تاثیر عصاره گیاه خرفه با داروی لتروزول در مهار آنزیم آروماتاز بر اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی و هیستولوژی بافت کبد در ماهی گورامی سه خال

۱- طاهره ناجی* ۲- همایون حسین زاده صحافی ۳- سعید محمدی معتمد ۴- ساناز علایی شهمیرزادی ۵-زیبا کلوئی

۱- دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی.
۲- استاد موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
۳-استادیار گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی.
۴-دکترا گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی.
۵-کارشناسی ارشد، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی.

***Corresponding Author: Email: tnaji2002@gmail.com**
Email: h_hosseinzadeh@yahoo.com
Email:mohammadi@yahoo.com
Email:alaie@yahoo.com
Email: Kziba.1367@yahoo.com

چکیده

امروزه تنوع بیماری‌ها و محدودیت تعداد داروهای شیمیایی، عوارض جانبی، تحمل دارویی و هزینه‌های اقتصادی سنگین تهیه آن‌ها، ضرورت توجه به طب سنتی و گیاهان دارویی را دو چندان کرده است. از جمله گیاهانی که در طب سنتی و طب نوین مورد توجه قرار گرفته است، گیاه خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* می‌باشد. هدف از این مطالعه مقایسه اثر گیاه خرفه و داروی لتروزول در مهار آنزیم آروماتاز و سطوح استروئیدهای جنسی و تکوین اووسیت در ماهی ماده نابالغ گورامی سه خال است. بدین منظور تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی ماده نابالغ گورامی سه خال با میانگین وزنی۱±۳ گرم در ۸ تیمار با گروه‌های کنترل شامل کنترل ۱ (دست نخورده) و کنترل ۲ (تزریق با نرمال سالین) و تیمارهای دریافت‌کننده دوزهای ۱، ۰/۵، ۰/۱ میلی‌گرم برکیلوگرم از داروی لتروزول و ۸۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم از عصاره هیدروالکلی خرفه تقسیم شدند. همه تزریق‌ها در ۱۰ نوبت و به صورت یک روز در میان به مدت ۲۰ روز و به صورت تزریق به مقدار ۰/۰۲ میلی‌لیتر بین عضله باله پشتی و خط جانبی انجام گرفت. در پایان پس از بیهوش نمودن ماهیان و تشریح، ساختار بافت‌شناسی کبد و آنزیم‌های کبدی در گروه‌های تیمار و کنترل بررسی شد. نتایج آماری نشان داد گیاه خرفه در دوز حداکثر باعث کاهش سطح آنزیم‌های کبدی و لتروزول در دوز حداکثر باعث افزایش سطح آنزیم‌های کبدی می شود.

کلمات کلیدی: گیاه خرفه، لتروزول، ماهی گورامی سه خال، آنزیم های کبدی، کبد

۱. مقدمه

کبد بزرگترین و پرکاربردترین غده بدن است. کبد در زیر دیافراگم از سمت راست شکم قرار دارد. شیارهایی کبد را به چهار لوب تقسیم می‌کنند سیاهرگ باب خون تیره معده روده و طحال و لوزالمعده را به کبد می‌آورد. سه سیاهرگ فوق کبدی، خون کبد را به بزرگترین سیاهرگ زیرین می‌ریزند. صفحاتی از بافت پیوندی کبد را به هزاران واحد کوچک که لوبول نامیده می‌شود تقسیم می‌کند. یک لوبول به شکل شش ضلعی است. ورید مرکزی در وسط لوبول مشاهده می‌شود[۱]. آنزیم‌های AST، ALT و LDH در این دسته قرار می‌گیرند. این آنزیم‌ها در سیتوپلاسم سلول‌های مختلف بدن از جمله سلول‌های کبدی وجود دارند. هرگونه آسیب به سلول‌های کبدی (هپاتوسیت‌ها) با هر علتی با افزایش این آنزیم‌ها می‌تواند همراه باشد. حساس‌ترین و پرمصرف‌ترین آنزیم‌های تشخیص کبد آمینوترانسفرازها هستند. آن‌ها آسپارتات آمینوترانسفراز (SGOT یا AST) و آلانین‌آمینوترنسفرازها (ALT یا SGPT) هستند. این آنزیم‌ها به طور معمول در سلول‌های کبدی قرار دارند. زمانی که کبد دچار آسیب می‌شود سلول‌های کبدی آنزیم‌ها را وارد جریان خون می‌کنند. بالا رفتن سطح آنزیم‌ها در خون نشان آسیب کبدی است. نام دیگر آمینوترنسفرازها، ترنس آمیناز است. آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز نیز به نام ترانس آمینوزاگزالواستیک سرم (SGOT) نیز نامیده می شود. و آلانین‌آمینوترانسفراز (ALT) نیز به نام ترانس آمیناز پیرویک گلوتامیک سرم (SGPT) مشهور است. اولین گام در تشخیص آسیب کبدی انجام آزمایش خون است که حضور آنزیم‌های کبدی را در خون نشان می‌دهد. AST به طور طبیعی در انواع مختلف بافت‌ها از قبیل کبد، قلب، ماهیچه، کلیه و مغز قرار دارد. این آنزیم در زمان آسیب به هر کدام از این بافت‌ها وارد خون می‌شود. آنزیم دیگر ALT (SGPT) بر عکس AST به طور طبیعی در کبد یافت می‌شود. اگرچه نمی‌توان گفت که این آنزیم منحصراً در کبد قرار دارد اما کبد جایی هست که دربرگیرنده بیشترین غلظت این آنزیم است. این آنزیم در نتیجه آسیب کبدی وارد خون می‌گردد. بنابراین نسبتاً از این آنزیم به عنوان شناساگر ویژه شرایط کبدی استفاده می‌شود[۲]. در مرحله ویتلوژنز ذرات زرده از کبد وارد سلول شده و در کیسه‌های شفاف قرار می‌گیرند. تجمع این ذرات در سیتوپلاسم سبب مهاجرت هسته به حاشیه سیتوپلاسم شده و زیر غشای اووسیت تعداد زیادی حباب‌های پینوسیتوزی ظاهر می‌گردند. همچنین در این مرحله لایه زونارادیاتا کامل شده و سه فضای Z1, Z2, Z3 را تشکیل می‌دهد. این مرحله با تولید زرده که بخش عمده زمان رشد اووسیت‌ها را شامل می‌شود، معین می‌گردد. خرفه یکی از گیاهان شناخته شده در طب سنتی است که از زمان‌های بسیار دور مورد استفاده قرار گرفته و در درمان بسیاری از بیماری‌ها نیز کاربرد دارد. خرفه یا پرپهن گیاهی است علفی، یک ساله با ساقه‌ای گوشتدار و برگ‌های ضخیم و متقابل آبدار سبز با ساقه‌های قرمز، گل‌های زرد یا سفید کوچک و تخم‌های سیاه ریز که خواص دارویی دارند. خرفه وحشی، علف هرزی است آبدار که در شرایط گرم و خشک به خوبی رشد می‌کند و در دامنه گسترده‌ای از خاک‌ها و شرایط اقلیمی مختلف می‌روید. به لحاظ طب سنتی، طبیعت خرفه سرد و تر، قابض و مدر است. در کتب گیاهان دارویی، خواص متعددی برای این گیاه از جمله مدر بودن، ضد آسکوربوت، معالج سرفه مقاوم، تصفیه کننده خون، تب‌بر، مفید در ترمیم سوختگی‌ها و... ذکر شده است[۳]. هیچ نشانه‌ای از سمی بودن این گیاه نیز تاکنون مشاهده نشده است. خرفه علاوه بر اثرات مذکور، دارای اثرات ضد درد و ضدالتهابی می‌باشد. گیاه خرفه غنی‌ترین منبع گیاهی و دارای اسیدهای چرب امگا-۳ است [۴]. آروماتاز، آنزیمی است که در شبکه آندوپلاسمی قرار دارد و تبدیل تستوسترون به استرادیول‌های آروماتیک را کاتالیز می‌کند. مهارکننده‌های آروماتاز در درمان بیماری برای بیماران مبتلا به سرطان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. گزارش‌های موجود بر حجم مدارک پشتیبانی از مصرف این داروها افزوده است. استروژن‌ها پس از تولید توسط آندروژن‌ها به واسطه حضور آنزیم آروماتاز به گیرنده استروژن متصل می‌شوند و آن را ملزم به تقسیم سلول می‌کنند و مهارکننده‌های آروماتاز در یک اتصال رقابتی مانع تولید استروژن می‌شوند که در درمان هورمونی سرطان سینه بسیار کاربرد دارد. از جمله این مهارکننده‌ها لتروزول با نام تجاری فمارا می-

باشد[۵]. داروی لتروزول یک مهارکننده آروماتاز است که از تبدیل آندروژن‌ها به استرادیول جلوگیری می‌کند و از دسته داروهای هورمونی است. لتروزول درمان هورمونی سرطان سینه متاستاتیک وابسته به هورمون در خانم‌های یائسه کاربرد دارد. این دارو همچنین در خانم‌هایی که قبلا از سایر داروهای ضد سرطان از جمله تاموکسیفن استفاده می‌کردند نیز تجویز می‌شود. همچنین در درمان ناباروری با القاء تخمک‌گذاری و سرطان اپیتلیال تخمدان کاربرد دارد. دارو به صورت کامل و سریعاً از دستگاه گوارش جذب می‌شود. فراهم زیستی لتروزول ۹۹/۹ درصد است و تأثیر غذا بر جذب آن ناچیز است. توزیع دارو وسیع و سریع است. این دارو در حدود ۶۰ درصد به پروتئین‌های پلاسما متصل می‌شود. دفع آن عمدتاً ادراری بوده و نیمه عمر دفعی دارو حدود دو روز است. فرمول شیمیایی لتروزول C17H11N5 می‌باشد[۶]. در موضوعات اندوکرینی، ماهی‌ها، به‌عنوان مدل‌های آزمایشی فواید بسیاری دارند. با اینکه ماهی‌ها برخی تفاوت‌های معنادار در سیستم اندوکراینی آن‌ها در مقایسه با سیستم پستانداران دارند، اما اساس زیربنای سیستم اندوکراینی آن‌ها بسیار مشابه پستانداران می‌باشد. این سیستم در ماهی‌ها شامل غدد متنوعی می‌باشد که در سرتاسر بدن آن‌ها گسترده شده است. غده هیپوفیز نیز در ماهی‌ها تعدادی از هورمون‌ها را ترشح می‌کند که بر رشد، متابولیسم لیپید و رشد و نمو، تولیدمثل و رفتار، علاوه بر کنترل دیگر غدد اندوکرینی اثر می‌گذارند. ماهی گورامی سه خال یکی از مهمترین و زیباترین ماهی‌های زینتی شناخته می‌شود و جزء ماهیان آب شیرین بوده که معمولاً بین سنین ۳ تا ۶ ماهگی پس از رسیدن به طول هفت- هشت سانتی‌متر بالغ می‌گردد. بر روی طرفین بدن آن دو خال بزرگ تیره رنگ وجود دارد. ماهی بسیار مقاومی است و با هر شرایطی خود را وفق می‌دهد[۷].

۲.تئوری و پیشینه تحقیق

تولید مثل در ماهی به وسیله محور هیپوتالاموس، هیپوفیز، گناد کنترل و تنظیم می‌گردد. هیپوتالاموس هورمون آزادکننده گنادوتروپین را تولید می‌نماید این هورمون با اثر بر غده هیپوفیز باعث سنتز هورمون‌های جنسی می‌شود که سبب تولید سلول‌ها و هورمون‌های جنسی توسط غدد جنسی می‌شود[۸]. وجود گیرنده‌های آندروزنی با استروژنی در سطح هیپوفیز و هیپوتالاموس نقش به سزایی در تنظیم عملکرد فیدبک‌های مثبت و منفی استروئیدهای جنسی در فعالیت تنظیم هورمونی در طی چرخه تولید مثلی دارد. با توجه به شناسایی گیرنده‌های استروژنی بر نورون‌های تولیدکننده دوپامین در برخی از ماهی‌ها چنین به نظر می‌رسد که پس‌خورد منفی استروییدهای جنسی، اعم از استروژن‌ها با آندروژن‌های قابل آرومانیزه شدن بر کاهش ترشح گنادوتروپین‌ها به ویژه (LH) GTH II به طور مستقیم از طریق اتصال آن‌ها به گیرنده‌های استروژنی در نورون‌های محرک دوپامین در مغز ماهی‌ها تنظیم می‌شود. با این وجود نقش اصلی هیپوفیز در کنترل پس‌خوردهای استروییدهای غدد جنسی در ماهی‌ها را نباید نادیده گرفت[۹]. ذرات زرده از کبد وارد سلول شده و در کیسه‌های شفاف قرار می‌گیرند. تجمع این ذرات در سیتوپلاسم سبب مهاجرت هسته به حاشیه سیتوپلاسم شده و زیر غشای اووسیت تعداد زیادی حباب‌های پینوسیتوزی ظاهر می‌گردند. همچنین در این مرحله لایه زونارادیاتا کامل شده و سه فضای Z1, Z2, Z3 را تشکیل می‌دهد. این مرحله با تولید شدید زرده که بخش عمده زمان رشد اووسیت‌ها را شامل می‌شود. هر کدام از بافت‌های بدن دارای یک فعالیت مشخص بوده که در آناتومی و فعالیت آن‌ها منعکس می‌شود. به عنوان مثال: کبد دارای یک نقش مرکزی در متابولیسم بوده و به عنوان یک توزیع کننده مخلوط مناسبی از مواد و ترکیبات را از طریق گردش خون برای تمام اعضا فراهم می‌سازد[۱۰]. افزایش چربی می‌تواند سبب ایجاد بیماری‌های گوناگونی از قبیل آترواسکلروزیس، دیابت و کبد چرب شود که در پی آن آنزیم‌های کبدی افزایش می‌یابد. از آنجایی که گیاه خرفه دارای خواص هیپوگلیسمیک و هیپولیپیدمیک است در مطالعه زارعی و همکاران، اثر عصاره این را بر میزان غلظت آنزیم‌های کبدی شامل: آسپارتات آمینوترانسفراز (SGOT یا AST)

آلانین‌آمینوترانسفراز (SGPT یا ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در موش‌های صحرایی هیپرکلسترولمی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد میزان آنزیم ALT و ALP در گروه کنترل مثبت که تنها غذای چرب را دریافت کرده‌اند، افزایش یافت در حالی‌که در گروه‌های تجربی دریافت‌کننده عصاره گیاه خرفه، همچنین در گروه دریافت‌کننده آتورواستاتین، میزان آنزیم‌ها کاهش یافته بود. بنابراین عصاره گیاه خرفه علاوه بر تأثیر بر کاهش چربی خون، از طریق کاهش کلسترول و افزایش HDL می‌تواند با کاهش AST، ALP، ALT و افزایش سنتز آلبومین در بهبود عملکرد کبد نیز مؤثر باشد[۱۱]. مطالعات امیدی و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مورد گیاه خرفه نشان داده است این گیاه به علت داشتن ترکیب گلوتاتیون دارای خواص آنتی‌دیابتی، هیپولیپیدمیک و اثرات مثبت بر سیستم عصبی بوده که باعث تغییر فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز و کاهش معنی‌دار در پراکسیداسیون لیپیدهای وابسته به فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز می‌شود[۱۲]. شارما در سال ۲۰۰۹ نشان داد چنانچه در جیره غذایی، نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اسیدهای چرب اشباع کاهش یابد میزان لپتین سرم، TNF-α و اینترلوکین‌ها افزایش می‌یابد[۱۳]. عصاره گیاه خرفه به علت فراوانی اسیدهای چرب غیراشباع موجب کاهش معنی‌داری در غلظت فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا و افزایش سطح معنی‌دار mRNA لیپوپروتئین لیپاز (LPL mRNA) در کبد می‌شود و هیچ خاصیت سیتوتوکسیتی یا ژنوتوکسیسیتی ندارد[۱۴]. در نهایت می‌توان چنین گفت که خرفه احتمالاً از طریق کاهش میزان لیپیدها و در پی آن کاهش TNF-α به بهبود عملکرد کبد و کاهش آنزیم‌های کبدی کمک می‌کند[۱۵].

۳.مواد و روش‌ها

روش آماده سازی آکواریوم‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه Fish Tab دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی صورت پذیرفت. ابتدا آکواریوم‌ها با کاغذ سمباده و نمک در آب شهری کاملا شستشو داده شده‌اند و با آب شهری پر شدند. تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی گورامی سه خال خریداری شد. ۲۴ ساعت پیش از وارد کردن ماهیان آکواریوم‌ها از آب شهری پر شدند و فیلتر در آکواریوم‌ها قرار گرفت. هدف از این کار کلرزدایی از آب شهری و بالا بردن سطح اکسیژن موجود در آن و به طورکلی سازگاری خصوصیات آب، با دما و شرایط آزمایشگاه بود. پس از این کار ماهی‌ها به صورت رندوم در آکواریوم قرار داده شدند و به آن ها ۴۸ ساعت مهلت داده شد تا با محیط سازگار شوند. پس از انجام عملیات بیومتری تمام ماهیان (اندازه‌گیری طول ماهی و وزن با در ۸ گروه مجزا شامل: کنترل ۱ (دست نخورده) و کنترل ۲ (تزریق با نرمال سالین) و ۳ گروه تیمار (گیاه خرفه) و ۳ گروه تیمار با (لتروزول)، هر گروه شامل ۱۵ قطعه ماهی در آکواریوم‌ها رهاسازی شده‌اند. فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل: دما، سختی و pH پیش از آزمایش در طول دوره و پس از پایان کار اندازه‌گیری شدند. برای تمامی آکواریوم‌ها هر ۲۴ ساعت یک بار بررسی از لحاظ وضعیت سلامت ماهیان، دمای آب و pH محیط صورت می‌گرفت. ماهیان به صورت یک روز در میان به میزان کافی از غذای استاندارد ماهی گورامی تغذیه شده و همچنین فیلترهای آب آکواریوم‌ها یک روز در میان تمیز می‌شدند.

روش آماده سازی عصاره گیاه تازه و جوان خرفه

در این پژوهش گیاه خرفه از مزارع استان سمنان جمع آوری شد. سپس به میزان کافی از قسمت‌های هوایی گیاه شامل: ساقه و برگ پس از پاک شدن، در سایه خشک شد و توسط آسیاب برقی پودر گردید. به ازای هر ۱۰۰ گرم پودر یک لیتر آب و اتانول به نسبت ۳ به ۷ به ترتیب اضافه گردید و مخلوط به مدت ۷۲ ساعت خیس خورد. به منظور استفاده از روش خیساندن، قیف دکانتور ابتدا با آتانول ۹۶ درجه (حلال مورد استفاده تهیه شده از شرکت MERC) شستشو داده شد و سپس یک تکه پنبه کوچک را با چند قطره آب مقطر نمناک نموده و توسط یک میله شیشه‌ای به انتهای دکانتور هدایت شد. در مرحله بعد پودر گیاه به همراه آب و اتانول ۹۸ درصد درون دکانتور ریخته شده و به مدت ۷۲ ساعت، بی حرکت قرار داده شد.

روش آماده سازی داروی لتروزول

مقدار ۲ گرم از پودر داروی لتروزول خالص از شرکت دارویی توفیق دارو خریداری شد. پس از محاسبه وزن ماهیان و محاسبه دوز تیمارها بر حسب میلی‌گرم برکیلوگرم، مقادیر دوز مورد نظر در هر تیمار با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شد سپس پودر وزن شده جهت هر تیمار، در ۲ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درجه به عنوان حلال حل شده و پس از تهیه در دوزهای (mg/kg ۱، ۰/۵ و ۰/۱) در بالن ژوژه ۵ میلی‌لیتری به حجم رسانیده شد. در نهایت محلول آماده تزریق تیمارها در ظروف شیشه‌ای کوچک درب بسته و تیره رنگ (جهت جلوگیری از نور خورشید و از بین رفتن مواد مؤثره) جهت تزریق نگهداری شد.

روش بیهوش کردن، تزریق و تشریح ماهیان

ابتدا به میزان ۵۰ گرم از گل میخک خشک شده خریداری و توسط آسیاب برقی پودر شد. سپس میزان تقریبی ۱ گرم از آن در بشر ۱ لیتری که با آب مقطر پر شده بود ریخته و با همزن شیشه‌ای ترکیب شد. پس از گذشت چند دقیقه محلول طی چند مرحله از کاغذ صافی عبور داده شد. به این ترتیب تمامی ترکیب صاف شده در بطری‌های پلاستیکی ۰/۵ لیتری و در بسته نگهداری شد. سپس برای هربار تزریق، به میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر از ترکیب حاصل را درون بشر ریخته و به میزان ۴۰۰ میلی‌لیتر آب شهری به آن جهت تزریق عصاره اضافه گردید. در مرحله بعد هر ماهی به مدت تقریبی ۴۰-۳۰ ثانیه درون این محلول قرار گرفته تا به طور نسبی تعادل و هوشیاری خود را از دست دهد. به دنبال این مرحله تزریق انجام گرفت. هرکدام از گروه های تیمار و کنترل، به مدت بیست روز و به صورت یک روز در میان در ۱۰ نوبت مورد تزریق قرار گرفتند. برای دریافت دارو، تزریق از روش درون عضلانی (IM) صورت گرفت. در ابتدا دارو از تیمارهای مورد نظر به وسیله سرنگ انسولین BD با حجم (۰/۵سی‌سی) برداشته شد و ۰/۰۲ سی‌سی پس از قرار دادن پنبه مرطوب بر روی آبشش‌های ماهی و مهار نمودن سر و دم به آرامی، دارو بین باله پشتی و خط جانبی درون عضله با زاویه ۳۰ درجه تزریق گردید. الکل ۷۰ درجه از پیش تهیه شده، توسط پنبه استریل، قبل و بعد از تزریق به ناحیه فوق الذکر آغشته شد. پس از تزریق، ماهیان در آبی که از روز قبل کلرزدایی و تعادل با دمای اتاق در آن صورت گرفته بود قرار داده شدند. سپس توسط شلنگ اکسیژن عملیات احیاء صورت گرفته و همه ماهیان به آکواریوم منتقل شدند. پس از پایان دوره به مدت ۲۴ ساعت هیچ فعالیتی بر روی ماهیان صورت نگرفت. در پایان روز بیستم، پس از بیهوش نمودن ماهیان با عصاره گل میخک، شاخص‌های بیومتری تعداد ۱۲ قطعه از هر تیمار (اندازه گیری طول با استفاده از خط کش و وزن ماهی با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱گرم) انجام شد. سپس ماهیان روی سینی تشریح از ناحیه سر و دم ثابت شده و به وسیله قیچی از سمت دهان به طرف شکم در امتداد خط میانی برش طولی تا زیر سر پوش آبششی ایجاد شد. سپس دو برش عرضی یکی در ابتدا در مجاورت سر، و دیگری در امتداد برش تا بالای خط جانبی بر خط اول عمود کرده و بعد دو برش عرضی در بالای خط جانبی به هم وصل شدند. سپس با احتیاط بخش برآمده با قیچی جدا شده و اندام‌های داخلی تخلیه و بافت کبد جدا گردیدند. پس از جدا نمودن روده‌ها از اطراف کبد،

هرکدام جداگانه با ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۰۱) وزن و تعدادی از هر تیمار جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری انتخاب شدند. به منظور آماده‌سازی نیز در محلول فرمالین ۱۰ درصد که از پیش تعیین شده بود قرار داده شدند. همچنین جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی، تعدادی از کبد ها در محلول گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد قرار داده شد. در نهایت جهت تعیین مقادیر مجهول آنزیم های کبدی ۵۰µL از محلول آماده شده با دستگاه الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرار داده شد و خوانش مقادیر آنزیم صورت گرفت. در پایان داده‌های حاصل از آنزیم‌های کبدی، از طریق نرم افزار SPSS (ورژن ۲۳) آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن (جهت مقایسه میان گروه‌ها) در سطح معناداری ۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفتند. جهت رسم نمودارها نیز نرم افزار EXCEL 2013 مورد استفاده قرار گرفت.

مراحل تهیه مقاطع بافتی جهت میکروسکوپ نوری

جهت بررسی سلول بافت از روش‌های متعددی می‌توان استفاده نمود از جمله: روش تجزیه، روش تهیه گسترده، تهیه قطعات ضخیم (که در مواردی که فوریتی در کار باشد از آن استفاده می‌گردد)، روش رنگ‌آمیزی حیاتی که رنگ در داخل سلول قابل مشاهده است و روش‌های برش بافتی، که بهترین روش است در این روش بافت را در محیط مخصوص قرار می‌دهند که هم بریدن بافت آسان گردد و هم اندکس انکساری بافت را بالا ببرد. متد پارافین شایع‌ترین است ولی سلوئیدین و ژلالینی هم مورد استفاده قرار می‌گیرد. لام‌های تهیه شده پس از ۷۲ ساعت کاملاً خشک شده و سپس زیر میکروسکوپ نوری مدل (NIKON) گذارده شدند و با بزرگ‌نمایی ۴۰ مورد مطالعه قرار گرفتند[۱۶].

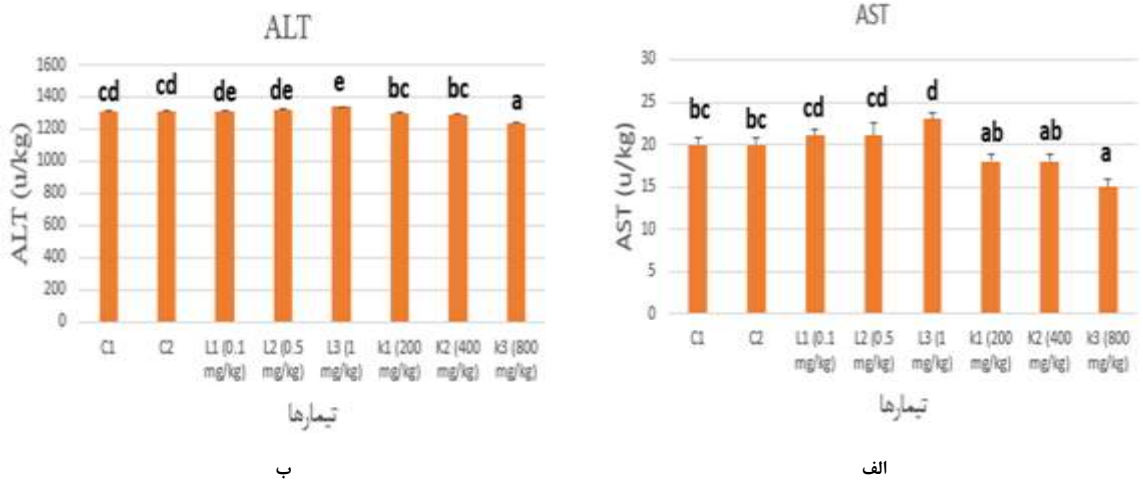
مراحل تهیه گرید میکروسکوپ الکترونی(TEM)

ابتدا نمونه‌های کبد با استفاده از پنس و اسکالپل جدا گردید و در زیر هود در محلولی از گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد از ابعاد کوچکتر از ۰/۵ برش زده شد. سپس مراحل زیر جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی بر روی هر یک از نمونه‌ها صورت گرفت. پس از آماده شدن گرید نمونه‌های کبدی جهت رنگ‌آمیزی برای بالا بردن کنتراست، هرکدام را جداگانه در چاهک‌های مخصوص اورانیل استات به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق غوطه ور کرده و سپس آن‌ها را با پنس گرفته و با آب مقطر شستشو داده شدند در انتها نیز گریدها با میکروسکوپ الکترونی مدل EM208S PHILIPS با ولتاژ ۷۰ کیلوولت و با مش مسی ۲۰۰ مورد مطالعه قرار گرفتند[۱۷].

۳.نتایج

نتایج حاصل از آنزیم کبدی AST

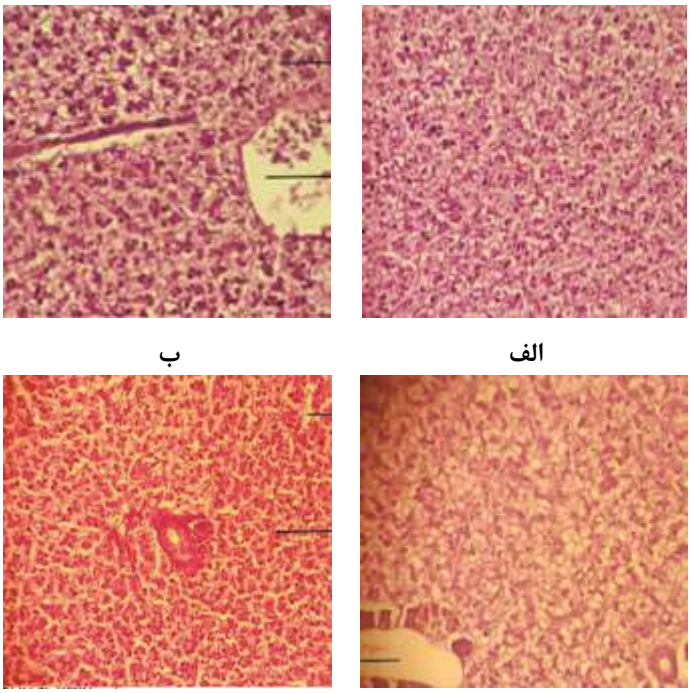
نتایج حاصل از آنزیم AST نشان داد که میان گروه‌های کنترل اختلاف معنادار وجود نداشت($P\geq ۰/۰۵$). همچنین میان گروه کنترل و خرفه با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم و همین طور لتروزول با دوز ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف معنادار وجود نداشت($P\geq ۰/۰۵$). نتایج حاصل از تیمار خرفه با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم و لتروزول با دوز ۱ میلی‌گرم برکیلوگرم اختلاف معنادار با گروه‌های دیگر را نشان داد($P\leq ۰/۰۵$). نتایج حاصل از آنزیم ALT نشان داد که میان گروه‌های کنترل و تیمار خرفه با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و لتروزول با دوز ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف معنادار وجود ندارد($P\geq ۰/۰۵$). ولی تیمار خرفه با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و لتروزول با دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف معنادار با سایر گروه‌ها دارند($P\leq ۰/۰۵$).



نمودار ۱. الف: آنزیم کبدی AST. ب: آنزیم کبدی ALT (حروف مشابه به معنای عدم وجود اختلاف در سطح معناداری ۰/۰۵ می‌باشد).

بافت شناسی کبد با میکروسکوپ نوری

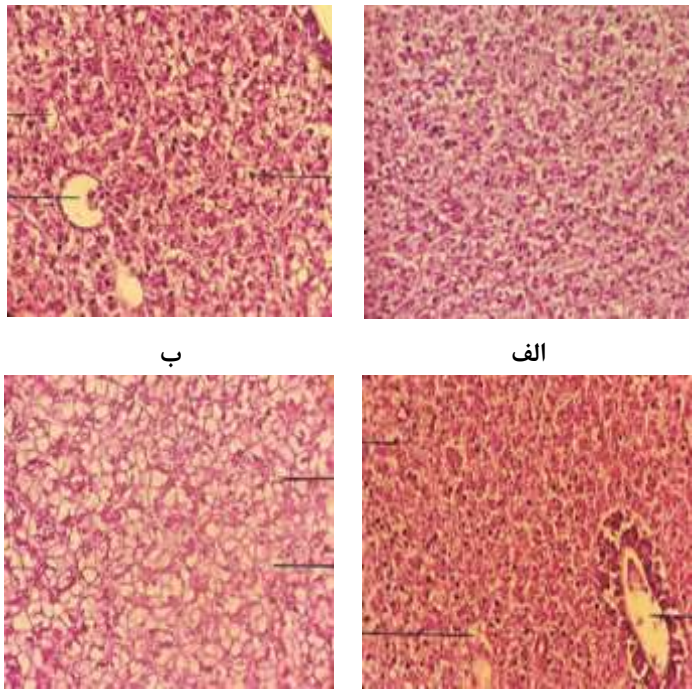
در مقطع بافت کبد ماهی کنترل دست نخورده، هپاتوسیت‌ها از یک روند نرمال برخوردار بودند. در مقطع بافت کبد ماهی تیمار لتروزول با دوز ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم، هپاتوسیت‌ها و سینوزوییدها از یک روند نرمال برخوردار بودند در مقطع بافت کبد ماهی تیمار لتروزول با دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، افزایش سلول‌های چربی مشاهده شد. در مقطع بافت کبد ماهی تیمار لتروزول با دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تفاوت محسوسی از نظر هایپرتروفی هپاتوسیت‌ها و افزایش فضای سینوزوئیدی وجود داشت. در مقطع بافت کبد ماهی تیمار خرفه با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، اختلاف محسوسی از نظر هپاتوسیت‌ها و سینوزوئیدها وجود نداشت. در مقطع بافت کبد ماهی تیمار خرفه با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، اختلاف محسوسی از نظر هپاتوسیت‌ها و سینوزوئیدها وجود نداشت. در مقطع بافت کبد ماهی تیمار خرفه با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، اختلاف محسوسی از نظر هپاتوسیت‌ها و سینوزوئیدها وجود نداشت.



الف ب

د ه

الف: مقطعی از بافت کبد ماهی کنترل دست نخورده. ب: مقطعی از بافت کبد ماهی تیمار لتروزول با دوز ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم. ج: مقطعی از بافت کبد ماهی تیمار لتروزول با دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم. د: مقطعی از بافت کبد ماهی تیمار لتروزول با دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم (H&E) با بزرگ نمایی 400 ×.



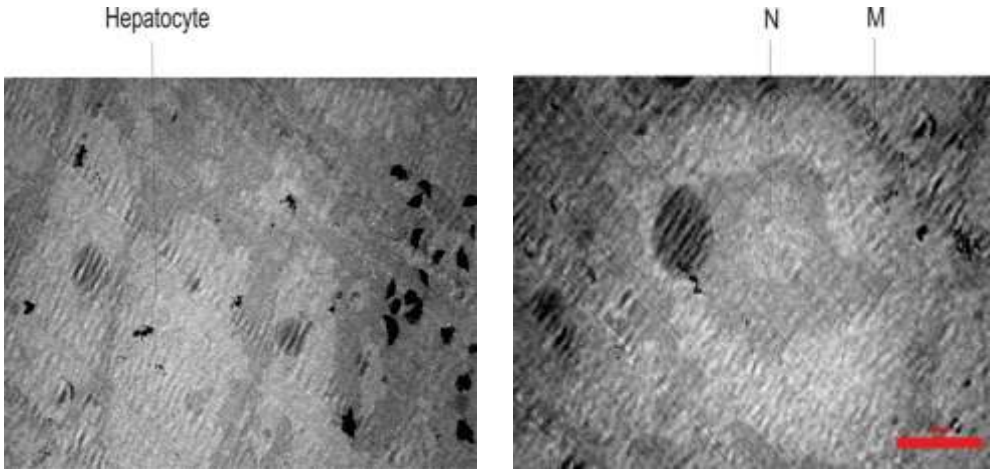
الف **ب**

د **ه**

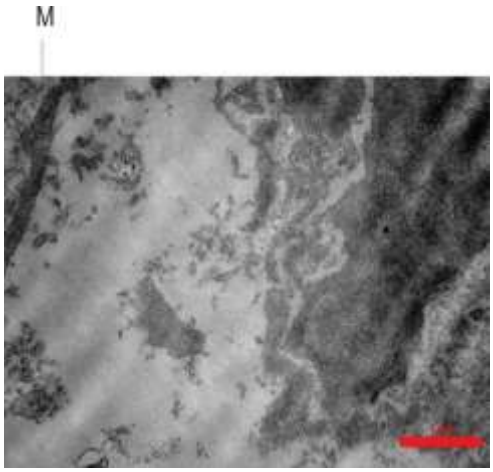
الف: مقطعی از بافت کبد ماهی کنترل دست نخورده، ب: مقطعی از بافت کبد ماهی تیمارخرفه با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم. ج: مقطعی از بافت کبد ماهی تیمارخرفه با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم. د: مقطعی از بافت کبد ماهی تیمارخرفه با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم (H&E) با بزرگ نمایی 400 ×.

بافت شناسی کبد با میکروسکوپ الکترونی

در تصویر میکروسکوپی از کبد گروه کنترل دست نخورده ساختار اصلی درون سلول و هسته مشاهده شد. در تصویر میکروسکوپی کبد تیمار خرفه با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم سلول‌های هپاتوسیت به صورت منسجم مشاهده شد. در تصویر میکروسکوپی کبد تیمار لتروزول با دوز ۱ میلی‌گرم برکیلوگرم نشان دهنده آسیب به بافت غشاء و ساختار درونی هپاتوسیت‌ها بود.



ب الف



ج

الف: تصویر میکروسکوپ الکترونی از سلول‌های کبدی در کنترل دست نخورده در این تصویر هسته سلول (N) و غشاء سلول (M) مشخص شده است. ب: تصویر میکروسکوپی از سلول‌های کبدی در تیمار خرفه با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم. ج: تصویر میکروسکوپی از سلول‌های کبدی در تیمار لتروزول با دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم در این تصویر غشاء سلول کبدی (M) و ارگانل‌های درون سلولی مشخص شده است (Scale Bar 4 µm).

۴.بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم های ALT و AST

بررسی نتایج حاصل از آنزیم‌های کبدی در تیمار دست نخورده و تزریق با نرمال سالین اختلاف معنی‌داری را نشان نداد($P\geq ۰/۰۵$). همچنین میان گروه کنترل و خرفه با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم و همین طور لتروزول با دوز ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف معنادار وجود نداشت. نتایج حاصل از تیمار خرفه با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم و لتروزول با دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف معنادار با گروه‌های دیگر را نشان داد($P\leq ۰/۰۵$). افزایش سطح آنزیم‌های کبدی در یک درصد زنان تحت درمان با لتروزول گزارش شده که به ندرت نیاز به تنظیم دوز دارند. افزایش آنزیم‌های کبدی در افراد تحت درمان با لتروزول بدون نشانه و خود محدود شونده است. گزارشات محدودی مبنی بر صدمات کبدی مرتبط با لتروزول گزارش شده است. بر خلاف دیگر مهارکننده های آروماتاز مثل آناسترازول و اگزمستان که افزایش آنزیم‌های کبدی را در طول ۱ تا ۴ ماه نشان می‌دهند. هیچ نمونه‌ای از آسیب کبدی حاد و هپاتیت مزمن و سندرم از بین رفتن مجرای صفراوی مرتبط با لتروزول وجود نداشته است. در مطالعه‌ای زارعی و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر عصاره گیاه خرفه را بر میزان غلظت آنزیم‌های کبدی شامل آسپارتات آمینو ترانسفراز (SGOT یا AST)، آلانین آمینو ترانسفراز (SGPT یا ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در موش‌های صحرایی هیپرکلسترولمی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد میزان آنزیم‌های ALT و ALP در گروه‌های دریافت کننده عصاره خرفه کاهش یافت. بنابراین مطالعات قبلی و نتایج این پژوهش نشان می‌دهد عصاره گیاه خرفه علاوه بر تأثیر بر کاهش چربی خون از طریق کاهش کلسترول و افزایش HDL می‌تواند با کاهش ALT، ALP،AST در بهبود عملکرد کبد موثر می‌باشد[۴].

بررسی نتایج بافت شناسی کبد با میکروسکوپ نوری

نتایج حاصل از بافت‌شناسی کبد نشان داد که با افزایش دوز تفاوت محسوسی از نظر افزایش فضای سینوزوئیدی بین گروه کنترل و تیمارها وجود داشت و این تفاوت با افزایش دوز در تیمار لتروزول با دوز ۱ میلی‌گرم برکیلوگرم محسوس‌تر مشاهده شد. در تیمار خرفه تفاوت محسوسی بین گروه‌های کنترل و تیمار وجود نداشت. گیاه خرفه با داشتن آنتی اکسیدان‌های فراوان و چربی‌های امگا ۳ و امگا ۶ باعث مهار پروکسیداسیون‌های لیپیدها می‌شود و این ویژگی با شکستن ساختار اکسید کننده موجود توسط سیتوکروم P450 و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد اعمال می‌شود. بنابراین با توجه به ویژگی آنتی اکسیدانی گیاه خرفه، کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی و بهبود فعالیت کبد قابل پیش بینی است[۱۴].

نتایج بافت شناسی کبد با میکروسکوپ الکترونی

در کبد شاهد ساختار اصلی درون سلول دیده می‌شود. هسته نیز مشاهده می‌شود. در کبد تیمار لتروزول با دوز ۱ میلی‌گرم برکیلوگرم غشاء هپاتوسیت و ساختارها و ارگانل‌های درون سلول تقریباً آسیب دیده‌اند. گسستگی در اندامک‌ها اتفاق افتاده و واکوئول‌هایی هم مشاهده می‌شود. که این نشان‌دهنده آسیب لتروزل به بافت کبد در دوز بالا است. در کبد تیمار خرفه با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سلول‌های هپاتوسیت کاملا منسجم در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند و هسته در برخی به طور واضح دیده می‌شود. که نشان دهنده اثر محافظتی خرفه بر بافت کبد است.

۵.نتیجه‌گیری

همچنین با توجه به نتایج میکروسکوپ نوری و الکترونی بافت کبد اثرات تخریبی لتروزول و اثرات حفاظتی خرفه بر کبد و با توجه به کاهش معنادار آنزیم‌های کبدی در خرفه با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم و افزایش معنادار آنزیم‌های کبدی در لتروزول با دوز ۱ میلی‌گرم برکیلوگرم نسبت به گروه شاهد میتوان نتیجه گرفت که از این گیاه می‌توان در تولید داروی گیاهی جایگزین داروی لتروزول استفاده نمود.

۶.قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از پرسنل آزمایشگاه علوم پایه دانشکده داروسازی دانشگاه آزاد اسلامی تشکر و قدردانی می نمایند.

۷. منابع

۱. *Yarpuzlu B, Ayyildiz M, Tok OE, Aktas RG, Basdogan C. Correlation between the mechanical and histological properties of liver tissue. journal of the mechanical behavior of biomedical materials. 2014 Jan 1;29:403-16.*

۲. *Van der Plaats A, Maathuis MH, t Hart NA, Bellekom AA, Hofker HS, Van Der Houwen EB, Verkerke GJ, Leuvenink HG, Verdonck P, Ploeg RJ, Rakhorst G. The Groningen hypothermic liver perfusion pump: functional evaluation of a new machine perfusion system. Annals of biomedical engineering. 2006 Dec;34(12):1924-34.*

۳. *Miladi-Gorji H, Vafaei AA, Bageri A. To investigate the effect of Portulaca oleracea L. and Melissa officinalis L. extract on sleeping time in mice. Journal of Medicinal Plants. 2011 May 10;10(38):95-101.*

٤. *Zarei A, Changizi-Ashtiyani S, Rezaei A, Sheidaee H, Nabiyoni F. The Effect of Chelidonium majus extract on the lipid profile and activity of pituitary-gonadal axis in hypercholesterolemic rats. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2014 Oct 31;16(10).*

٥. *Dorland WA. Dorland's medical dictionary. WB Saunders Company; 1980.*

٦. *Hoseini E. Forouzan far M, Paye dar A. The effect of hydroalcoholic extract of purslane (Portulaca oleracea L) on serum concentration of esterogen, progesterone, prolactin and gonadotropins in mature female rats. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013;15(5):12-21.*

۷. *Perry S.F, Bernier N.G.The Aquacultureal adrenergic stress response in fish: facts and fiction. Aquaculture 1999;177:258-95.*

۸. آکارول، ن. ک. تولید مثل ماهیان. ترجمه عیسی کمالی، تورج ولی نسب. تهران: انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۱۹۹۶. صص. ۱-۳.

۹. بنایی، م. زیست شناسی و فیزیولوژی ماهی ها. شیراز: انتشارات ارم، ۱۳۹۲. صص. ۵۵-۶۹.

۱۰. *Changizi Ashtiyani S, Zarei A. The effects of Physalis alkekengi alcoholic extract on certain plasma biochemical factors in rats. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2011 Nov 10;14(5):18-25.*

۱۱. *Ikhajiangbe Happy IN, Ezejindu DN, Akingboye AJ. Hepatoprotective effects of Portulaca oleracea on liver enzymes of potassium bromate induced hepatotoxicity in adult wistar rats. Int J Med Med Sci. 2014;1(3):26-31.*

۱۲. *Omidi Ha, Omidi He, Naghdi Badi H. The Effect of Pistacia atlantica nut powder on liver phosphadidate phosphohydrolase and serum lipid profile in rat. J Med Plants 2008;7(26):70-8.*

۱۳. *Sharma A, Vijayakumar M, Rao CV, Unnikrishnan MK, Reddy GD. Action of Portulaca oleracea against streptozotocin-induced oxidative stress in experimental diabetic rats. Journal of Complementary and Integrative Medicine. 2009 Jan 5;6(1).*

۱٤. *Xio FY, Lu FE, Xu J. Mechanism of different parts of Portulaca oleracea in ameliorating lipid metabolic disorder in type 2 diabetic rats. Chine J Clin Rehabil. 2004;8(24):5042-4.*

۱٥. *El-Sayed MI. Effects of Portulaca oleracea L. seeds in treatment of type-2 diabetes mellitus patients as adjunctive and alternative therapy. Journal of ethnopharmacology. 2011 Sep 1;137(1):643-51.*

۱۶. مقدسی، غلامرضا. هیستو تکنیک (روش تهیه و آماده کردن برش در بافت شناسی جانوری). مجله آموزش در علوم پزشکی، سال ۲۴، شماره ۳، ۱۳۹۰: ۱۹–۲۳.

۱۷. *Wang HY, Weng CF, Tu MC, Lee SC. Synchronization of plasma sexual steroid concentrations and gonadal cycles in the sleeper, Eleotris acanthopoma. Zoological studies -TAIPEI-. 2001 Jan 1;40(1):14-20.*