین انباشت چربی در هپاتوسیت‌ها (با نوک پیکان) را نشان می‌دهد (شکل ۲، ب). بافت کبدی تیمار شده با عصاره به‌همراه اتانول، کاهش سلول‌های پیکنوتیک (پیکان باریک)، ساختار ونول نرمال (ستاره سیاه رنگ) و همچنین چیدمان طبیعی سلول‌های کبدی را نشان داد (شکل ۲، ب و پ)، که از این لحاظ مشابه با ساختار بافتی گروه کنترل (بدون هیچگونه تیمار) و گروه تیمار با سیلی‌مارین می‌باشد (شکل ۳). در مطالعات هیستولوژیکی تجمع قطرات چربی در هپاتوسیت‌ها یا همان ساختارهای میکرو وزیکولار یکی از علایم مهم آسیب به کبد می‌باشد که در برش‌ها به شکل واکوئل‌های ریزی دیده می‌شوند. در این تحقیق، این‌حالت پاتولوژیکی فقط در گروه رت‌های تیمار شده با اتانول دیده شد و عصاره از انباشت چربی در هپاتوسیت‌ها ممانعت کرد، به‌صورتی‌که ساختار بافت کبد در گروه رت‌های تیمار شده با عصاره مشابه با کنترل بود (شکل ۲، الف و پ).

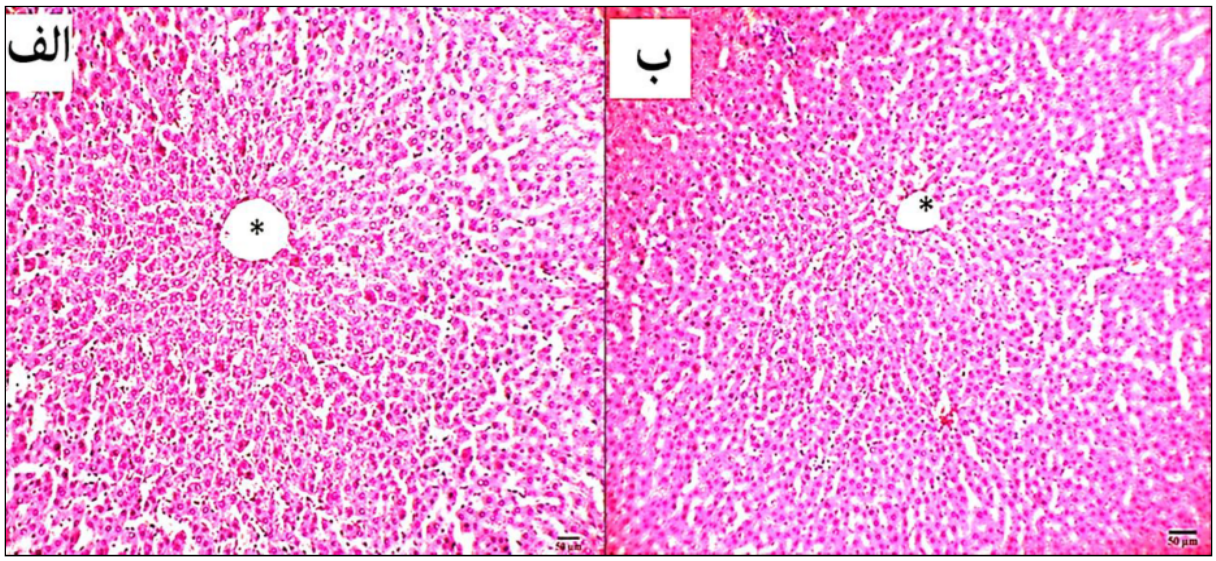
بحث

پلی‌فنل‌ها از جمله فلاونوئیدها در ساختار شیمیایی خود دارای گروه‌های هیدروکسیل می‌باشند که دهنده قوی هیدروژن به‌حساب می‌آیند و به‌عنوان عوامل آنتی اکسیدانتی شناخته می‌شوند. این ترکیبات با توانایی احیا کنندگی بالا می‌تواند با گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن واکنش دهند و از خسارات استرس اکسیداتیو در بدن جلوگیری کنند (۲۰-۲۲). ساختار این ترکیبات دارای پتانسیل بالایی برای واکنش دادن با پروتئین‌های مختلف از جمله آنزیم‌ها می‌باشند. به این دلیل آن‌ها می‌توانند باعث ممانعت از فعالیت آنزیم‌هایی مانند ایزوفرم‌های مختلف سیتوکرم P_{450}، سیکلواکسیژناز، الکل دهیدروژناز، لیپو اکسیژناز و زانتین اکسیداز شوند که در تولید رادیکال‌های آزاد دخالت دارند (۲۳). همچنین اثرات هم‌سو و غیر هم‌سو پلی‌فنل‌ها با دیگر عوامل آنتی اکسیدانتی و سطوح گلوتاتیون (به‌عنوان عامل آنتی اکسیدانتی در جانوران، گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها هستند) درون سلولی نیز بحث شده است (۲۴، ۲۵). نتایج این تحقیق نشان داد که گونه مورد مطالعه دارای محتوای فنل و فلاونوئید بالایی می‌باشد (شکل ۱). تاکنون

مطالعه‌ای پیرامون محتویات فیتوشیمیایی عصاره گونه *M. xanthioides* صورت نگرفته است. اکسیدانت‌ها مانند پراکسید هیدروژن به طور طبیعی در سلول‌های زنده تولید می‌شوند و نقش مهمی در فرآیندهای مختلف سلول از جمله علامت رسانی دارند. همچنین عوامل برون سلولی ممکن است رادیکال آزاد داشته باشند یا سلول‌ها را برای تولید رادیکال آزاد تحریک کنند (۴). اتانول بعد از مصرف به‌عنوان عامل بیرونی و یک گزنوبیوتیک در کبد به‌وسیله آنزیم الکل دهیدروژناز متابولیزه می‌شود و منجر به تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود که مقادیر بالای این ترکیبات می‌تواند سبب آسیب‌های جدی بافتی و سلولی شود (۶ و ۷). یکی از مشخص‌ترین علامت‌های آسیب کبدی، افزایش آنزیم‌های سلولی در سرم خون می‌باشد. افزایش سطح آنزیم‌های کبدی نظیر ALT، AST و ALP در سرم نشان دهنده تخریب ناشی از مصرف اتانول می‌باشد که در نتیجه نکروز هپاتوسیت‌ها (سلول‌های پیکنوتیک) و نشت آنزیم-های درون سلولی است. در واقع آسیب غشا سلول باعث رها شدن این آنزیم‌ها در خون می‌شود (۲۶-۲۹). در این تحقیق تیمار دهانی رت‌ها با عصاره گونه مورد مطالعه و داروی سیلی‌مارین باعث کاهش سطح آنزیم‌های کبدی سرم شدند که مشابه با نمونه‌های کنترل می‌باشد (جدول ۲). این امر ممکن است به‌واسطه تاثیر و بر هم کنش ترکیبات آنتی‌کسیدانتی عصاره گونه مورد مطالعه بر فعالیت و مقادیر آنزیم الکل دهیدروژناز کبدی و کاهش رادیکال‌های آزاد مانند پراکسید هیدروژن باشد که در نهایت باعث افزایش پایداری غشا هپاتوسیت‌ها و لیزوزوم‌های حاوی آنزیم‌ها می‌شود (جدول ۱)، (۲۳-۳۰، ۳۱ و ۳۲).



شکل ۲: مطالعات هیستولوژیکی بافت کبد در گروه رت‌های کنترل (بدون تیمار)، اتانول و عصاره + اتانول را نشان می‌دهد. **الف:** ساختار بافت کبد رَت‌های گروه کنترل، **ب:** به‌هم ریختگی شدید در چیدمان سلول‌ها بافت کبد، نکروز بافتی، اتساع ونول مرکزی (با علامت ستاره سیاه رنگ)، ارتشاح سلول‌های التهابی (با پیکان مشکی ضخیم)، همچنین انباشت چربی در هپاتوسیت‌ها که به‌شکل واکوئل‌های ریز (با نوک پیکان) و سلول‌های پیکنوتیک (پیکان باریک)، را در گروه تیمار شده با اتانول نشان می‌دهد. **پ:** بافت کبدی در گروه تیمار شده با عصاره و اتانول را نشان می‌دهد.



شکل ۳: مطالعات هیستولوژیکی بافت کبد در گروه رت‌های کنترل (بدون تیمار) و سیلی‌مارین + اتانول را نشان می‌دهد. **الف:** ساختار بافت کبد رَت‌های گروه کنترل، **ب:** بافت کبدی در گروه تیمار شده با سیلی‌مارین و اتانول را نشان می‌دهد.

مطالعات تکمیلی بیوشیمیایی از جمله سنجش مقادیر مالون دی آلدئید (MDA) و مقادیر پراکسید هیدروژن بافتی با نتایج مطالعات آنزیمی به‌دست آمده در این تحقیق هم‌خوانی داشته و آن‌ها را مورد تائید قرار می‌دهد. در بررسی حاضر، میزان MDA و پراکسید هیدروژن در بافت کبدی تیمار شده با اتانول افزایش معنی‌داری ($p \leq ۰/۰۵$) را نسبت به گروه کنترل و تیمار شده با عصاره نشان می‌دهد. نتایج فوق را همچنین می‌توان به اثرات آنتی اکسیدانتی ترکیبات فنلی عصاره گونه مورد مطالعه نسبت داد که از طریق کاهش استرس اکسیداتیو از جمله جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشا سلولی باعث کاهش مقادیر MDA و رادیکال آزاد پراکسید هیدروژن می‌شود (۳۳ و ۳۴).تاکنون مطالعه‌ای برجسته پیرامون عصاره گونه *M. xanthioides* و نقش حفاظتی آن از جمله تاثیر بر فاکتورهای بیوشیمیایی و هیستولوژیکی در آسیب کبدی القا شده با اتانول صورت نگرفته است. هرچند نقش حفاظتی عصاره‌های گیاهی یا داروهای دیگر بر سمیت کبدی القا شده با عوامل مختلف مانند اتانول، عصاره گیاه، سلی‌مارین، آرسنیک و داروهای شیمیایی مورد مطالعه قرار گرفته است (۳۰-۳۵). مطالعات قبلی هسیتولوژیکی نشان دادند که اتانول باعث نکروز هپاتوسیت‌ها (سلول‌های پیکنوتیک)، اتساع ورید مرکزی و ارتشاح سلول‌های التهابی به درون پارانشیم کبد می‌شود که این ویژگی‌های پاتولوژیکی در بسیاری از مدل‌های مسمومیت کبدی عمومیت دارد (۳۶ و ۳۷). در مطالعه حاضر گروه رت‌های تیمار شده با اتانول تمام ویژگی‌های پاتولوژیکی مذکور را نشان دادند (شکل ۲، ب). هرچند افزودن عصاره گونه مورد مطالعه به رت‌ها تیمار شده با اتانول، علایم پاتولوژیکی را به‌شکل معنی‌داری کاهش داد (شکل ۲، پ). نتایج نشان داد که چیدمان بافت کبد که در گروه تیمار با اتانول بر هم ریختگی شدیدی را نشان داده بود، در گروه رت‌های تیمار شده با عصاره این آسیب بافتی دیده نشد و آرایش بافت کبد مشابه آرایش بافتی کبد گروه کنترل و تیمار شده با سیلی‌مارین بود (شکل ۲، پ و شکل ۳). استاتوزیس میکرو واسکولار که با انباشت چربی در هپاتوسیت‌ها آشکار می‌شود یک ویژگی بسیار مهم هیستو پاتولوژیکی است که در بسیاری از آسیب‌های بافت کبدی مشاهده می‌شود و در مدل مسمومیت کبدی القا شده با اتانول نیز گزارش شده است (۳۰، ۳۸، ۳۹). بررسی هیستولوژیک بافت‌های گروه‌های مختلف نشان داد که در گروه تیمار با اتانول، قطرات چربی در هپاتوسیت‌ها انباشته شدند که نشان دهنده شروع تغییرات پاتولوژیکی حاصل از انباشت چربی در بافت کبدی می‌باشد (شکل ۲، ب). در مطالعه حاضر، در گروه تیمار با عصاره هیچ اثری از ساختارهای مربوط به انباشت چربی در هپاتوسیت‌ها دیده نشد (شکل ۲، پ). مطالعات

هیستولوژیکی بافت کبد در این تحقیق نتایج حاصل از مطالعات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی به‌دست آمده را تائید می‌کنند. از طرفی مطالعات قبلی نشان دادند که مواد شیمیایی دارای اثر حفاظتی بر کبد، باعث کاهش نسبت وزن کبد به وزن بدن می‌شوند (۳۹). در بسیاری از مطالعات مربوط به مسمومیت‌های اندام‌های مختلف مشخص شده است که وزن اندام افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند که این امر احتمال می‌رود که به واسطه ارتشاح سلول‌های التهابی به درون بافت و در ادامه آن خیز بافتی و در نتیجه افزایش وزن بافت می‌شود (۳۶ و ۳۷). در مطالعه‌ی حاضر نیز وزن کبد در گروه تیمار با اتانول به‌شکل معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد. این افزایش وزن با افزودن عصاره گونه مطالعه شده تعدیل شد که این امر نیز نشان دهنده تاثیر ضد التهابی عصاره مطالعه شده بر بافت کبد می‌باشد. اثرات حفاظتی عصاره گونه مطالعه شده بر مسمومیت کبدی القا شده با اتانول در موافقت با نتایج دیگر محققان می‌باشد که اثرات حفاظتی عصاره گونه‌های گیاهی دیگر و مواد دارویی مختلف را در مدل‌های متنوع مسمومیت کبدی مورد ارزیابی قرار داده‌اند (۳۰-۳۹).

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره گونه *M. xanthioides* دارای محتوای فیتوشیمیایی بالایی می‌باشد و پتانسیل حمایتی بالایی در مقابل مسمومیت کبدی القا شده با اتانول دارد. عصاره این گونه گیاهی می‌تواند به‌عنوان منابع امید بخشی در جهت تولید داروهایی برای جلوگیری و درمان اغلب بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو به‌ویژه مسمومیت‌های کبدی مورد توجه قرار بگیرد.

منابع

1. World Health Organization, Global Status Report on Alcohol and Health, World Health Organization, Geneva, 2014.
2. Poschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. Alcohol. 2004; 39(3): 155-165.
3. Lieber CS. Biochemical and molecular basis of alcohol induced injury to liver and others tissues. N. Engl. J. Med. 1988; 319(25): 1639-1650.
4. Aruoma OI, Cuppette SL. Antioxidant methodology, in vivo and in vitro concept. Champaign, IL: AOCS Press. 1997; (1): 141-172.
5. Valko M, Leibfritz D, Moncol J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2007; 39(1): 44-84.
6. Lieber CS. Metabolism of alcohol. Clin. Liver Dis. 2005; 9(1): 1-35.
7. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit. Rev. Toxicol. 1993; 23(1): 21-48.
8. Zhang HY, Yang DP, Tang GY. Multipotent antioxidants: from screening to design. Drug Discovery Today. 2006; 11(15-16): 749-54.
9. Yu L, Perret J, Davy B, Wilson J, et al. Antioxidant properties of cereal products. J. Food Chem. Sci. 2002; 67(7): 2600-2603.
10. Prior RL, Wu XM, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J. Agricul. Food Chem. 2005; 53(10): 4290-302.
11. Shoeb M. Anticancer agents from medicinal plants. Bangladesh J. Pharmacol. 2006; 1(2): 35-41. Walton NJ, Brown DE. Chemicals from plants perspectives on plant secondary products. London, UK: Imperial College Press, 1999; 1-25.
12. Bown D. The royal horticultural society encyclopedia of herbs and their uses. Dorling Kindersley Ltd. London. 1995; 424.
13.
14. Hakimeh O, Neda H. Study the correlation between some climate parameters and the content of phenolic compounds in roots of Glycyrrhiza glabra. J. Med. Plant Res. 2011; 5(25): 6011-6016.
15.
16. Farag MA, Porzel A, Wessjohann LA. Unequivocal glycyrrhizin isomer determination and comparative in vitro bioactivities of root extracts in four Glycyrrhiza species. J. Advan. Res. 2015; 6(1): 99-104.
17. Wolfe K, Wu X and Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. J. Agri. Food Chem. 2003; 51(3): 609-614.
18. Luximon-Ramma A, Bahorun T, Soobrattee MA, Aruoma OI. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of Cassia fistula. J. Agri. Food Chem. 2002; 50(18): 5042-5047.
19. Baryla A, Laborde C, Montillet JL, Triantaphylides C, et al. Evaluation of lipid peroxidation as a toxicity bioassay for plants exposed to copper. Environ. Pollut. 2000; 109(1): 131-135.
20. Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain- Treated Bean Plants: Protective Role of Exogenous Polyamines. Plant Sci. 2000; 151(1): 59-66.
21. Shahidi F, Wanasundara PKJPD. Phenolic antioxidants. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1992; 32(1): 67-103.
22. Karamian R, Asadbegy M. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of three Onobrychis species from Iran. Pharm. Sci. 2016; 22(1): 112-119.
23. Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, et al. Hydroxyl radical and hypochlorous acid scavenging activity of small centaury (Centaurium erythraea) infusion. A comparative study with green tea (Camellia sinensis). Phytomedicin. 2003; 10(6-7): 517-22.
24. Parr AJ, Bolwell JP. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. J. Sci. Food Agric. 2002; 80(7): p. 985-1012.
25. Seabra RM, Andrade PB, Valentao P, Fernandes E, et al. Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms. In: Fingerman M, Nagabhushanam R, editors. Antioxidant compounds extracted from several plant materials. Enfield, NH: Science Publishers; 2006; 115-74.
26. Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets

high in fruit and vegetables. Am. J. Clin. Nutr. 1998; 68(5):1081-7.
27. Goldberg DM, Watts C: Serum enzyme changes as evidence of liver reaction to oral alcohol. Gastroenterology. 1965; 49(3): 256–261.
28. Kalegari M, Gemin CA, Araujo-Silva G, Brito NJ, et al. Chemical composition, antioxidant activity and hepatoprotective potential of Roureainduta Planch. (Connaraceae) against CCl 4-induced liver injury in female rats. Nutrition. 2014; 6: 713-718.
29. Bishayee A, Sarkar A, Chatterjee M. Hepatoprotective activity of carrot (Daucuscarota L.) against carbon tetrachloride intoxication in mouse liver. J. Ethnopharmacol. 1995; 47(2): 69-74.
30. Song Z, Deaciuc I, Song M, Lee DY, et al. Silymarin protects against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice. Alcoholism: Clin. Exp. Res. 2006; 30(3): 407-13.
31. Lin SC, Lin CH, Lin CC, Lin YH, et al. Hepatoprotective effects of Arctium lappa Linne on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride. J. Biomed. Sci. 2002; 9(5): 401-409.
32. Jung JC, Lee YH, Kim SH, Kim KJ, et al. Hepatoprotective effect of licorice, the root of Glycyrrhiza uralensis Fischer, in alcoholinduced fatty liver disease. BMC Comp. Alternative Med. 2016; 16(19): 1-10.
33. Hautekeete ML, Degott C, Benhamou JP. Microvesicularsteatosis of the liver. Acta Clinica Belgica. 1990; 45(5): 311-26.
34. Yousef MI, Saad AA, El-Shennawy LK. Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. Food Chem. Toxicol. 2009; 47(6): 1176-83.
35. Mathews V, Binu P, Paul MS, Abhilash M, Manju A, Nair RH, Hepatoprotective efficacy of curcumin against arsenic trioxide toxicity. Asian Pacific J. Tropical Biomed. 2012; 2: 706-711.
36. Tasduq SA, Peerzada K, Koul S, Bhat R, Johri RK. Biochemical manifestations of anti-tuberculosis drugs induced hepatotoxicity and the effect of silymarin. Hepatol. Res. 2005; 31: 132-35.
37. Rolfes DB, Ishak KG. Acute fatty liver of pregnancy: a clinicopathologic study of 35 cases. Hepatol. 1985; 5(6): 1149-58.
38. Avadhoot V, Rana V. Hepatoprotective effect of Vitexnegundo against carbon tetrachloride-induced liver damage. Arch. Pharm. Res. 1991; 14(1): 96-98.
39. Zhao J, Chen H, Li Y. Protective effect of bicyclol on acute alcohol-induced liver injury in mice, Europ. J. Pharm. 2008; 586(1-3): 322-331.
40. Song Z, Zhou Z, Chen T, Hill D, et al. S-adenosylmethionine (SAMe) protects against acute alcohol induced hepatotoxicity in mice. J. Ntrit. Biochem. 2003; 14(10): 591-597.
41. Thwala M, Musee N, Sikhwivhilu L, Wepener V. The oxidative toxicity of Ag and ZnO nanoparticles towards the aquatic plant Spirodela punctuta and the role of testing media parameters. Environ. Sci.: Processes Impacts. 2013; 15(10): 1830-43.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Autumn 2017; 7(3):

Total phenol and flavonoid contents of Meristotropis xanthioides Vassilcz. species extract and its protective effect on ethanol-induced hepatotoxicity

Yari S, Ph.D.*, Karamian R, Ph.D., Asadbegy M, Ph.D.

- Department of Biology, Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

* Email corresponding author: yarisiamak@yahoo.com

Received: 23 Aug. 2016 Accepted: 1 Nov. 2016

Abstract

Aim: The aim of this study was to assess the protective effect of *Meristotropis xanthioides* extract on ethanol-induced hepatotoxicity.

Material and methods: The total phenol and flavonoid contents of the species were measured by Folin Ciocalteu and $AlCl_3$, respectively. Male Wistar rats were divided into three groups: group 1 (control), group 2: received 1ml 50 % ethanol, group 3 : received 1ml ethanol (50 %) plus the extract (500 mg/kg), each group consisted of six rats. All treatments were performed by intragastric administration. Silymarin was used as positive control. Biochemical, histological and morphological analyses were used for evaluation of hepatotoxicity.

Results: The extract had high total phenolic and flavonoid contents. Alcohol consumption significantly increased liver/body weight ratio, amounts of tissue's malondialdehyde (MDA), H_2O_2 and also liver enzymes in blood in comparison to other groups. Histological examination showed that alcohol consumption injures liver tissue intensely. All these alcohol-induced changes were effectively inhibited by treatment with the extract.

Conclusion: This research confirmed that the species can represent the protective role on ethanol-induced hepatotoxicity and suggested its capacity to apply as a new healthcare food and drug supplement.

Keywords: *Meristotropis xanthioides*, phenol, hepatotoxicity, ethanol, antioxidant