*مقاله پژوهشی*

*مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)*
*جلد ۳، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۱، ۳۶۲-۳۵۱*

# بررسی اثرات محافظتی *Ephedra pachyclada* بر مدل حیوانی بیماری حاد کبدی القا شده با تتراکلرید کربن

**مهناز آذرنیا .Ph.D، مرضیه قاسمی .M.Sc***

– گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم ، دانشگاه خوارزمی (تربیت معلم)، تهران، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mqasemi24@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۵/۱۶

## چکیده

**هدف:** هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات محافظتی *Ephedra pachyclada* بر آسیب حاد کبدی ناشی از تتراکلریدکربن بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه ابتدا آزمایشی جهت دستیابی به مدل حیوانی استاندارد طراحی شد. در این آزمایش ۰۳ سر موش به ۳ گروه کنترل، شم و مدل تقسیم شدند. حیوانات گروه مدل ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم از تتراکلریدکربن۰۵ درصد (۱:۱ در روغن زیتون استریل) را به صورت درون صفاقی دریافت کردند. ۶۹ ساعت بعد نمونه‌های خون و کبد حیوانات جمع آوری و مورد بررسی‌های بیوشیمیایی و بافت‌شناسی قرار گرفت. پس از اطمینان از صحت القای مدل در آزمایش دوم۰۴ سر از موش‌ها به ۴ گروه تقسیم شدند، یک گروه به عنوان کنترل و ۳ گروه دیگر به عنوان گروه‌های آزمایشی در نظر گرفته شدند. القای آسیب حاد کبدی به روش قبل در گروه‌های آزمایشی صورت گرفت با این تفاوت که دو گروه از آن‌ها روزانه با عصاره (۰۴۱ و ۰۰۴۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تیمار شدند. نمونه‌های خون و کبد ۶۹ ساعت بعد از تزریق تتراکلریدکربن جمع آوری شد. فعالیت سرمی آنزیم‌های آلانین آمینوترانس فراز TLA() و آسپارتات - آمینوترانس فراز TSA() در سرم و میزان نکروز و التهاب در کبد مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** تیمار با عصاره *Ephedra pachyclada* منجر به کاهش معنی‌داری در فعالیت سرمی ALT و AST ، نکروز و التهاب بافتی و افزایش درصد بقا در حیوانات دریافت کننده تتراکلریدکربن شده است.

**نتیجه گیری:** نتایج تحقیق حاضر پیشنهاد می‌کند که *Ephedra pachyclada* با مهار استرس اکسیداتیو و سرکوب التهاب بافتی، کبد را در برابر آسیب حاد ناشی از تتراکلرید کربن محافظت می‌کند.

**واژگان کلیدی:** *Ephedra pachyclada*، آسیب حاد کبدی، تتراکلرید کربن

## مقدمه

کبد ارگان مرکزی در متابولیسم و سم زدایی است. عملکردهای متابولیکی و موقعیت استراتژیک کبد سبب شده این عضو هدف توکسین‌های گوناگون و مستعد بیماری های بسیاری باشد (۱). بیماری کبدی به هرگونه شرایطی اطلاق می شود که منجر به القای آسیب یا التهاب در بافت کبد شده و عملکرد کبد را متاثر نماید. این بیماری‌ها به دو دسته عمده‌ی حاد و مزمن تقسیم می‌شوند. بیماری‌های حاد کبدی، فراوانی قابل توجهی ندارند به طوری که طبق آمار در ایالات متحده آمریکا میزان ابتلا به این دسته از بیماری‌ها ۲۰۰۰ مورد در سال است (۲). آنچه پرداختن به این بیماری را حایز اهمیت می‌کند مرگ و میر ۸۰ تا ۹۴ درصد از افراد مبتلاست (۳). بیماری حاد کبدی در نتیجه نکروز حاد جمعیت کثیری از هپاتوسیت‌ها و یا به دنبال آسیب شدید عمل‌کرد هپاتوسلولار به طور کاملا ناگهانی ایجاد می‌گردد (۴و ۵). عفونت‌ها، توکسین‌ها، مواد شیمیایی و داروها، ایسکمی و هیپوکسی کبدی و اختلالات متابولیکی مهمترین عوامل ایجاد این نوع از بیماری‌های کبدی هستند (۶). در این بیماری عمل‌کرد سینتتیک کبد همچون گلوکوژنز و تولید فاکتورهای انعقادی، عملکرد دفعی کبد مثل ترشح صفراوی بیلی‌روبین و اسیدهای صفراوی و همچنین عملکردهای متابولیک‌اش مثل متابولیسم اوره دچار اختلال می‌شوند (۵). انسفالوپاتی کبدی (Hepatic encephalopathy) نیز یکی از مهم‌ترین نشانه‌ها در تشخیص این دسته از بیماری‌ها است (۷). همان طور که گفته شد بیماری حاد کبدی با مرگ و میر قابل توجهی همراه است، داروها و درمان‌های معمول تنها حدود ۱۰ درصد از بیماران مبتلا را از مرگ نجات می‌دهد (۵)، همین موضوع سبب شده است تا برخی از دانشمندان علوم داروشناسی پتانسیل فعالیت هپاتوپروتکتیو را در گیاهان و بر پایه طب سنتی جستجو کنند (۸ و ۹).

*Ephedra Pachyclada (EP)* گیاهی از خانواده *Ephedraceae* است. این گیاه به صورت درختچه‌ای با ساقه‌های سبز، بند بند، پر شاخه و معمولا قائم است. EP در اقلیم خشک و نیمه خشک، خصوصا در مناطق کویری و سنگلاخی جنوب و جنوب شرقی ایران می‌روید و به نام های محلی هوم و ارمک شناخته می‌شود. شهرت این خانواده از گیاهان به دلیل دارا بودن آلکالوئید های افدرینی فراوان است که مهم‌ترین آن‌ها افدرین و سودوافدرین هستند (۱۰). گیاهان این خانواده دارای خواص درمانی بسیاری بوده و هزاران سال است که در طب سنتی آسیای شرقی در درمان بیماری‌های تنفسی و آلرژی‌ها کاربرد دارند. اخیرا نیز در پزشکی و در مقاصدی همچون تخفیف درد، کاهش تب و کنترل وزن بدن مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۱و ۱۲). مطالعاتی که روی بسیاری از گیاهان خانواده افدراسه انجام شده موید خواص ضد التهابی (Anti-inflammatory) و آنتی‌اکسیدانتی آن‌ها است. در سال ۲۰۰۶ مطالعه عصاره *Ephedra sinica* روی مدل حیوانی رماتوئید مفصلی نشان داد این گیاه قادر است با سرکوب التهاب به طور قابل توجهی روند بیماری را مهار کند (۱۳). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۸، محققان حیوانات دارای آسیب حاد کبدیِ القا شده با دی گالاکتوز آمین را با Mao (ترکیبی از عصاره گیاهان این خانواده) تیمار نمودند و نتایج حاکی از کاهش قابل توجه علایم بیماری همچون نکروز بافتی، فاکتورهای سرمی و مرگ میر بود (۱۴). مطالعه‌ای که روی تعدادی از گونه های این خانواده در سال ۲۰۱۰ انجام شد نشان داد که *Ephedra Pachyclada* حاوی مقادیر قابل توجهی ترکیبات فنلی و واجد خاصیت آنتی اکسیدانتی است (۱۵). تحقیقات مولکولی که در کشف مکانیسم تاثیرات این گیاه صورت گرفته است، نشان داده که عصاره EP با کاهش واسطه‌گرهای التهابی مثل TNFα ( Tumor necrosis factor α) باعث افزایش فعال سازی سیگنالینگ STAT3 (Signal transducer and transcription factor 3) و به دنبال آن سرکوب پاسخ‌های التهابی و کاهش آپوپتوزیس می‌شود (۱۶). با توجه به اینکه در آسیب‌های حاد کبد، التهاب بافتی و استرس اکسیداتیو زمینه ساز نکروز گسترده بافتی و پیشروی بیماری است، بر آن شدیم تاثیر عصاره این گیاه را بر بیماری حاد کبدی مورد مطالعه قرار دهیم.

انجام چنین مطالعاتی مستلزم ساخت مدل های حیوانی است که مقلد شرایط پاتوفیزیولوژیکیِ اختلالات کبدی باشند. طبق نظریه Terblanche و Hickman در یک مدل حیوانی مناسب از بیماری حاد کبدی، آسیب ایجاد شده باید به طور بالقوه برگشت پذیر بوده، قابل تکرار باشد، مانند آنچه در شرایط کلینیکی اتفاق می افتد به مرگ منجر شود و بین القای مدل و وقوع مرگ فرصت کافی جهت تست دارویی مورد نظر وجود داشته باشد (۱۷). در این مطالعه سعی شده است با استفاده از هپاتوتوکسینی شناخته شده به نام تتراکلریدکربن ($CCl_4$) ابتدا مدل تایید شده‌ای از بیماری حاد کبدی ساخته شود و سپس با

تیمار حیوانات بیمار با عصاره EP چگونگی تاثیرات این گیاه بر روند بیماری حاد در کبد مورد بررسی قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

***حیوانات:*** در این مطالعه تجربی، موش‌های نر و بالغ نژادSW1 (۸ هفته) از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش‌ها در اتاق حیوانات با دمای کنترل شده ۲±۲۳ سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و آب و غذای کافی همواره در دسترس آن‌ها قرار داشت. آزمایش‌ها روی تمامی گروه‌ها مورد بررسی در شرایط کاملا یکسان و مطابق اصول اخلاقیِ کار با حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت.

***ساخت مدل حیوانی:*** جهت دستیابی به مدل حیوانی استاندارد، تعداد ۳۰ سر موش به ۳ گروه ۱۰ تایی کنترل، شم و مدل تقسیم شدند. برای القای آسیب حاد کبدی $CCl_4$ Merck- (Schuchardt, 2221) ۵۰ درصد (به نسبت ۱:۱ با روغن زیتون استریل شده) به میزان ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن در یک دوز منفرد به صورت درون صفاقی به حیوانات گروه مدل تزریق شد. حیوانات گروه شم تنها ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم روغن زیتون دریافت کردند و گروه کنترل هیچ تیماری را دریافت نکرد. میزان زنده‌مانی یا بقای حیوانات تا ۹۶ ساعت بعد از تزریق مورد بررسی قرار گرفت. ۹۶ ساعت بعد از تزریق حیوانات پس از وزن شدن با تزریق محلول کتامین (Ketamin 10%-Alfasan, Woerden-Holland) و زایلازین (Xylasine 2% Alfasan Woerden-Holland) بی‌هوش شدند. تحت شرایط بی هوشی خونگیری از قلب انجام شد و سپس کبد جهت آزمایش‌ها بافت شناسی خارج و در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. آنالیز مارکرهای سرمی و مطالعات بافت شناسی جهت بررسی صحت القای مدل انجام شد. چگونگی انجام این بررسی‌ها در ادامه ذکر شده است.

***تهیه عصاره EP:*** روش عصاره گیری انتخاب شده در این تحقیق بر اساس روش استفاده بومیانِ مناطق جنوبی و غربی ایران با اندکی تغییر می باشد؛ بدین ترتیب که سر شاخه‌های تازه گیاه از حاشیه شهرستان فسا در استان فارس جمع آوری و پس از کوبیدن در آب جوشانده شد. پس از جوشاندن اولیه عصاره خارج شده از صافی رد شده و سپس محلول صاف شده با جوشاندن بیشتر تغلیظ گردید (۱۳). در این آزمایش جهت دستیابی به غلظت‌های مورد نظر، عصاره نیمه جامد بدست آمده به میزان مورد نیاز وزن و سپس در آب مقطر حل شد؛ آن گاه محلول نهایی با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرونی استریل گردید.

***تیمار حیوانات دارای آسیب حاد کبدی با EP:*** پس از اطمینان از صحت القای مدل، جهت بررسی تاثیر عصاره EP بر روند بیماری حاد کبدی ۴۰ سر موش به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. یک گروه بعنوان کنترل و ۳ گروه دیگر بعنوان گروه‌های تجربی در نظر گرفته شدند. حیوانات هر ۳ گروه تجربی $CCl_4$ را به همان اندازه آزموده شده در مدل سازی (۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم $CCl_4$) به صورت درون صفاقی دریافت کردند. از میان گروه‌های تجربی که القای بیماری در آن‌ها صورت گرفت، یک گروه به عنوان شاهد و دو گروه دیگر به عنوان گروه های تیماری در نظر گرفته شدند. به گروه‌های تیماری ۲ ساعت بعد از دریافت $CCl_4$ به ترتیب ۱۴۰ و ۱۴۰۰ میلی‌گرم از EP به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان به صورت درون صفاقی تزریق شد. این تزریق هر ۲۴ ساعت یک بار تکرار شد. وزن حیوانات در ابتدا و انتهای آزمایش به طور دقیق اندازه گیری و میزان مرگ و میر حیوانات در طول آزمایش ثبت شد. ۹۶ ساعت بعد از تزریق $CCl_4$ حیوانات با مخلوط کتامین- زایلازین بیهوش شدند و خون‌گیری از قلب تحت بیهوشی انجام گرفت. سپس کبد خارج شده و پس از اندازه گیری دقیق وزن در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد.

***مطالعات بافت شناسی:*** نمونه‌های بافتی مطابق روش‌های معمول پردازش شده و پس از قالب‌گیری با پارافین، برش‌هایی با ضخامت ۴ تا ۶ میکرون از آن‌ها تهیه شد. اسلایدهای تهیه شده با دو روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) (جهت بررسی میزان نکروز) و رتیکولین (جهت بررسی داربست کبد) رنگ آمیزی و مورد بررسی قرار گرفتند. دراسلاید های H&E میزان نکروز بافتی با استفاده از استانداردهای تعیین شده در مطالعات قبلی مطابق با جدول شماره ۱ کمی شد (۱۸). تعداد سلول های آماسی همچون نوتروفیل و کوپفر و لنفوسیت در اسلایدهای H&E با میکروسکوپ نوری و با بزرگ‌نمایی ×۴۰۰ مورد شمارش قرار گرفتند. این شمارش‌ها در دو میدان دید تصادفی از ده مقطعِ هر کبد صورت گرفت. لازم به ذکر است که از هر گروه اسلایدهای مربوط به کبد شش موش مورد بررسی قرار گرفت.

**آزمون‌های بیوشیمیایی سرم:** خون گرفته شده از حیوانات به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری و سپس در g ۱۵۰۰با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد

(۱۹). از سرم بدست آمده، آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) که از مهم‌ترین مارکرهای سرمی آسیب کبدی هستند با استفاده از کیت‌های تولیدی شرکت پارس آزمون به وسیله اتوماتیک آنالیزر در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه گیری شدند.

***آنالیزهای آماری:*** نتایج به دست آمده به وسیله نرم‌افزار SPSS۱۶ و آزمون واریانس یک طرفه با تست Post Hoc Tukey با سطح معنی‌داری (P<۰/۰۱) آنالیز و به صورت میانگین ±SEM ارایه شدند.

*جدول ۱: نحوه امتیاز دهی به اسلایدهای بافتی برای تعیین میزان درجه نکروز (۱۸):*

| درجه نکروز | |
|---|---|
| ۰ | نکروزی دیده نمی‌شود. |
| ۱ | گروه‌های کوچکی از هپاتوسیت درگیر نکروز مرکزی شده‌اند. |
| ۲ | نکروز سانتریلوبولار کامل در کمتر از ۱/۴ لوبول‌های کبد دیده می‌شود. |
| ۳ | نکروز سانتریلوبولار کامل در بیشتر از ۱/۴ لوبول‌های کبد ودر کمتر از نصف لوب‌ها دیده می‌شود. |
| ۴ | نکروز کامل تقریبا بیشتر از نصف لوبول‌های کبد را در گیر کرده است. |

## نتایج

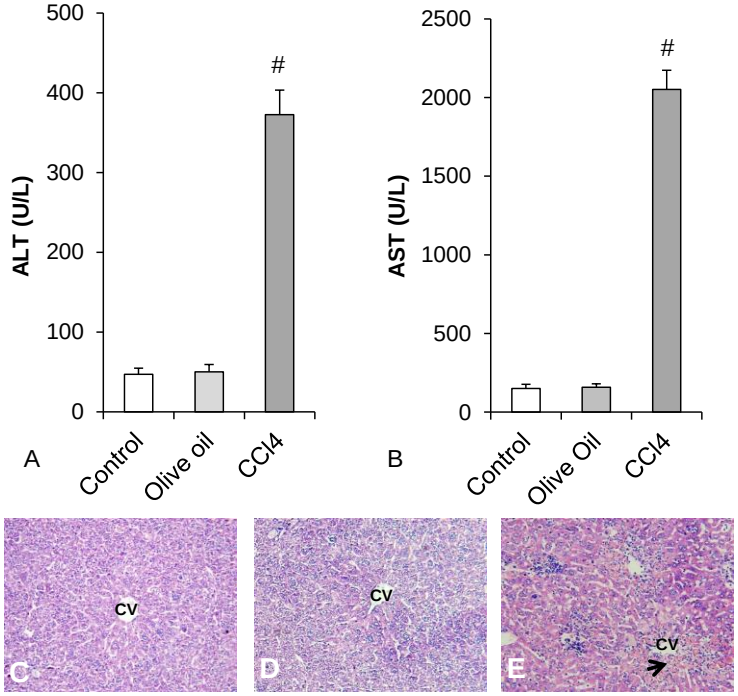
### بررسی صحت القای مدل حاد کبدی

مطالعات داروشناختی روی بیماری‌های کبدی نیازمند دستیابی به مدل های حیوانی استانداردی است که مقلد شرایط پاتوفیزیولوژیک بیماری باشند، از این رو در این مطالعه جهت اطمینان از صحت القای مدل، آزمایشی مطابق آنچه در روش کار ارایه شد طراحی گردید. نتایج نشان دادند که تیمار حیوانات با یک دوز ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم از $CCl_4$ باعث افزایش قابل توجه AST و ALT سرمی نسبت به گروه‌های شم و کنترل شده است (شکل ۱، A و B). این نتایج حاکی از القای آسیب به غشای هپاتوسیت‌ها و آزادسازی این آنزیم‌ها به خون است. مطالعات بافت شناسی کبد نیز حاکی از نکروز گسترده هپاتوسیت‌ها و ارتشاح سلول‌های التهابی حول رگ مرکزی و فضاهای بین لوبولی در حیوانات گروه مدل بود (شکل ۱، E). در حالی که بافت کبد در دو گروه کنترل و شم کاملا طبیعی به نظر می‌رسید و هیچ نکروزی دیده نشد (شکل ۱، C و D ). با توجه به مطالعات گذشته در القای مدل حاد کبدی، نتایج ما نشان دادند این میزان از $CCl_4$ می‌تواند مدل مناسبی از بیماری حاد کبدی را القا نمایند و به عبارتی یافته‌های ما موید صحت روند مدل سازی انجام شده بودند. از این رو با القای بیماری به روش آزموده شده در مدل سازی و تیمار حیوانات بیمار با EP تاثیر این گیاه بر بیماری حاد کبدی بررسی شد.

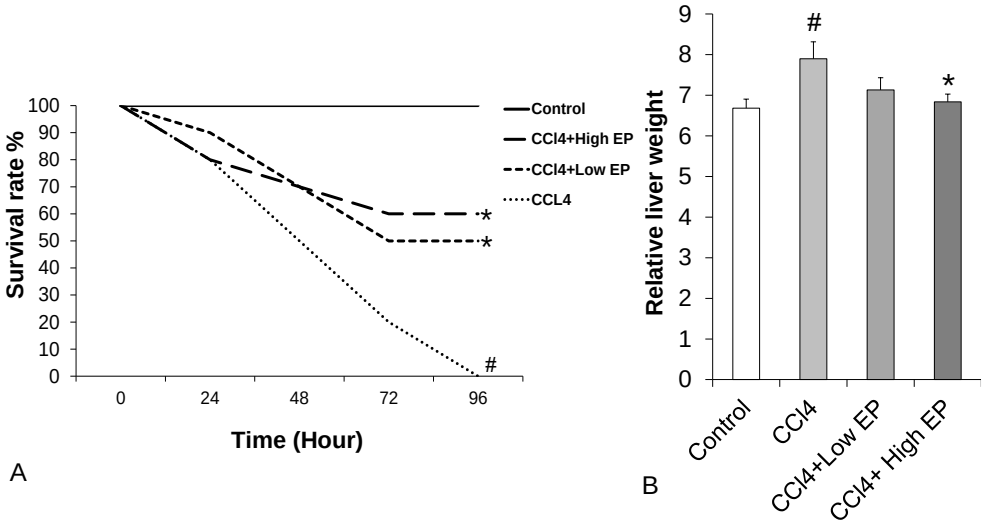
### تاثیر تیمار با EP بر بقا و وزن نسبی کبد حیوانات بعد از تیمار با $CCl_4$

بیماری‌های حاد کبدی با مرگ و میر بالایی همراه هستند و افزایش شانس بقا و به تاخیر انداختن مرگ در بیماران مبتلا به این آسیب‌ها می‌تواند احتمال بازسازی کبد با روش‌های درمانی مختلف را افزایش دهد (۵)، از این رو بررسی بقا و مرگ و میر حیوانات مورد آزمایش بسیار حایز اهمیت است. در این مطالعه با تزریق (۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم $CCl_4$)، تعدادی از موش‌های گروه‌های مورد آزمایش به دلیل نقص شدید و ناگهانی در عمل‌کرد کبدی مردند. میزان و زمان مرگ و میر موش‌ها در تمامی گروه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در حیواناتی که علاوه بر $CCl_4$، EP را در دوزهای ۱۴۰و ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند مرگ و میر به طور وابسته به دوز کاهش یافت. بطوری که در گروه تیمار شده با ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم EPبیش از ۵۰ درصد و در گروه تیمار شده با ۱۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم EP بیش از ۶۰ درصدِ حیوانات زنده ماندند و این در حالی بود که هیچ یک از حیوانات گروهی که فقط $CCl_4$ دریافت کردند تا پایان ۹۶ ساعت زنده نماند (شکل ۲، A). نتایج حاکی است که تیمار حیوانات مسموم با EP می‌تواند مرگ و میر ناشی از $CCl_4$ را به طور معنی‌داری کاهش و در نتیجه درصد بقا را افزایش دهند. افزایش وزن کبد و وزن نسبی کبد به دلیل تورم سیتوتوکسیک سلول‌ها از علایم بیماری‌های کبدی است. در این مطالعه وزن نسبی کبد با اندازه‌گیری دقیق وزن بدن و وزن کبد حیوانات در تمامی گروه‌ها محاسبه شد. نتایج نشان دادند که

تیمار حیوانات با دوز بالاتر EP (۱۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) افزایش وزن نسبی القا شده با $CCl_4$ در کبد را به طور قابل توجهی تخفیف داده است. کاهش وزن نسبی کبد در گروهی از حیوانات که با دوز پایین تر EP (۱۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تیمار شده بودند نیز مشاهده شد ولی این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود (شکل ۲، B).



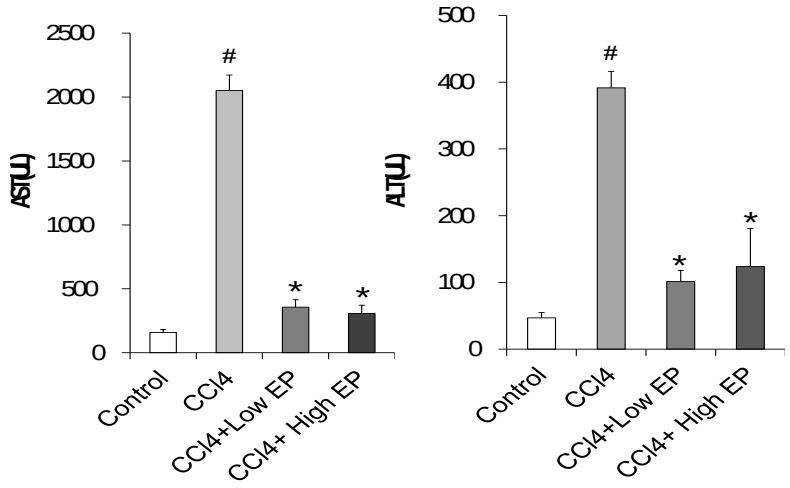

*شکل ۱: بررسی صحت القای مدل حاد کبدی با تزریق ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم تتراکلریدکربن ($CCl_4$). A، B: اندازه‌گیری ALT و AST سرمی؛ $CCl_4$ باعث افزایش معنی‌دار سطوح این آنزیم‌ها در خون شده است. $P<0/01$ # میزان معنی‌داری اختلاف از گروه کنترل و $P<0/01$* میزان معنی داری اختلاف از گروه CCl4 را نشان می دهند. C و D: فتومیکروگراف از بافت کبد به ترتیب در گروه های کنترل و شم. بافت کبد در این گروه‌ها کامل طبیعی است، طناب‌های کبدی کاملا منظم هستند؛ E: فتومیکروگراف از بافت کبد در گروه $CCl_4$، نکروز حاد هپاتوسیتی و تجمع سلول‌های التهابی (پیکان سیاه) و القای بی نظمی در طناب های کبدی مشهود است. (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین بزرگ‌نمایی ×۲۰۰، CV : سیاهرگ مرکزی. $CCl_4$: تتراکلرید کربن؛ ALT: آلانین آمینوترانس فراز؛ AST: آسپارتات آمینوترانس فراز).*




*شکل۲: A: تاثیر EP بر درصد بقای حیوانات بعد از تیمار با تتراکلریدکربن ($CCl_4$). EP منجر به افزایش بقای حیوانات در گروه‌های تحت تیمار شده است. B: تاثیر EP بر وزن نسبی کبد (وزن کبد/ ۱۰۰ گرم وزن بدن) در حیوانات تیمار شده با $CCl_4$؛ EP منجر به کاهش معنی دار وزن نسبی کبد در حیوانات تحت تیمار با دوز ۱۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم شده است. $P<0/001$ # میزان معنی داری اختلاف از گروه کنترل و $P<0/001$* میزان معنی داری اختلاف از گروه $CCl_4$ را نشان می‌دهند. تعداد حیوانات در هر گروه ۱۰ سر است (EP: Ephedra pachyclada؛ Low EP: غلظت پایین عصاره EP معادل ۱۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، High EP: غلظت بالای عصاره EP معادل ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ، $CCl_4$: تتراکلرید کربن).*

**تاثیر EP بر فعالیت AST و ALT سرمی بعد از تیمار با $CCl_4$**

AST و ALT از مهم‌ترین شاخص‌های پاتولوژیک مرگ سلولی و آسیب در کبد هستند (۲۰). در این مطالعه آنالیز بیوشیمیایی این آنزیم ها در سرم جمع آوری شده از حیوانات انجام گرفت. نتایج نشان دادند که تزریق درون صفاقی ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم $CCl_4$ باعث افزایش قابل توجهی در فعالیت سرمی آنزیم‌های AST و ALT شده است، ولی تیمار حیوانات دریافت کننده همین میزان $CCl_4$ با دوز های ۱۴۰و ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم EP میزان فعالیت سرمی این آنزیم‌ها را به طور معنی‌داری کاهش داده است ($p<0/01$) (شکل۳). لازم به ذکر است که میانگین سطوح AST در گروه‌های تیمار شده با EP بطور وابسته به دوز کاهش یافت در حالی که در مورد ALT حیوانات تیمار شده با دوز ۱۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم EP کاهش بیشتری در سطوح این آنزیم نشان دادند، اگرچه تفاوت بین دو گروه تیمار شده با EP در مورد هیچ‌کدام از دو آنزیم معنی‌دار نبود. نتایج حاکی از این است که EP مرگ سلولی و آسیب کبدی القا شده با $CCl_4$ را به طور قابل توجهی کاهش داده است.

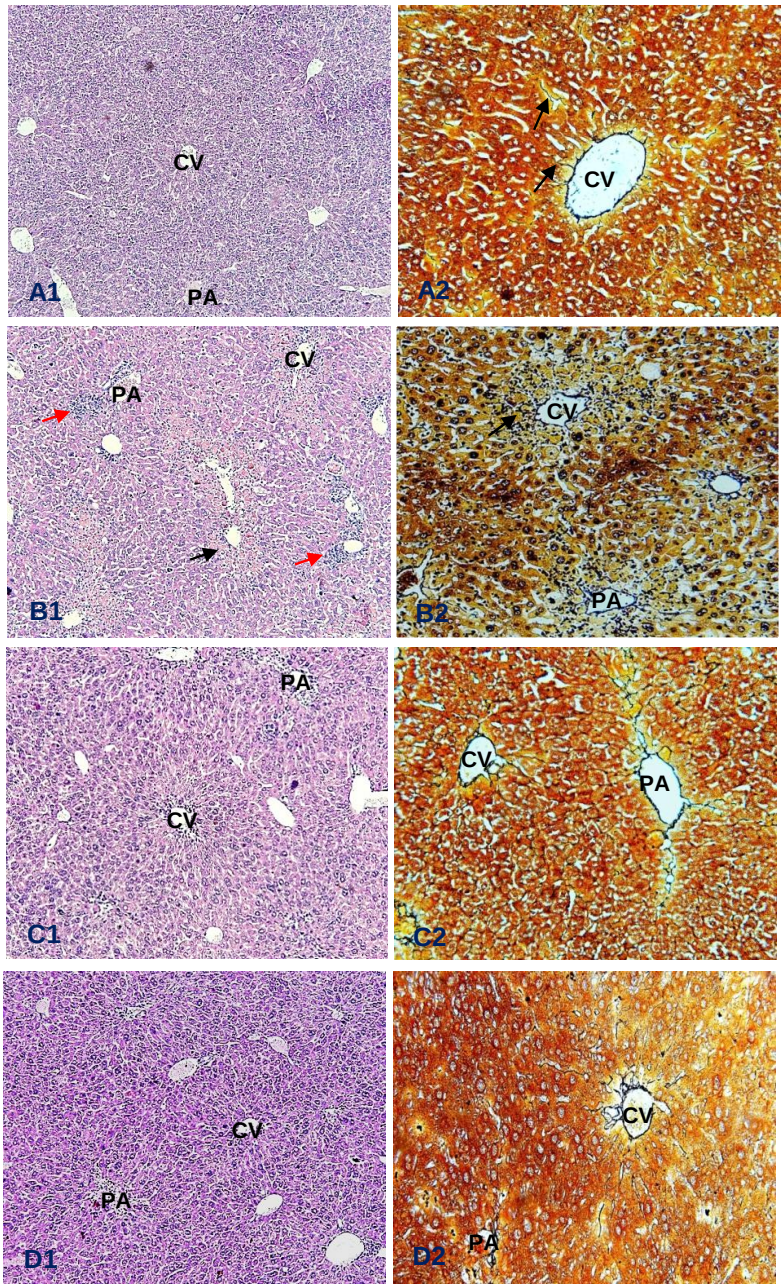



*شکل۳: تاثیر EP بر فعالیت سرمی AST و ALT در موش های تیمار شده با $CCl_4$ . $^{\#}P<$ ۰/۰۰۱ میزان معنی داری اختلاف از گروه کنترل و $^{*}P<$ ۰/۰۰۱ میزان معنی داری اختلاف از گروه $CCl_4$ را نشان می دهند. تفاوت بین دو گروه تحت تیمار با EP معنی دار نیست. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ سر است. (EP: Ephedra pachyclada ؛ Low EP: غلظت پایین عصاره EP معادل ۱۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ؛ High EP: غلظت بالای عصاره EP معادل ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم؛ $CCl_4$ : تتراکلرید کربن؛ ALT: آلانین آمینوترانس فراز؛ AST: آسپارتات آمینوترانس فراز).*

**تاثیر EP برتغییرات بافتی کبد بعد از تیمار با $CCl_4$**

دریافت دوز بالای $CCl_4$ قادر است در مدت کوتاهی آسیب حاد کبدی را که با نکروز هپاتوسلولار و تجمع سلول‌های التهابی در نواحی مرکز لوبولی همراه است القا نماید (۲۱). جهت بررسی تاثیرات محافظتی EP بر مدل حاد کبدی دو گروه از حیوانات پس از دریافت $CCl_4$ با دوزهای مختلف EP تیمار شدند و پس از ۹۶ ساعت کبد حیوانات خارج و مورد بررسی‌های بافت شناسی قرار گرفت. تصاویری از مقاطع بافتی رنگ آمیزی شده به روش های H&E و رتیکولین در شکل ۴ ارائه شده است. نتایج بررسی‌های بافت شناسی نشان دادند که کبد حیوانات کنترل کاملا طبیعی بوده، طناب‌های سلولی به طور منظم در اطراف سیاهرگ مرکزی قرار گرفته و هیچ نکروزی به چشم نخورد (شکل ۴، A1) و همچنین این طناب‌ها با داربستی رتیکولینی حمایت می‌شدند (شکل ۴، A2). در عین‌حال چنانچه تصاویر نشان می‌دهند دریافت ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم $CCl_4$ موجب القای نکروز گسترده هپاتوسلولار و تجمع قابل توجه سلول‌های التهابی حول رگ مرکزی و فضاهای پورت را موجب شده بود (شکل ۴، B1). در حیوانات تیمار شده با دوز ۱۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرمEP ناحیه نکروزه به میزان قابل توجهی کوچک تر شده و نیز از انبوه سلول‌های التهابی ارتشاح یافته در این ناحیه تا حدی کاسته شد (شکل ۴، C1). در حالی که در گروه تیمار شده با دوز ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم EP تنها تعداد اندکی از سلول‌ها در اطراف سیاهرگ مرکزی و فضاهای پورت دچار نکروز شده و ارتشاح سلول‌های التهابی بسیار کاهش یافته است (شکل۴، D1). اسلایدهای رنگ آمیزی شده به روش رتیکولین نیز، از هم پاشیدن داربست و نظم

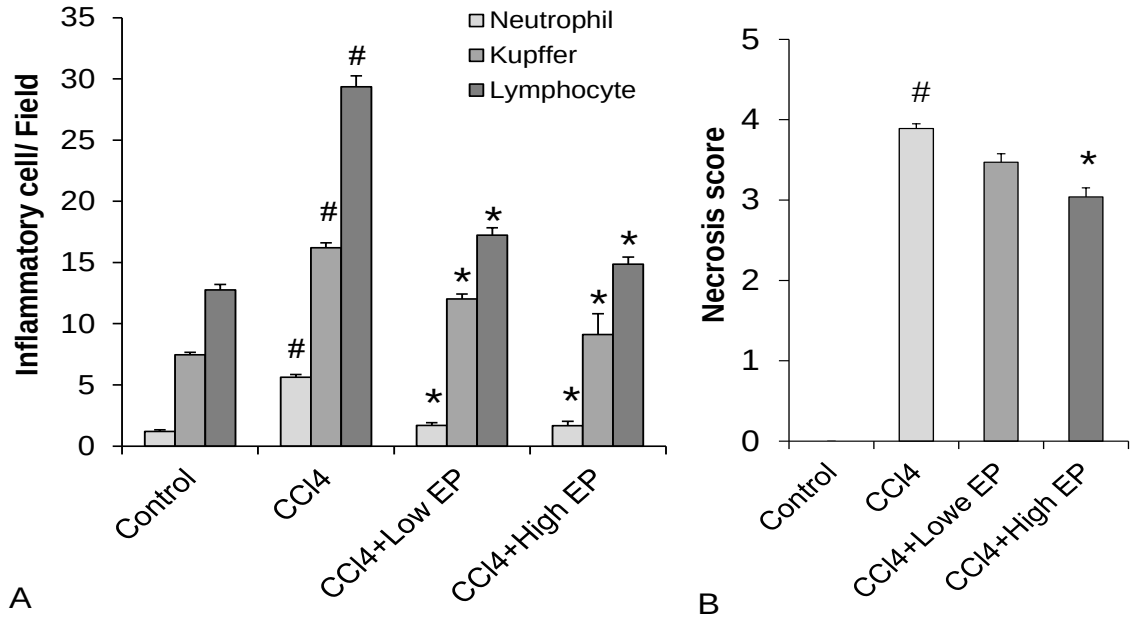
طناب‌های کبدی در گروه $CCl_4$ نسبت به گروه کنترل کاملا مشهود بود (شکل۴، B2). تصاویر نشان می‌دهند که تیمار با ۱۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرمEP تا حدی به بازگشت نظم طناب‌ها و بازسازی داربست کبد کمک کرده بود (شکل ۴، C2)، در حالی که در گروه تیمار شده با ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم EP نظم طناب ها و داربست رتیکولینی کبد کاملا مشهود بوده و به حالت طبیعی شباهت بیشتری داشت (شکل۴، D2).




*شکل۴: تاثیر EP برتغییرات بافتی کبد بعد از تیمار با $CCl_4$. A1: بافت کبد طبیعی در گروه کنترل. B1: بافت کبد در گروه $CCl_4$ تیمار نشده با EP، نکروز حاد هپاتوسیتی (پیکان سیاه) و تجمع سلول‌های التهابی (پیکان قرمز) در نواحی اطراف سیاهرگ مرکزی (CV) و فضای پورت مشهود است. C1 و D1: بافت کبد در گروه‌هایی که بعد از دریافت $CCl_4$ به ترتیب با دوز های EP (۱۴۰ و ۱۴۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم) تیمار شدند، محدوده نکروز و تجمع سلول‌های التهابی در این گروه‌ها به طور چشم‌گیری کاهش یافته است. (رنگ آمیزی H&E، بزرگ نمایی ×۱۰۰). A2: رنگ آمیزی رتیکولین از بافت کبد در گروه کنترل به سلامت داربست کبد در در اطراف سینوزوئیدها دقت شود (پیکان های سیاه). B2: رنگ آمیزی رتیکولین از بافت کبد در گروه $CCl_4$ تیمار نشده با EP، داربست کبد خصوصا در نواحی اطراف CV به شدت تخریب شده است (پیکان سیاه). C1 و D1: بافت کبد در گروه‌هایی که بعد از دریافت $CCl_4$ به ترتیب با دوز های EP (۱۴۰ و ۱۴۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم) تیمار شدند، EP به صورت وابسته به دوز به ترمیم داربست از دست رفته کبد کمک کرده است. (رنگ آمیزی رتیکولین بزرگنمایی×۲۰۰) (EP: Ephedra pachyclada ؛ $CCl_4$ : تتراکلرید کربن؛ H&E: هماتوکسیلین و ائوزین)*

**تاثیر EP بر تعداد سلول‌های التهابی و درصد نکروز در حیوانات تیمار شده با $CCl_4$**

بیماری‌های حاد کبدی اغلب با التهاب بافتی همراه هستند (۵)، این پاسخ‌های التهابی به وسیله سلول‌های کوپفر، سلول‌های ستاره‌ای (Hepatic satellite cell) حاضر در بافت کبد و سلول‌های التهابی وارد شده به بافت میانجیگری می‌شوند (۲۲). در این مطالعه تعداد سلول‌های کوپفر، نوتروفیل و لنفوسیت که از مهم‌ترین سلول‌های درگیر در التهاب کبدی هستند در اسلایدهای H&E مورد شمارش قرار گرفت. نتایج آنالیز داده‌های کمی حاصل از این شمارش در شکل ۵، A ارائه شده است. نتایج نشان دادند که $CCl_4$ منجر به افزایش قابل توجه تعداد این سلول‌ها در کبد شده است، در حالی که که تیمار حیوانات با ۱۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم EP تعداد سلول‌های التهابی القا شده با CCl4 را به طور معنی‌داری کاهش داده است. این کاهشِ تعداد سلول‌های التهابی در گروه تیمار شده با ۱۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم EP به مراتب بیشتر بوده است. بنابراین می‌توان گفت EP التهاب بافتی القا شده توسط $CCl_4$ را تا حد زیادی سرکوب نموده است. در این مطالعه میزان نکروز بافتی نیز در اسلایدهای H&E با استفاده از جدول شماره ۱ کمی شد. نتایج گویای کاهش معنی دار نکروز مرکز لوبولی در حیوانات تیمار شده با دوز بالای EP (۱۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با حیواناتی بود که فقط $CCl_4$ دریافت کرده بودند (شکل۵، B). چنین کاهشی در میزان نکروز مرکز لوبولی در حیواتی که با دوز پایین EP تیمار شده بودند نیز مشاهده شد ولی از نظر آماری معنی‌دار نبود.




*شکل۵: A) تاثیر EP بر میانگین سلول‌های التهابی در کبد حیوانات تیمار شده با $CCl_4$؛ تیمار با EP به طور وابسته به دوز تعداد سلول‌های نوتورفیل، کوپفر و لنفوسیت موجود در کبد را کاهش داده است. B) تاثیر EP بر درجه نکروز بافتی در حیوانات تیمار شده با $CCl_4$؛ تیمار با دوز بالای EP موجب کاهش معنی دار نکروز بافتی در مقایسه با گروه CCl4 شده است (امتیاز دهی به نکروز در اسلایدهای H&E بر اساس جدول شماره۱). $^{\#}P<۰/۰۰۱$ میزان معنی داری اختلاف از گروه کنترل و $^{*}P<۰/۰۰۱$ میزان معنی داری اختلاف از گروه $CCl_4$ را نشان می دهند. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ سر است (EP: Ephedra pachyclada ؛ Low EP: غلظت پایین عصاره EP معادل(۱۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، High EP: غلظت بالای عصاره EP معادل (۱۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)؛ $CCl_4$ : تتراکلرید کربن؛ H&E: هماتوکسیلین و ائوزین).*

## بحث

با توجه به ناشناخته بودن اثرات روش‌های جدید درمانی، مدل‌سازی بیماری‌های گوناگون در حیوانات پیش از شروع آزمایشات بالینی بسیار حائز اهمیت است. از این رو در این مطالعه سعی شد ابتدا مدل تایید شده‌ای از بیماری حاد کبدی در موش القا شود. برای این منظور از هپاتوتوکسینی به نام $CCl_4$ استفاده شد. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص گردید که تزریق ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم از $CCl_4$ منجر به نکروز گسترده و تجمع سلول‌های التهابی حول رگ مرکزی و همچنین افزایش فعالیت سرمی AST و ALT در حیوانات خواهد شد.

نتایج این مدل سازی با یافته‌های مطالعات پیشین مطابقت داشته (۱۹، ۲۳، ۲۴ و۲۵) و صحت القای مدل مورد نظر را تایید نمود. تحقیقات نشان داده‌اند که $CCl_4$ بعد از جذب و ورود به خون وارد کبد شده و در میکروزوم‌های کبدی توسط سیتوکروم $P_{450}$ به رادیکال‌های آزاد تری‌کلرومتیل و پراکسی‌کلرومتیل متابولیزه می‌شود (۲۶). این رادیکال‌ها با حمله به غشای سلولی سبب پراکسیداسیون لیپیدی آن شد و سپس منجر به هضم غشای سلولی و القای نکروز در سلول‌های پارانشیمی کبد می‌شود (۲۷). فعالیت آنزیماتیک سرمی با آسیب‌های پارانشیمی کبد در ارتباط است. این آسیب‌ها موجب آزادسازی AST و ALT از مواضع شان در میتوکندری و سیتوزولِ هپاتوسیت‌ها و راه یافتن این آنزیم ها ازδ-GTP غشایی و گسیختگی‌های سلولی به خون شده و فعالیت سرمی آن‌ها را افزایش می‌دهند (۲۸). از طرف دیگر هپاتوسیت هایی که تحت تاثیر نکروز قرار گرفته‌اند شروع واکنش‌های التهابی را در کبد تحریک می‌کنند. مشخصه التهاب در کبد تهاجم سلول‌های التهابی است، این سلول‌ها با ترشح سایتوکین‌های التهابی مثل IL-6 و TNFα باعث پیشروی بیماری و آسیب بیشتر کبد می‌شوند (۲۹).

در این مطالعه جهت بررسی تاثیرات EP بر آسیب حاد کبدی، القای بیماری به روش آزموده شده قبل درسه گروه از موش ها صورت گرفت و دو گروه از موش‌ها روزانه با دوزهای مختلف EP تیمار شدند. نتایج این آزمایش نشان داد که تیمار با EP قادر به افزایش قابل توجه شانس بقا و کاهش وزن نسبی کبد در حیوانات دارای آسیب حاد کبدی است. همچنین EP می‌تواند فعالیت سرمی آنزیم‌های AST و ALT را کاهش دهد که خود به معنای کاهش مرگ سلولی و آسیب در بافت کبد است. مطالعات بافت‌شناسی کبد حیوانات مورد آزمایش نیز نشان داد که تیمار با EP، نکروز هپاتوسیتی و تجمع سلول های التهابی القا شده توسط $CCl_4$ را کاهش داده و به بازسازی داربست کبد کمک می‌کند. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت EP کبد را در برابر آسیب حاد القا شده توسط $CCl_4$ حفاظت می‌کند.

از آنجا که استرس اکسیداتیو و التهاب القا شده توسط آن عامل آسیب زننده به بافت کبدی‌اند و در ایجاد بسیاری از بیماری‌های حاد کبدی نقش مهمی دارند، از این رو آنتی اکسیدانت‌ها قادرند با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و نکروز هپاتوسیتی تا حد زیادی کبد را در مقابل آسیب‌ها محافظت کنند. به هم دلیل است که اهمیت جستجوی آنتی اکسیدانت‌های طبیعی در سال‌های اخیر افزایش قابل توجهی یافته است (۳۰). امروزه با وجود پیشرفت‌های زیاد داروهای مدرن، دارویی که قادر به تحریک کبد آسیب دیده و بازسازی آن باشد وجود ندارد (۹ و ۳۱). همین موضوع سبب شده است تا برخی از دانشمندان علوم داروشناسی پتانسیل فعالیت هپاتوپروتکتیو را در گیاهان و بر پایه طب سنتی جستجو کنند (۸ و ۹)، چرا که بسیاری از ترکیبات گیاهی از جمله پلی‌فنل‌ها دارای خواص آنتی اکسیدانتی هستند (۳۲). ترکیبات پلی‌فنلی خصوصا فلاونوئیدها دارای اثر حفاظتی در برابر آسیب‌های ناشی از سموم کبدی و رادیکال‌های آزاد هستند (۳۳ و ۳۴).

Parsaeimehr و همکارانش (۱۵) نشان دادند که EP واجد خاصیت آنتی‌اکسیدانتی است آن‌ها همچنین ثابت کردند که این گیاه حاوی مقادیر قابل توجهی ترکیبات فنلی است بنابراین به نظر می رسد EP به دلیل دارا بودن ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانتی ناشی از حضور این ترکیبات، منجر به غیر فعال ساختن رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط $CCl_4$ شده و از آسیب به غشای سلول‌ها و القای نکروز در آن‌ها جلوگیری نموده است. با کاهش آسیب‌های پارانشیمی کبد توسط EP فعالیت سرمی آنزیم‌های کبدی نیز به طبع آن کاهش یافته است. این نتایج با یافته‌های سایر محققان در مورد تاثیرات آنتی‌اکسیدانت‌ها در محافظت کبدی مطابقت دارد (۳۵، ۳۶، ۳۷ و ۳۸). همچنین افزایش وزن کبد و وزن نسبی کبد در گروه تیمار شده با $CCl_4$ می‌تواند ناشی از تجمع لیپید و بروز تورم سیتوتوکسیک در سلول‌های کبدی در اثر نشت رو به خارج پتاسیم و ورود همزمان سدیم و آب به درون سلول باشد که به عنوان یکی از مهم‌ترین اثرات پراکسیداسیون لیپیدی در نظر گرفته می شود و تیمار حیوانات با دوز بالای EP با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی تا حد زیادی افزایش وزن نسبی کبد در اثر $CCl_4$ را جبران نموده است (۳۹ و ۴۰). از آنجا که حیوانات در یک فاصله زمانی ۲ ساعته بعد از دریافت $CCl_4$ با EP تیمار شدند تعدادی از هپاتوسیت‌ها خصوصا در نواحی مرکز لوبولی که بیشترین میزان سیتوکروم $P_{450}$ را دارا هستند (۴۱) دچار نکروز شده و پاسخ‌های التهابی را در کبد تحریک نموده‌اند. همان طور که گفته شد پاسخ‌های التهابی و ارتشاح سلول‌های التهابی به بافت کبد، خود مرحله بسیار آسیب زننده در پروسه بیماری زایی کبد است و می تواند به اختلال شدید در عملکرد کبد منجر گردد (۲۹ و ۴۲). در این مطالعه نشان داده شد که در گروه‌های

تیمار شده با EP تعداد سلول‌های التهابی در بافت کبد به طور قابل توجهی کاهش یافته بود. از این رو می‌توان گفت مکانسیم فعالیت محافظت کبدی EP علاوه بر خواص آنتی‌اکسیدانتی‌اش در خاصیت ضد التهابی آن نیز هست که احتمالا به دلیل حضور ترکیبات افدرینی موجود در این گیاه است (۱۱). با توجه به یافته های Yeom (۱۳) و Yamada و همکارانشان (۱۴)، EP احتمالا با کاهش ترشح سایتوکین التهابی موجب مهار التهاب بافتی می‌شود. آن‌ها همچنین نشان دادند که تیمار با EP باعث افزایش سطح پروتینی IL-10 و STAT3 در کبد می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند واکنش‌های ضد التهابی در کبد با فعال سازی مسیر STAT3 در سلول های کوپفر توسط IL-10 که یک سایتوکین ضد التهابی است در ارتباط می باشد (۴۳). از این رو EP احتمالا با سرکوب ترشح سایتوکین‌های التهابی و تحریک ترشح سایتوکین‌های ضد التهابی و فعال سازی مسیر STAT3 روند التهاب در کبد را مهار می‌کند. مهار پراکسیداسیون لیپیدی و نکروز هپاتوسیتی و همچنین سرکوب التهاب، منجر به بازگشت عمل‌کرد از دست رفته کبد و بازسازی سلول‌های آسیب دیده می شود. این نتایج در مطالعات بسیاری دیده شده اند (۴۴، ۴۵، ۴۶، ۴۷ و ۴۸). بازگشت نسبی عمل‌کرد کبد و کاهش مارکرهای سرمی آسیب کبدی از انسفالوپاتی کبدی و مرگ در اثر آن جلوگیری می‌کند از این روست که درصد بیشتری از حیوانات بیمار تیمار شده با EP زنده ماندند.

## نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمار با عصاره *Ephedra pachyclada* موجب تخفیف آسیب کبدی القا شده توسط تتراکلریدکربن شده و به صورت معنی‌داری تمامی شاخص‌های آسیب بافتی را بهبود می‌بخشد. EP احتمالا با مهار برهم کنش‌های شیمیایی رادیکال‌های آزاد ناشی از $CCl_4$ که آغاز کننده استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپید و تغییرات مولکولی هستند و همچنین سرکوب التهاب بافتی اثر حفاظت کنندگی کبد را اعمال می کند.

## تشکر و قدردانی

مولفین مراتب سپاس خود را از زحمات فراوان آقای دکتر یاسر تهمتنی و خانم سیده غدیره میرابوالقاسمی در انجام این پروژه ابراز می‌دارند.

## منابع

1. Meyer, S.A, Kulkarni, A.P. Hepatotoxicity. In: Hodgson E, Smart RC, editors, Introduction to biochemical toxicology, 3th Ed. New York: A. John Wiley & Sons, Inc; 2001; p. 487-90.

2. Zakim, D, Boyer, T.D. Hepatology: A Textbook of Liver Disease. 2th Ed. the University of Michigan: Saunders, Inc; 1990; p.750.

3. Trey C, Davidson CS. The management of fulminant hepatic failure. Prog Liver Dis.1970; 3: 282-298.

4. Rakela J, Lange SM, Ludwig J, et al. fulminate hepatitis: Mayo clinic experience with cases. Mayo clin proc. 1985; 60(5): 289-292.

5. Shakil AO, Kramer D, Mazariegos GV, Fung JJ, et al. Acute liver failure: clinical features, outcome analysis, and applicability of prognostic criteria. Liver Transplant. 2000; 6:163-169.

6. Plevris JN, Schina M, Hayes PC. Review article: The management of acute liver failure. Aliment Pharmacol Ther. 1998; 12: 405-418.

7. Fong BM, Siu TS, Sidney T. Persistently Increased Acetaminophen Concentrations in a Patient with Acute Liver Failure. Clinical Chem. 2011; 57:13-19.

8. Shanmugasundaram P, Venkataraman S. Hepatoprotective and antioxidant effects of Hygrophila auriculta Heine. Root extract. J. Ethanopharmacology. 2006; 104: 124-128.

9. Witte I, Berlin J, Wray V, Schubert W, et al. Mono-und diterpenes from cell cultures or Thuja occidenalis. Planta Medica. 1983; 49(12): 216-221.

10. Soni MG, Carabin IG, Griffiths JC, Burdock GA. Safety of ephedra: lessons learned. Toxicol Lett. 2004; 150: 97-110.

11. Hikino H, Konno C, Takata H, Tamada M. Anti-inflammatory principle of *Ephedra* Herbs. Chem Pharm Bull. 1980; 28: 2900- 2904.

12. Shekelle PG, Hardy ML, Morton SC, Maglione M, et al. Efficacy and safety of *ephedra* and ephedrine for weight loss and athletic performance: a meta-analysis. J Am Med Assoc. 2003; 289: 1537–45.

13. Yeom MJ, Lee HC, Kim GH, Lee HJ, et al. Antiarthritic effects of *ephedra sinica* Stapf herb-acupuncture: inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation and adjuvant-induced polyarthritis. J Pharmacol Sci. 2006; 100:41-50.

14. Yamada I, Goto T, Takeuchi S, Ohshima S, et al. Mao *Ephedra sinica* Stapf protects against D-

galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic failure. Cytokine. 2008; 41:293-301.

15. Parsaeimehr A, Sargsyan E, Javidnia K. A Comparative Study of the Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Activity and Total Content of Phenolic Compounds of Cell Cultures and Wild Plants of Three Endemic Species of *Ephedra*. Molecules. 2010; 15: 1668-1678.

16. Munoz RH, Munoz MD, Lopez VN, Barrera FLP, et al. Balance between oxidative damage and proliferative potential in an experimental rat model of CCl4–induced cirrhosis: protective role of adenosine administration. Hepatol. 1997; 26: 1100-1110.

17. Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. Dig Dis Sci. 1991; 36: 770-774.

18. Arezzini B, Lunghi B, Lungarella G, et al. Iron overload enhances the development of experimental liver cirrhosis in mice. Inter J of biochemistry and cell biology. 2003; 35: 486-95.

19. Gutierrez R, Alvarado JL, Presno M, Veyna OP, et al. Oxidative Stress Modulation by *Rosmarinus officinalis* in CCl4-induced Liver Cirrhosis. Phytother. Res. 2009; 80: 399-348.

20. Fu Y, Zheng Sh, Lin J, Ryerse J, et al. Curcumin Protects the Rat Liver from CCl4-Caused Injury and Fibrogenesis by Attenuating Oxidative Stress and Suppressing Inflammation. Mol Pharmacol. 2008; 73(2):399–409.

21. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. Crit Rev Toxicol. 2003; 33(2): 105-114.

22. Lowes KN, Croager EJ, Olynyk JK, Abraham LJ, et al. Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. J of Gastroenterol and Hepatol. 2003; 18: 4-12.

23. Wu Y, Li L, Wen T, Li YQ. Protective effects of echinacoside on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. Toxicology. 2007; 232(1-2): 50-6.

24. Kodai S, Takemura S, Minamiyama Y, Hai S, et al. S-allyl cysteine prevents CCl(4)-induced acute liver injury in rats. Free Radic Res. 2007; 41(4): 489-97.

25. Ohta Y, Nishida K, Sasaki E, Kongo M, et al. Attenuation of disrupted hepatic active oxygen metabolism with the recovery of acute liver injury in rats intoxicated with carbon tetrachloride. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharamcol. 1997; 95: 191-207.

26. Recknagel RO, Glinde JR, Dolak JA. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. Pharmacol. Ther. 1989; 43: 139-154.

27. Lliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. American J of Medicine. 1991; 91(3): 14–22.

28. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. Clin Chim Acta. 2007; 381(2): 107-113.

29. Choi I, Kang HS, Yang Y, Pyun KH. IL-6 induces hepatic inflammation and collagen synthesis in vivo. Clin Exp Immunol. 1994; 95: 530-535.

30. Wojdylo, A, Oszmianski, J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chem. 2007; 105: 940-949.

31. Chattopadhyay RR. Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract. J of Ethanopharmacol. 2003; 89(2-3): 217-219.

32. Areias FM, Valentao P, Andrade PB, Ferreres F, et al. Phenolic fingerprint of peppermint leaves. Food Chem. 2001; 73: 307-11.

33. Carreon JP, Iimenez GC, Vega JI. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Calendula officinalis* extract in rat liver cell cultures tread with diethy initrosamin. Toxicol in vitro. 2002; 16: 235-58.

34. Friedman WE. Introduction to biology and evolution of the Gnetales. Int. J. Plant Sci. 1996; 157: S1-S2.

35. Naik SR, Panda VS. Hepatoprotective effect of Ginkgoselect Phytosome in rifampicin induced liver injurym in rats: Evidence of antioxidant activity. Fitoterapia. 2008; 79(6): 439-45.

36. Buettener GR. The pecking order of free radicals and antioxidant: lipid peroxidation, alpha–tocopheral and ascorbat. Arch Biophysic. 1993; 300: 535-43.

37. Hinneburg I, Damien Dorman HJ, Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. Food Chem. 2006; 97(11): 122-29.

38. Cos P, Rajan P, Vedernikova I, Calomme M, et al. In vitro antioxidant profile of phenolic acid derivatives. Free Radic Res. 2002; 36: 711-16.

39. Seyer JM, Hutcheson ET, Kang AH. Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. J Clin Invest. 1977; 59(2): 241- 8.

40. Hazarika A, Sarkar SN, Hajare S, Kataria M, et al. Influence of Malathion pretreatment on the

toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. Toxicol. 2003; 1851-2): 1-8.

41. Hau DK, Gambari R, Wong RS, Yuen MC, et al. Phyllanthus urinaria extract attenuates acetaminophen induced hepatotoxicity, Involvement of cytochrome P450 CYP2E1. Phytomed. 2009; 16(8): 751-760.

42. Berasain C, Castillo J, Perugorria MJ, Latasa MU. Inflammation and Liver Cancer. In: Steroid Enzymes and Cancer: Ann. N.Y. Acad. Sci. 2009; 1155: 206-221.

43. Wang H, Lafdil F, Kong X, Gao B. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 in Liver Diseases: A Novel Therapeutic Target. Inter J of Biol Sci tertilrlfiliclcieces. 2011; 7(5): 536-550.

44. Horiguchi N, Lafdil F, Miller AM, Park O, et al. Dissociation between liver inflammation and hepatocellular damage induced by carbon tetrachloride in myeloid cell-specific signal transducer and activator of transcription 3 gene knockout mice. Hepatol. 2010; 51:1724-1734.

45. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, et al. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. Immunity. 2007; 27: 647-659.

46. Horiguchi N, Wang L, Mukhopadhyay P, Park O, et al. Cell type-dependent pro- and anti-inflammatory role of signal transducer and activator of transcription 3 in alcoholic liver injury. Gastroenterology. 2008; 134: 1148-1158.

47. FengY, Siu KW, Ye X, WangN, et al. Hepatoprotective effects of berberine on carbon tetrachloride-induced acut hepatotoxicity in rats. Chinese Medicine. 2010; 5: 33-9.

48. Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Vergara P, et al. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF-κB, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. Biochimica and Biophysica Acta. 2007; 1770(6): 989-996.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Winter 2013; 3(4): 351-362

# Protective Effects of *Ephedra pachyclada* on Animal Models with Acute Liver Disease Induced by Carbon Tetrachloride

Azarnia M. Ph.D., Ghasemi M. M.Sc.*

- Department of Biology, Faculty of Science, Kharazmi (Tarbiat Moallem) University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: mqasemi24@yahoo.com

Received: 15 Jul. 2012 Accepted: 6 Aug. 2012

**Abstract**

**Aim:** Evaluation of protective effects of *Ephedra pachyclada* on carbon tetrachloride- induced acute liver injury.

**Material and method:** In this study, initially we designed an experiment to achieve a standard animal model, in which 30 mice were divided into three control, sham and model groups. In the model group the animal received 2ml/kg carbon tetrachloride 50 %( 1:1 in sterile olive oil) intraperitoneally. 72 hours later, blood and liver samples were collected and analyzed using biochemical as well as histological studies. After ensuring the effectiveness of the model induction, in the second trial, 40 mice were divided into 4 groups including control and three experimental groups. Induction of acute liver injury was performed same as previous on experimental groups, which two of them were treated with *Ephedra pachyclada* extract (140, 1400 mg / kg) daily. Blood and liver samples were collected 96 h after carbon tetrachloride injection then serum activity of Alanine amino transferase (ALT), Aspartate amino transferase (AST) and necrosis as well as inflammation in the liver were studied.

**Result:** Treatment with *Ephedra pachyclada* extract significantly decreased the activity of ALT and AST in the serum as well as the necrosis and inflammation in liver tissue. In addition the survival rate was increased in the animal receiving carbon tetrachloride.

**Conclusion:** Results of this research suggest that *Ephedra pachyclada* protects the liver against acute liver injury induced by carbon tetrachloride through inhibition of oxidative stress and suppressing the inflammation.

**Key word:** *Ephedra pachyclada*, Acute liver injury, Carbon tetrachloride