مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی نوزدهم، شماره‌ی ۶، صفحه‌های ۴۱۸ ـ ۴۱۰ (بهمن ـ اسفند ۱۳۹۶)

مقاله‌ی پژوهشی

بررسی اثر ترکیب عصاره‌های گیاهان خار مریم، کنگر فرنگی و عناب بر کبد چرب غیرالکلی در موش‌های صحرایی

مژگان محمدی‌فر[۱]، محمد بهنام[۲]، دکتر سید علیرضا طلائی[۲]، دکتر طاهره خامه چیان[۳]، دکتر مهدی مهران[٤]،دکتر محسن تقی زاده[۱]

۱) مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، ۲) مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، ۳) گروه آسیب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، ٤) مرکز تحقیقات گیاهان دارویی شرکت داروسازی باریج اسانس، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول:** کاشان، بلوار قطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک. دکتر محسن تقی‌زاده؛ e-mail: taghizadeh_m@kaums.ac.ir

چکیده

مقدمه: کبد چرب غیرالکلی از آسیب‌های مزمن کبدی است که شیوع آن در جهان رو به افزایش است. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر عصاره‌ی ترکیبی گیاهان خارمریم، کنگرفرنگی و عناب بر کبد چرب غیرالکلی ناشی از به کارگیری رژیم پرچرب در موش‌های صحرایی بود. مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، ۴۰ سر موش صحرایی نر به صورت تصادفی به گروه-های شاهد (۸ سر) و تغذیه با رژیم پرچرب (۳۲ سر) تقسیم شدند. پس از ۴ ماه تغذیه با رژیم پرچرب، موش‌های مبتلا به کبد چرب به ۴ گروه ۸ تایی شامل گروه تغذیه با رژیم پرچرب و ۳ گروه دریافت‌کننده‌ی عصاره با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تقسیم و به مدت ۲ ماه تحت تیمار با عصاره قرار گرفتند. در پایان پروفایل لیپیدی، فعالیت آنزیم‌های کبدی در سرم و هیستولوژی کبد مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها: تغذیه با رژیم پرچرب توانست مقادیر کلسترول، تری‌گلیسرید و کلسترول ـ LDL را افزایش و میزان کلسترول ـ HDL را کاهش دهد (P<۰/۰۰۱). هم‌چنین، رژیم پرچرب میزان فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالن فسفاتاز را به میزان ۸۴، ۱۱۳ و ۲۲۸ درصد افزایش داد (P<۰/۰۰۱). دریافت عصاره با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، موجب بهبود وضعیت لیپیدها (P<۰/۰۵) و کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی (P<۰/۰۵) شد. یافته‌های آسیب‌شناسی کبد، تغییرات ناشی از رژیم پرچرب و درمان با عصاره را تایید کرد. نتیجه‌گیری: تغذیه با رژیم پرچرب سبب ایجاد کبد چرب غیرالکلی می‌شود و تیمار با عصاره‌ی ترکیبی گیاهان خارمریم، کنگرفرنگی و عناب سبب بهبود شاخص‌های این بیماری می‌گردد.

واژگان کلیدی: خارمریم، کنگرفرنگی، عناب، کبدچرب غیرالکلی، رژیم پرچرب

دریافت مقاله: ۹۶/۵/٤ـ دریافت اصلاحیه: ۹۶/۹/۱۲ ـ پذیرش مقاله: ۹۶/۱۰/۲

مقدمه

کبد چرب غیرالکلی طیفی از آسیب‌های کبد است که از استئاتوز اولیه تا استئاتوهپاتیت (NASH) و سیروز کبد را شامل می‌شود.[۱] اگر چه پاتوژنز این بیماری به طور کامل مشخص نیست اما نقش مکانیسم‌های متعددی از جمله اختلال در متابولیسم لیپیدها، مقاومت به انسولین و استرس اکسیداتیو در بروز استئاتوز ثابت شده‌است.[۲] به نظر می‌رسد که تجمع تری‌گلیسرید در کبد، باعث افزایش حساسیت هپاتوسیت‌ها به سایتوکاین‌ها، اختلال در عملکرد میتوکندری، استرس اکسیداتیو و تبدیل استئاتوز به استئاتوهپاتیت می-شود.[۳] علی‌رغم این که کبد چرب می‌تواند به نارسایی مزمن کبد تبدیل شود، هنوز درمان مناسبی برای آن پیدا نشده - است. رویکرد اولیه در درمان کبد چرب، اصلاح سبک زندگی و افزایش حساسیت به انسولین از طریق اصلاح رژیم غذایی و فعالیت‌های ورزشی است.[٤] داروهای گیاهی با داشتن

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.16834844.1396.19.6.2.8]

ترکیبات ضد التهاب و آنتی‌اکسیدان می‌توانند در بهبود بیماری‌های کبدی مؤثر باشند.[۵] امروزه گیاهان بسیاری با خاصیت حفاظت کبدی شناخته شده‌اند. خارمریم، کنگرفرنگی و عناب از جمله این گیاهان هستند.

خار مریم (*Silybum Marianum* L.) گیاهی است که از آن به عنوان افزایش‌دهنده‌ی جریان صفرا یاد می‌کنند.[۶] عصاره‌ی خار مریم شامل مواد شیمیایی متنوعی از جمله فلاولیگنان‌ها است که در مجموع سیلیمارین نامیده می‌شوند.[۷] سیلیمارین مخلوطی از فلاوونوئیدها است که اثرات محافظت کبدی و آنتی‌اکسیدانی آن به اثبات رسیده است.[۸] سیلیمارین در درمان مسمومیت‌های کبدی و بیماری‌های مزمن کبدی موثر بوده‌است.[۹،۱۰] کنگر فرنگی (*Cynara scolymus* L.) به عنوان کاهنده‌ی چربی و قند خون شناخته می‌شود.[۱۱] کنگرفرنگی می‌تواند سطح لیپید و کلسترول پلاسما را کاهش دهد.[۱۲] این تاثیر می‌تواند ناشی از دو عملکرد کنگرفرنگی باشد. اول این که این گیاه می‌تواند جریان صفرا را افزایش دهد و موجب افزایش دفع اسیدهای صفراوی شود.[۱۱] دوم این که کنگر فرنگی به صورت غیرمستقیم سنتز کلسترول را مهار می‌کند؛ در واقع این گیاه عوامل فعال‌کننده‌ی آنزیم HMG-CoA Reductase را مهار کرده و مسیرهای غیرفعال کننده این آنزیم را تحریک می‌کنند.[۱۳] از گیاهان دارویی دیگر می‌توان به عناب (*Ziziphus jujube* Mill.) اشاره کرد که در طب چینی از آن برای تقویت کبد استفاده می‌شده است.[۱۴] گزارش شده است، مواد فعال موجود در عناب با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ از تولید پروستاگلاندین‌ها جلوگیری می‌کنند و سبب کاهش التهاب می‌شوند.[۱۵] نشان داده شده است که عناب می‌تواند از کبد در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از کربن تتراکلرید محافظت کند.[۱۶]

همان‌طور که اشاره شد، هر کدام از سه گیاه خارمریم، کنگر فرنگی و عناب می‌توانند سبب بهبود عملکرد کبد و بیماری کبد چرب شوند.[۱۰،۱۳،۱۶] با این حال، هنوز مصرف هیچ کدام از آن‌ها به عنوان درمان موثر و کارامد برای بیماری کبد چرب مطرح نشده‌اند. در این مطالعه بر آن شدیم تا با ترکیب سه گیاه خارمریم، کنگر فرنگی و عناب یک فرمولاسیون مناسب برای درمان کبد چرب غیرالکلی بیابیم. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر ترکیب عصاره‌های هیدروالکلی گیاهان خارمریم، کنگر فرنگی و عناب بر شاخص‌های خونی و بافتی کبد در موش‌های صحرایی مبتلا به کبد چرب غیرالکلی انجام شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات: این مطالعه تجربی روی ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده‌ی وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام گرفت. حیوانات در حیوان‌خانه‌ی دانشگاه علوم پزشکی کاشان و تحت شرایط استاندارد با دمای ۲±۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۵±۵۵٪ و سیکل روشنایی ۱۲ ساعته نگه‌داری شدند. موش‌ها در طول مطالعه از نظر دسترسی به آب و غذا محدودیتی نداشتند. مطالعه‌ی حاضر با کد IR.KAUMS.REC.1395.138 در کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کاشان به تصویب رسیده است. در کار با حیوانات آزمایشگاهی تمامی اصول اخلاقی رعایت شد. حیوانات مورد استفاده در این پژوهش ابتدا وزن شدند و سپس به صورت تصادفی به شرح زیر گروه‌بندی شدند:

تعداد ۸ سر موش به عنوان گروه شاهد منفی در نظر گرفته شدند و بقیه موش‌ها تحت تیمار با یک رژیم پرچرب قرار گرفتند. چهار ماه بعد از شروع تغذیه با رژیم پرچرب، موش ها وزن شدند و سپس از دم موش‌ها خون‌گیری شد و شاخص‌های بیوشیمیایی در سرم آن‌ها سنجیده شد. هم‌چنین تعداد ۳ سر موش به‌طور تصادفی انتخاب شدند و پس از تهیه نمونه بافت کبد و بررسی آن توسط پاتولوژیست، القای کبد چرب در موش‌ها تایید شد. سپس موش‌های مبتلا شده به کبدچرب به ٤ گروه ۸ تایی تقسیم شدند: ۱-گروه تغذیه با رژیم پرچرب، ۲-گروه تغذیه با رژیم پرچرب و دریافت کننده عصاره با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش، ۳-گروه تغذیه با رژیم پرچرب و دریافت‌کننده‌ی عصاره با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن، ٤-گروه تغذیه با رژیم پرچرب و دریافت‌کننده‌ی عصاره با دوز ٤۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن. دوزهای مختلف عصاره به مدت ۲ ماه روزانه از طریق گاواژ تجویز شدند. جهت در نظر گرفتن استرس گاواژ، برای گروه شاهد هر روز آب مقطر تجویز شد.

تهیه غذای پرچرب: برای تهیه‌ی رژیم پرچرب، پودر غذای پایه‌ی جوندگان (۲۸ درصد)، کره (۲۸ درصد)، ساکاروز (١٤ درصد)، زرده‌ی تخم‌مرغ (۱۹ درصد) و سفیده‌ی تخم‌مرغ (۱۱ درصد) با هم مخلوط شدند. پودر حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در اوون ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک شد و به صورت پلیت در اختیار جوندگان قرار

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1396.19.6.2.8]

گرفت.[۱۷] رژیم پرچرب به صورت هفتگی ساخته و در یخچال نگه‌داری می‌شد.

تهیه و تجزیه‌ی عصاره: ابتدا بذر خارمریم، اندام هوایی کنگرفرنگی و میوه عناب پودر شدند و سپس توسط اتر نفت روغن‌گیری شد. عصاره‌گیری از هر گیاه با روش پرکولاسیون با اتانول ۷۰ درصد انجام شد. ترکیب حلال با پودر گیاه به مدت ٤٨ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس با استفاده از کاغذ صافی به میزان ۱ به ۱ حجمی، عصاره گرفته شد. عصاره به دست آمده تا غلظت ماده خشک ۵۰ درصد تحت خلا تغلیظ شد. جهت تجزیه‌ی عصاره‌ها، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از هر عصاره در ۱۰ میلی‌لیتر متانول حل شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول شفاف به دست آمده، پس از عبور از فیلتر ۰/٤٥ میکرون، سه مرتبه به دستگاه HPLC تزریق شد.[۸،۱۶،۱۸] عصاره‌های سه گیاه خارمریم، کنگر فرنگی و عناب به نسبت ۶۰:۲۰:۲۰ درصد با هم ترکیب شدند و سپس دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم از ترکیب آن‌ها تهیه شد.

جهت بررسی تاثیر عصاره‌ی ترکیبی بر موش‌های مبتلا به کبد چرب، شاخصه‌های بیوشیمیایی و بافتی کبد سنجیده شد.

سنجش شاخصه‌های بیوشیمیایی: جهت بررسی پروفایل لیپیدی، شامل میزان تری‌گلیسرید (TG)، کلسترول تام (TC)، لیپوپروتئین با دانسیته کم (LDL) و لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL) و میزان آنزیم‌های کبدی شامل آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالن فسفاتاز (AST، ALT و ALP)، طی دو مرحله، پیش از شروع دوره درمان با عصاره و در پایان مطالعه، از موش‌ها خون‌گیری به عمل آمد. به منظور تفکیک سرم، نمونه خون‌های به دست آمده، پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در آزمایشگاه، به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. عوامل ذکر شده با استفاده از آنزیم‌ها و کیت‌های تجاری سنجیده شدند.

بررسی پاتولوژی بافت کبد: پس از قربانی کردن حیوان (قطع سر)، لوب سمت چپ کبد موش‌ها به سرعت خارج شد و پس از شست و شو با نرمال سالین در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد. پس از ثبوت بافت، نمونه‌ها در دستگاه پاساژ بافت پردازش شدند و بلوک پارافینی تهیه شد. سپس برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر از بافت‌ها تهیه شد و با روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. لام‌های تهیه شده توسط پاتولوژیست و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

تغییرات بافتی بر اساس میزان تجمع چربی در کبد به این صورت درجه بندی شدند: صفر: بدون استئاتوز، یک: کمتر از ۲۵ درصد هپاتوسیت‌ها دچار استئاتوز هستند، دو: بین ۲٦ تا ۵۰ درصد هپاتوسیت‌ها دچار استئاتوز هستند، سه: بین ۵۱ تا ۷۵ درصد هپاتوسیت‌ها دچار استئاتوز هستند، چهار: بیش از ۷۵ درصد هپاتوسیت‌ها دچار استئاتوز هستند.

تحلیل آماری: داده‌های کمی حاصل از این مطالعه با نرم‌افزار آماری SPSS 21 و با آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و پس‌آزمون توکی تحلیل شدند. جهت تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. برای تحلیل داده‌های بافت‌شناسی از آزمون ناپارامتری کروسکال والیس استفاده شد. داده‌ها به صورت انحراف معیار از میانگین گزارش شدند و سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آنالیز عصاره‌ها: مقدار سیلیمارین در عصاره اتانولی خار مریم ۸/۸ درصد حجمی بود. هم‌چنین، مقدار کلروژنیک اسید در عصاره‌ی خشک کنگرفرنگی برابر ۲/۸ درصد حجمی به دست آمد. مقدار فنولیک تام در عصاره‌ی میوه عناب با ماده‌ی خشک ۵۰ درصد، ۰/۹ درصد بر حسب گالیک اسید محاسبه شد.

القای کبد چرب: دریافت رژیم پرچرب به مدت ٤ ماه توانست سطوح سرمی شاخص‌های تری‌گلیسرید (۷۱ درصد افزایش)، کلسترول تام (۵۰ درصد افزایش) و LDL (۲۳۳ درصد افزایش) را نسبت به گروه شاهد منفی افزایش دهد ($P<۰/۰۰۱$)، این درحالی‌است که میزان HDL در موش‌های دریافت کننده رژیم پرچرب نسبت به گروه شاهد منفی ۲۵ درصد کاهش یافت ($P<۰/۰۰۱$). مقادیر شاخص‌های بیوشیمیایی در موش‌های گروه شاهد منفی تغییر معنی‌داری نشان نداد ($P=۰/٤$). میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی (ALT، AST و ALP) با دریافت رژیم پرچرب به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<۰/۰۰۱$ نسبت به شاهد منفی). هم‌چنین، بررسی بافت کبد موش‌هایی که به صورت تصادفی از بین حیوانات دریافت‌کننده رژیم پرچرب انتخاب شده بودند، نشان داد که کبد چرب درجه ۲ در حیوانات ایجاد شده است.

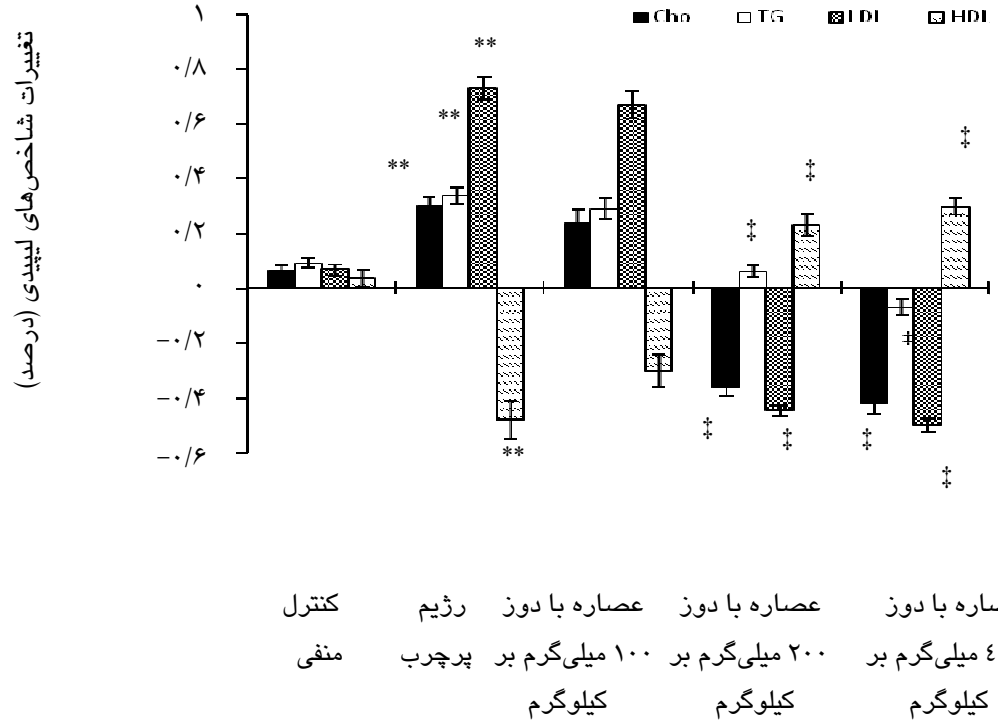
تغییرات وزن: دریافت رژیم پرچرب به مدت چهار ماه سبب شد که وزن حیوانات دریافت‌کننده‌ی این رژیم به طور میانگین ۷۷ درصد افزایش (از ۵±۲۲۰ به ٦±۳۹۵ گرم) یابد.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.16834844.1396.19.6.2.8]

این در حالی است که وزن موش‌های گروه شاهد تنها ۲۶ درصد افزایش یافت. تحلیل آماری نشان داد که اختلاف بین درصد افزایش وزن در دو گروه معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱). طی دو ماه بعد، وزن موش‌های گروه رژیم پرچرب از ۳۹۵ به ۵۱۰ گرم رسید (۳۰ درصد افزایش، P<۰/۰۰۱). دریافت عصاره با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم طی دو ماه باعث افزایش وزن حیوانات به میزان ۱۲ و ۸ درصد شد (P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه رژیم پرچرب).

تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی پس از دریافت عصاره: سطوح سرمی شاخص‌های تری‌گلیسرید، کلسترول و LDL در موش‌های دریافت‌کننده رژیم پرچرب در طی دو ماه تیمار با عصاره به میزان ۳۰، ۳۴ و ۷۳ درصد افزایش یافت (P<۰/۰۰۱). هم‌چنین، مقدار HDL در این گروه از موش‌ها ۴۸ درصد کاهش یافته بود (P<۰/۰۰۱). دریافت عصاره با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب کاهش معنی‌دار شاخص‌های Chol ، TG و LDL و افزایش مقدار HDL در گروه‌های درمانی شد (P<۰/۰۵). این در حالی است که دریافت دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره نتوانست پروفایل لیپیدی موش‌های دریافت‌کننده رژیم پرچرب را بهبود بخشد (P=۰/۲) (نمودار ۱).

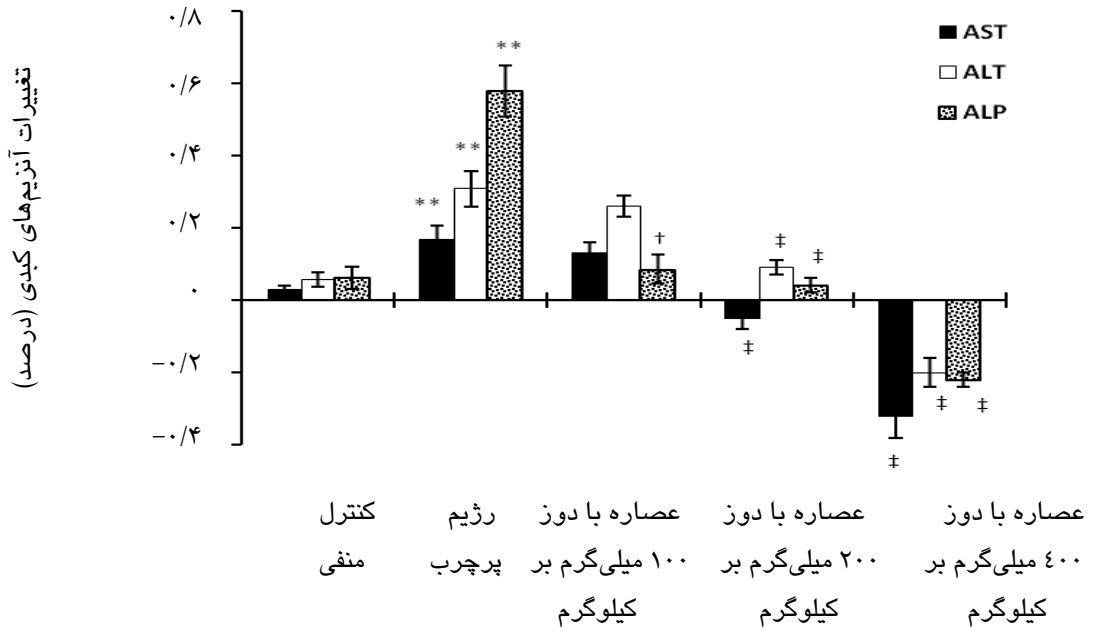


نمودار ۱- درصد تغییرات شاخصه‌های لیپیدی (Chol، TG، LDL و HDL) در سرم موش‌های صحرایی.

مقادیر به صورت میانگین± انحراف استاندارد از میانگین گزارش شده است. ** اختلاف معنی‌دار بین میانگین شاخص‌های Chol، TG، LDL و HDL نسبت به گروه شاهد پیش و پس بعد از دوره تیمار با عصاره (P<۰/۰۰۱)، ‡ اختلاف معنی‌دار بین شاخص‌های Chol، TG، LDL و HDL پیش و پس از دوره تیمار با عصاره (P<۰/۰۰۱)

همان‌طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی (ALT، AST و ALP) در سرم موش‌های تغذیه شده با رژیم پرچرب در طی زمان مداخله با عصاره، افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۱).

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1396.19.6.2.8]



نمودار ۲- درصد تغییرات فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP در سرم موش‌های صحرایی.

مقادیر به صورت میانگین± انحراف استاندارد از میانگین گزارش شده است. ** اختلاف معنی‌دار بین میانگین فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP نسبت به گروه شاهد پیش و پس از دوره تیمار با عصاره (P<۰/۰۰۱)، † اختلاف معنی‌دار بین میانگین فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP پیش و پس از دوره تیمار با عصاره (P<۰/۰۵)، ‡ اختلاف معنی‌دار بین میانگین فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP پیش و پس از دوره تیمار با عصاره (P<۰/۰۰۱)

تجویز دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره نه تنها مانع افزایش میزان فعالیت آنزیم‌ها شد، بلکه سبب کاهش سطح فعالیت آنزیمی شد (P<۰/۰۰۱). تجویز عصاره در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی نسبت به گروه پرچرب شد (P<۰/۰۰۱). مصرف دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره، بر میزان آنزیم‌های آمینوترانسفراز تاثیر معنی‌داری نداشت، اما سبب کاهش میزان آنزیم آلکالن فسفاتاز نسبت به گروه تغذیه با رژیم پرچرب شد (P<۰/۰۵). نتایج تحلیل آماری نشان داد که دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره نسبت به دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در کاهش مقادیر آنزیم‌های کبدی موثرتر است (P<۰/۰۵).

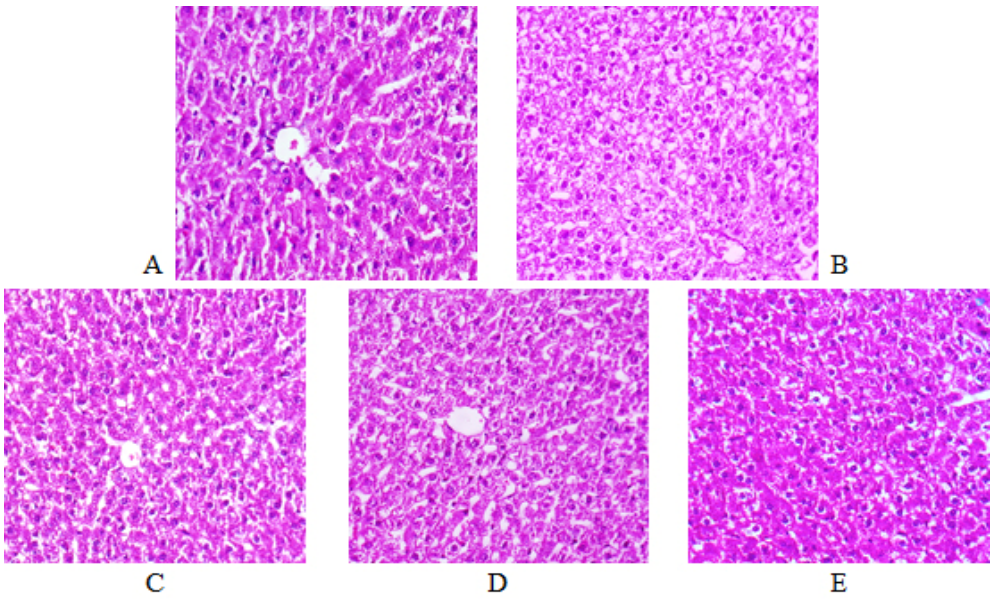
تغییرات پاتولوژی بافت کبد: بررسی‌های میکروسکوپی نشان دادند که بافت کبد در موش‌های گروه شاهد ساختاری طبیعی دارد (جدول و شکل ۱).

جدول ۱- تاثیر عصاره گیاهان خار مریم، کنگرفرنگی و عناب بر درجه استئاتوز کبد در موش های صحرایی

گروه‌ها	درجات استئاتوز کبد					P
	۰	۱	۲	۳	۴	
شاهد	۷	۱	۰	۰	۰	
رژیم پرچرب	۰	۲	٤	۱	۱	a
عصاره با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم	۰	۳	۳	۲	۰	a
عصاره با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم	۰	٤	٤	۰	۰	bc
عصاره با دور ۴۰۰ میلی‌گرم	۱	٦	۲	۰	۰	bc

ارقام نشان‌دهنده تعداد موش‌ها برای هر درجه از استئاتوز می‌باشد. a: P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه شاهد؛ b: P<۰/۰۵ نسبت به گروه رژیم پرچرب؛ c: P<۰/۰۵ نسبت به سایر گروه‌های دریافت‌کننده عصاره.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1396.19.6.2.8]



شکل ۱- نمای ریزبینی از بافت کبد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگ‌نمایی×۴۰). A) گروه شاهد: هپاتوسیت‌ها و ساختار بافت کبد طبیعی می‌باشد. B) گروه دریافت‌کننده رژیم پرچرب: تشکیل واکوئل‌های چربی C) گروه دریافت‌کننده رژیم پرچرب و عصاره با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم: تغییر چربی کبد نسبت به گروه رژیم پرچرب معنی‌دار نیست. D) گروه دریافت‌کننده رژیم پرچرب و عصاره با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم: کاهش واکوئل‌های چربی. E) گروه دریافت‌کننده رژیم پرچرب و عصاره با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم: بافت کبد طبیعی بوده و به جز واکوئل‌های ریز چربی در برخی هپاتوسیت‌ها تغییر پاتولوژیک دیگری دیده نمی‌شود.

این در حالی است که رژیم پرچرب، سبب تجمع چربی در هپاتوسیت‌ها به صورت واکوئل های ریز و درشت شد (P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه شاهد). اگرچه دریافت عصاره در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تاثیر معنی‌داری بر استئاتوز بافت کبد نداشت (P=۰/۳)، اما دریافت دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره سبب کاهش تعداد واکوئل‌های چربی و درجه استئاتوز در موش‌ها شد (P<۰/۰۵). میزان التهاب بافتی و ارتشاح سلولی نیز در موش‌های رژیم پرچرب نسبت به گروه شاهد افزایش داشت و دریافت عصاره در دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب کاهش معنی‌دار این شاخص‌ها شد (P<۰/۰۵).

بحث

کبد چرب با تجمع چربی در سلول‌های کبدی و استئاتوز آغاز می‌شود و در نهایت می‌تواند به استئاتوهپاتیت و آسیب بافت کبد منجر شود. استئاتوز کبدی می‌تواند ناشی از اختلال در مسیرهای متابولیسم لیپیدها باشد و به دلیل عدم تعادل در تولید و تجزیه لیپیدها ایجاد شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مصرف رژیم پرچرب می‌تواند سبب اختلال در متابولیسم لیپیدها و افزایش میزان TG، Chol، LDL و HDL در سرم موش‌های صحرایی شود که این یافته با مطالعات قبلی همسو است.[۱۹،۲۰] از نشانه‌های آسیب بافت کبد می‌توان به افزایش فعالیت سرمی آنزیم‌های ALT، AST و ALP اشاره کرد.[۲۱] در این مطالعه، دریافت رژیم غذایی پرچرب توانست موجب افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در سرم حیوانات شود. برای ایجاد بیماری کبد چرب در حیوانات آزمایشگاهی، روش‌های مختلفی از جمله دستکاری‌های ژنتیکی، استفاده از رژیم‌های بدون کولین و متیونین و استفاده از رژیم پرچرب وجود دارد که مورد آخر معتبرترین مدل برای ایجاد کبد چرب در حیوانات است.[۲۲] در مطالعه‌ی امامت و همکارانش که رژیم مورد استفاده در این پژوهش را معرفی کرده‌اند، گزارش شده است که مصرف این رژیم نه تنها باعث ایجاد استئاتوهپاتیت غیرالکلی در موش‌های صحرایی می‌شود، بلکه سایر مشخصه‌های متابولیک دخیل در بیماری کبد چرب در انسان را نیز ایجاد می‌کند.[۲۰]

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1396.19.6.2.8]

برای بررسی اثر عصاره‌ی گیاهان خارمریم، کنگرفرنگی و عناب، سه دوز از این عصاره به صورت پاسخ به دوز تهیه و گاواژ شدند. دریافت این عصاره در دوزهای ۲۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب بهبود نشان‌گرهای بیوشیمیایی در موش‌های مبتلا به کبد چرب شد.

بررسی‌های بافت شناسی روی بافت کبد مؤید این نکته است که رژیم پرچرب سبب ذخیره چربی در هپاتوسیت‌ها و ایجاد کبد چرب غیر الکلی می‌شود. علاوه بر این، تجمع سلول‌های التهابی در کبد نشان‌دهنده‌ی التهاب بافتی ایجاد شده در اثر دریافت رژیم پرچرب است. دریافت عصاره‌ی گیاهان خارمریم، کنگرفرنگی و عناب توانست سبب کاهش استئاتوز در هپاتوسیت‌ها شود و التهاب ایجاد شده در بافت کبد را بهبود بخشد. در مطالعات انجام شده، نشان داده شده است که هر یک از سه گیاه خارمریم، کنگرفرنگی و عناب دارای توانایی حفاظت از بافت کبد هستند.[۹،۱۱،۱٦] با این وجود، هیچ کدام از آن‌ها به عنوان یک داروی کارآمد در درمان کبد چرب شناخته نمی‌شوند. هدف از این مطالعه، دستیابی به یک فرمولاسیون مناسب برای درمان کبد چرب بود. نتایج مطالعه‌ی همراستا با مطالعات قبلی، نشان‌دهنده‌ی تاثیر گیاهان خارمریم، کنگرفرنگی و عناب بر بهبود بیماری کبد چرب است. این اثر هپاتوپروتکتیو را می‌توان به وجود میزان بالای آنتی‌اکیسدان‌ها در این گیاهان مربوط دانست.

دانه‌ی خار مریم، دارای ٤ تا ٦ درصد و عصاره این گیاه حاوی ٦۵ تا ۸۰ درصد سیلیمارین است.[۲۳،۲٤]سیلیمارین یک مخلوط فنولی استاندارد استخراج شده از خارمریم است و آثار متعددی از جمله اثر ضدالتهابی، قابلیت حفاظت سلولی، آنتی‌کارسینوژنیک دارد؛[۲۵] از بین آثار فارماکولوژی، قابلیت حفاظت از سلول‌های کبدی سیلیمارین بیش از سایر خواص مورد توجه است.[۲٦] این اثر می‌تواند از طریق مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی مختلفی، از جمله مهار پراکسیداسیون چربی، تحریک RNA پلی‌مراز ریبوزومی، محافظت از هپاتوسیت‌ها در برابر توکسین‌ها، مهار سایتوکین‌هایی مانند TNF-α (فاکتور نکروز دهنده تومور-آلفا)، اعمال شود.[۸] گزارش شده است سیلیمارین می‌تواند استرس اکسیداتیو تولید شده در موش‌های تغذیه‌کننده با سوکروز را مهار کرده و الگوی کلسترول و لیپوپروتئین‌های پلاسما را بهبود بخشد.[۲۷]

ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی کنگرفرنگی یکی از بالاترین موارد گزارش شده در گیاهان است. مشتقات کافئیک اسید از جمله کلروژنیک اسید و سینارین ماده موثره موجود در کنگرفرنگی است. در مطالعه‌ای، ۳۰ بیمار زن و مرد مبتلا به دیابت نوع ۲ بیسکویت گندم حاوی پودر کنگر فرنگی را مصرف کردند. نتایج مطالعه، نشان‌گر کاهش قابل توجه قندخون و بهبود پروفایل لیپیدی در گروه درمانی بود.[۲۸] در یک مطالعه‌ی دیگر، نشان داده شد که عصاره‌ی کنگرفرنگی می‌تواند سبب افزایش جریان صفرا شود. به‌علاوه، محققین بیان کرده‌اند که اگرچه عصاره‌ی کنگرفرنگی قادر به حفاظت از کبد در برابر CCl4 است، اما کلروژنیک اسید و سینارین هر یک به تنهایی نمی‌توانند از آسیب کبدی ناشی از CCl4 جلوگیری کنند.[۲۹] این در حالی است که در مقاله دیگری بیان شده است، سینارین فعالیت هپاتوپروتکتیو قابل توجهی را در محیط برون‌تنی در مقابل کربن تترا کلرید نشان می‌دهد.[۳۰]

گزارش شده است که عناب به دلیل داشتن مقادیر بالای ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند اثر آنتی‌آتروژنیک داشته باشد و از بروز عوارض قلبی در موش‌های مبتلا به دیابت جلوگیری کند.[۳۱] ترکیبات فنولی هم‌چون کلروژنیک اسید، کافئیک اسید و کاتچین، بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان موجود در عناب را تشکیل می‌دهند.[۳۲] در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شد که مصرف روزانه ۱۵ گرم عناب به مدت یک ماه اگرچه بر نمایه‌ی توده‌ی بدنی کودکان اثری نمی‌گذارد، اما می‌تواند سبب کاهش میزان کلسترول سرم شود و پروفایل لیپیدی را بهبود بخشد.[۳۳] علاوه بر این، عناب می‌تواند موجب کاهش مقاومت به انسولین و مهار واسطه‌های التهابی، از جمله نیتریک اکساید و پروستاگلاندین‌ها شود.[۳٤] در پژوهشی که بر روی موش‌های صحرایی انجام شده، نتایج نشان داد که عصاره عناب نیز می‌تواند سبب محافظت از کبد در مقابل تتراکلریدکربن شود.[۱٦]

بنابر آنچه گفته شد، عصاره‌ی ترکیبی سه گیاه خارمریم، کنگر فرنگی و عناب با مکانیسم‌های مختلفی سبب بهبود بافت کبد، پروفایل لیپیدی و آنزیم‌های کبدی در موش‌های مبتلا به کبدچرب غیرالکلی می‌شود. برای شناخت دقیق‌تر این مکانیسم‌ها مطالعات بیشتری نیاز است. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم سنجش مقاومت به انسولین و شاخصه‌های استرس اکسیداتیو همچون مالون دی آلدهید و گلوتاتیون اشاره کرد. امید است در مطالعات بعدی با سنجش این متغیرها، مسیرهای دخیل در عملکرد گیاهان دارویی مشخص شوند.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.16834844.1396.19.6.2.8]

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان گفت ترکیب سه گیاه خارمریم، کنگر فرنگی و عناب می‌توانند به عنوان یک فرمولاسیون جدید برای درمان بیماری کبد چرب غیرالکلی مطرح شوند که البته این امر نیازمند کارآزمایی‌های بالینی است.

سپاسگزاری: مقاله‌ی حاضر حاصل بخشی از نتایج طرح پژوهشی شماره ۹۳۱۳۸ مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان است. لذا بدین‌وسیله از آن معاونت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. همچنین شرکت داروسازی باریج اسانس کاشان تهیه عصاره گیاهان دارویی، تجزیه و تحلیل آن‌ها و تامین بخشی از هزینه‌های این طرح تحقیقاتی را بر عهده داشته است؛ بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از شرکت مذکور تقدیر و تشکر می‌نمایند.

تضاد منافع: نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که در این پژوهش تضاد منافعی وجود ندارد.

References

1. Ganz M, Csak T, Szabo G. High fat diet feeding results in gender specific steatohepatitis and inflammasome activation. World J Gastroenterol 2014; 20: 8525-34.
2. Zhang R, Yu Y, Hu S, Zhang J, Yang H, Han B, et al. Sesamin ameliorates hepatic steatosis and inflammation in rats on a high-fat diet via LXRα and PPARα. Nutr Res 2016; 36: 1022-30.
3. Day CP. From fat to inflammation. Gastroenterol 2006; 130: 207-10.
4. Yao H, Qiao YJ, Zhao YL, Tao XF, Xu LN, Yin LH, et al. Herbal medicines and nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol 2016; 22: 6890.
5. Xiao J, Fai So K, Liong EC, Tipoe GL. Recent Advan ces in the Herbal Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. J Tradit Complement Med 2013; 3: 88-94.
6. Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K. Milk thistle (Silybum marianum) for the therapy of liver disease. Am J Gastroenterol 1998; 93: 139-43.
7. Tamayo C, Diamond S. Review of clinical trials evaluating safety and efficacy of milk thistle (Silybum marianum [L.] Gaertn.). Integr Cancer Ther 2007; 6: 146-57.
8. Shaker E, Mahmoud H, Mnaa S. Silymarin, the antioxidant component and Silybum marianum extracts prevent liver damage. Food Chem Toxicol 2010; 48: 803-6.
9. Bosisio E, Benelli C, Pirola O. Effect of the flavanolignans of Silybum marianum L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. Pharmacol Res 1992; 25: 147159-50165.
10. Jacobs BP, Dennehy C, Ramirez G, Sapp J, Lawrence VA. Milk thistle for the treatment of liver disease: a systematic review and meta-analysis. Am J Med 2002; 113: 506-15.
11. Rodriguez TS, Giménez DG, De la Puerta Vázquez R. Choleretic activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats. Phytomedicine 2002; 9: 687-93.
12. Bundy R, Walker AF, Middleton RW, Wallis C, Simpson HC. Artichoke leaf extract (Cynara scolymus) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: a randomized, double blind placebo controlled trial. Phytomedicine 2008; 15: 668-75.
13. Gebhardt R. Inhibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by artichoke (Cynara scolymus L.) extracts. J Pharmacol Exp Ther 1998; 286: 1122-8.
14. Zhao Z, Liu M, Tu P. Characterization of water soluble polysaccharides from organs of Chinese Jujube (Zizi-phus jujuba Mill. cv. Dongzao). Eur Food Res Technol 2008; 226: 985-9.
15. Eldeen I, Van Staden J. Cyclooxygenase inhibition and antimycobacterial effects of extracts from Sudanese medicinal plants. South Afr J Botan 2008; 74: 225-9.
16. Shen X, Tang Y, Yang R, Yu L, Fang T, Duan J-a. The protective effect of Zizyphus jujube fruit on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in mice by anti-oxidative activities. J Ethnopharmacol 2009; 122: 555-60.
17. Emamat H, Noori M, Foroughi F, Rismanchi M, Eini-Zinab H, Hekmatdoost A. An Accessible and Pragmatic Experimental Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Middle East J Dig Dis 2016; 8: 109-15.
18. Haghi G, Hatami A, Arshi R. Distribution of caffeic acid derivatives in Gundelia tournefortii L. Food chem 2011; 124: 1029-35.
19. Ahmed U, Redgrave TG, Oates PS. Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat. J Gastroenterol Hepatol 2009; 24: 1463-71.
20. Emamat H, Foroughi F, Eini-Zinab H, Taghizadeh M, Rismanchi M, Hekmatdoost A. The effects of onion consumption on treatment of metabolic, histologic, and inflammatory features of nonalcoholic fatty liver disease. J Diabetes Metab Disord 2015; 15: 25.
21. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. Hepatol 2003; 37: 917-23.
22. Kucera O, Cervinkova Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. World J Gastroenterol 2014; 20: 8364-76.
23. Greenlee H, Abascal K, Yarnell E, Ladas E. Clinical Applications of Silybum marianum in Oncology. Integr Cancer Ther 2007; 6: 158-65.
24. Kroll DJ, Shaw HS, Oberlies NH. Milk Thistle Nomenclature: Why It Matters in Cancer Research and Pharmacokinetic Studies. Integr Cancer Ther 2007; 6: 110-9.
25. Huseini HF, Larijani B, Heshmat Ra, Fakhrzadeh H, Radjabipour B, Toliat T, et al. The efficacy of Silybum marianum (L.) Gaertn.(silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. Phytother Res 2006; 20: 1036-9.
26. Katiyar SK, Meleth S, Sharma SD. Silymarin, a Flavonoid from Milk Thistle (Silybum marianum L.), Inhibits UV-induced Oxidative Stress Through Targeting Infiltrating CD11b+ Cells in Mouse Skin. Photochem Photobiol 2008; 84: 266-71.
27. Skottova N, Kazdova L, Oliyarnyk O, Vecera R, Sobolova L, Ulrichova J. Phenolics-rich extracts from Silybum marianum and Prunella vulgaris reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1396.19.6.2.8]

hypertriglyceridemic rats. Pharmacol Resh 2004; 50: 123-30.
28. Nazni P, Vijayakumar TP, Alagianambi P, Amirthaveni M. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of Cynara scolymus among selected type 2 diabetic individuals. Pakistan Journal Nutr 2006; 5: 147-51.
29. Speroni E, Cervellati R, Govoni P, Guizzardi S, Renzulli C, Guerra M. Efficacy of different Cynara scolymus preparations on liver complaints. Journal of Ethnopharmacol 2003; 86: 203-11.
30. Adzet T, Camarasa J, Laguna JC. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from Cynara scolymus against CCl4 toxicity in isolated rat hepatocytes. J Nat prod 1986; 50: 612-7.
31. Hemmati M, Zohoori E, Mehrpour O, Karamian M, Asghari S, Zarban A, et al. Anti-Atherogenic potential of jujube, saffron and barberry: Anti-Diabetic and antioxidant actions. EXCLI J 2015; 14: 908.
32. San B, Yildirim AN. Phenolic, alpha-tocopherol, beta-carotene and fatty acid composition of four promising jujube (Ziziphus jujuba Miller) selections. J Food Compost Anal 2010; 23: 706-10.
33. Sabzghabaee AM, Khayam I, Kelishadi R, Ghannadi A, Soltani R, Badri S, et al. Effect of Zizyphus jujuba fruits on dyslipidemia in obese adolescents: A triple-masked randomized controlled clinical trial. Med Arch 2013; 67: 156.
34. Goyal R, Sharma PL, Singh M. Possible attenuation of nitric oxide expression in anti-inflammatory effect of Ziziphus jujuba in rat. J Nat Med 2011; 65: 514-8.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1396.19.6.2.8]

Original Article

Evaluation Effect of *Silybum Marianum, Cynara Scolymus L. and Ziziphus jujube Mill.* Combination Extract on Non-alcoholic Fatty Liver in Rats

Mohammadifar M[1], Behnam M[2], Talaei S.A[2], Khamechian T[3], Mehran M[4], Taghizadeh M[1]

[1]Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran, [2]Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran, [3]Department of Pathology, School of Medicine, Kashan University Medical Sciences, Kashan, Iran, [4]Barij Essence Medicinal Plants Research Center, Kashan, I.R. Iran.

e-mail: taghizadeh_m@kaums.ac.ir

Received: 26/07/2017 **Accepted**: 23/12/2017

Abstract

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease includes a spectrum of clinical syndromes from early steatosis to liver cirrhosis. The aim of this study was to evaluate the effect of combined extract of silymarin, artichoke and jujube on non-alcoholic fatty liver, induced by high-fat diet in rats. Materials and Methods: In this experimental study, 40 male rats were divided randomly into two groups, a sham group (n=8) and a high-fat diet group (n=32). After 4 months of being fed the high-fat diet, rats suffering from fatty liver were divided into 4 groups (n=8 each) including a high-fat diet group and the three groups receiving a dose of the combined extract 100, 200 and 400 mg/kg for 2 months. Finally, lipid profiles, activity of serum liver enzymes and liver histology were investigated. Results: The high-fat diet increased Chol, TG and LDL and decreased HDL levels (P<0.001). This diet also increased serum activity of ALT, AST and ALP to 84, 113 and 228 %, respectively. Receiving extract at doses of 200 and 400 mg/kg improved lipid profiles and hepatic enzyme activity (P<0.05). Histopathology confirmed changes in liver induced by the high fat diet and the protective effect of the extract. Conclusion: High-fat diet induced nonalcoholic fatty liver in rats and treatment with combined extracts of silymarin, artichoke and jujube improved the complications of the disease.

Keywords: *Silybum Marianum, Cynara scolymus, Ziziphus jujube,* Non-alcoholic fatty liver, High-fat diet

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.16834844.1396.19.6.2.8]