مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی بیست و چهارم، شماره‌ی ۴، صفحه‌های ۲۴۰ ـ ۲۳۵ (مهر ـ آبان ۱۴۰۱)

مقاله‌ی پژوهشی

تاثیر عصاره پوست لیمو عمانی بر آسیب کبدی ناشی از بی‌حرکتی مزمن در موش‌های صحرایی نر

دکتر رحیم امینی[۱]، دکتر معصومه اصل روستا[۲]

۱) گروه زیست‌شناسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران، ۲) گروه فیزیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران، **نشانی مکاتبه با نویسنده‌ی مسئول:** زنجان، بلوار دانشجو، دانشگاه آزاد اسلامی زنجان- کدپستی ٤٥١٥٦-٥٨١٤٥، دکتر معصومه اصل روستا؛ e-mail: masoumeh.rousta@iau.ac.ir

چکیده

مقدمه: پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که بی‌حرکتی مزمن می‌تواند با القا استرس اکسیداتیو به آسیب کبدی منجر شود. لیمو عمانی ***(Citrus aurantifolia)*** دارای خواص ضداکسیدانی، ضدالتهابی، ضدآپوپتوتیک و هم‌چنین اثر محافظتی بردستگاه عصبی و قلبی-عروقی می‌باشد. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره هیدرواتانلی پوست لیمو عمانی بر آسیب کبدی ناشی از بی‌حرکتی مزمن در موش‌های صحرایی است. مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۲۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار به گروه‌های شاهد، تیمار با پوست لیمو، بی‌حرکتی مزمن و بی‌حرکتی مزمن-پوست لیمو تقسیم شدند. گروه‌های بی‌حرکتی مزمن به مدت ۲۱ روز متوالی، روزانه ۶ ساعت، در مقیدکننده قرار گرفتند. در همین مدت، گروه‌های تیمار با پوست لیمو، عصاره هیدرواتانلی پوست لیمو را (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به صورت گاواژ دریافت کردند. در پایان دوره، سطوح فعالیت آنزیم‌های کبدی و هم‌چنین سطح مالون‌دی‌آلدهید کبد اندازه‌گیری شد. یافته‌ها: سطح مالون‌دی‌آلدهید در کبد موش‌های صحرایی گروه بی‌حرکتی مزمن (۰/۰۴۵±۰/۵۳۲) در مقایسه با شاهد (۰/۰۲±۰/۳۴۹) به طور معنی‌داری بالاتر بود. فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (۴/۵۸±۵۱/۶۱)، آسپارتات آمینوترانسفراز (۸/۱۲±۱۲۳/۰۷) و آلکالین فسفاتاز (۱۳/۹۶±۳۱۰/۶۲) نیز در سرم موش‌های صحرایی بی‌حرکت، در مقایسه با شاهد (به ترتیب ۲/۹۸±۲۹/۷۷، ۷/۰۳±۷۳/۱۰ و ۷/۰۰±۲۰۹/۵۳)، افزایش معنی‌دار داشت و با نفوذ سلول‌های التهابی به پارانشیم کبدی همراه بود. سطح مالون‌دی‌آلدهید (۰/۰۰۴±۰/۴۰۷) و فعالیت آنزیم‌های کبدی در گروه بی‌حرکتی مزمن-پوست لیمو به طور معنی‌داری کمتر از گروه بی‌حرکت بود (آلانین آمینوترانسفراز ۲/۲۹±۳۵/۷۳، آسپارتات آمینوترانسفراز ۵/۷۶±۸۲/۰۴ و آلکالین فسفاتاز ۱۵/۹۱±۲۳۱/۰). نتیجه‌گیری: عصاره پوست لیمو با مهار استرس اکسیداتیو به عنوان یک عامل محافظت‌کننده کبدی عمل نموده و می‌تواند کبد را از آسیب‌های ناشی از بی‌حرکتی مزمن محافظت می‌کند.

واژگان کلیدی: لیمو عمانی *(Citrus aurantifolia)*، مالون‌دی‌آلدهید، آنزیم‌های کبدی، بی‌حرکتی مزمن

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۸/۱۰ـ دریافت اصلاحیه۱۴۰۱/۹/۲۲ ـ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۰/٤

مقدمه

بی‌حرکتی یکی از انواع استرس محسوب می‌شود[۱] و اثرات کوتاه مدت و طولانی مدت آن در مطالعات فراوانی مورد بررسی قرار گرفته است. گزارش‌هایی مبنی بر اثرات بی‌حرکتی مزمن بر فیزیولوژی کبد، دستگاه عصبی و قلبی عروقی موجود است.[۱] بی‌حرکتی مزمن با تحریک محور اندوکرینی هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال، موجب افزایش سطح گلوکوکورتیکوئیدها در خون و افزایش بیان گیرنده‌ی این هورمون‌ها در کبد می‌شود.[۲] ثابت شده که بی‌حرکتی مزمن با کاهش فعالیت کاتالاز[i] و کاهش گلوتاتیون[ii] در بافت کبد، سیستم دفاعی این اندام را تضعیف می‌کند،

i-Catalase
ii-Glutathione

پراکسیداسیون لیپیدی را در بافت کبدی افزایش می‌دهد و به تولید مالون‌دی‌آلدهید[i] منجر می‌گردد. این تغییرات با افزایش بیان عوامل پیش‌التهابی و کاهش عامل ضدالتهابی اینترلوکین ۱۰ همراه است و سطح آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز[ii]، آسپارتات آمینوترانسفراز[iii] و آلکالین فسفاتاز[iv] را نیز در سرم افزایش می‌دهد.[۳،٤]

لیمو (*Citrus aurantifolia*) گیاهی از خانواده Rutaceae است که در بسیاری از کشورها رشد کرده و مصرف غذایی دارد. عصاره پوست میوه این گیاه حاوی مقادیر فراوانی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی (نظیر روتین[v]، آپی‌ژنین[vi]، کوئرستین[vii] و کامفرول[viii]) و ترپنوئیدها (نظیر لیمونن[ix]، میرستین[x]، آلفاپینن[xi] و لینالول[xii]) است.[٥] اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضددیابتی لیمو به اثبات رسیده است.[٦،٧] همان‌طور که ذکر شد بی‌حرکتی مزمن موجب پیدایش استرس اکسیداتیو و التهاب در بافت کبد می‌شود،[۲،۳] بنابراین ممکن است لیمو بتواند از وقوع این پدیده در کبد حیوانات مواجه شده با استرس بی‌حرکتی مزمن جلوگیری نماید. از سوی دیگر گزارش‌هایی مبنی بر اثر محافظت کبدی گونه‌های دیگری از این جنس نظیر *C. hystrix*، *C. maxima* و *C. aurantium* وجود دارد[۸،۹] و فرض محافظت کبدی لیمو عمانی نیز مطرح است، زیرا لیموعمانی استرس اکسیداتیو القا شده توسط پاراستامول را در کبد کاهش می‌دهد.[۱۰] اثر محافظتی عصاره برگ این گیاه نیز علیه هپاتوتوکسیسیتی القا شده توسط استامینوفن به اثبات رسیده است[۱۱] اما تاکنون اثر پوست لیموعمانی مورد بررسی قرار نگرفته است. بر این اساس، در مطالعه حاضر، اثر عصاره هیدروالکلی پوست لیموعمانی را بر آسیب کبدی ناشی از بی‌حرکتی مزمن بررسی نمودیم.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق بنیادی ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (سن ۸ هفته و وزن ۲۲۰-۲۰۰ گرم) در شرایط استاندارد (دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی آسان به غذا و آب) نگه‌داری شدند. همه مراحل کار با حیوانات با رعایت اصول اخلاقی انجام گرفت و توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان تایید شد (کد IR.IAU.Z.REC.1396.28). حیوانات پس از یک هفته عادت کردن به محیط حیوان‌خانه، به ٤ گروه پنج تایی تقسیم شدند:

- گروه شاهد: هیچ تیماری دریافت نکردند.
- گروه تیمار با پوست لیمو: هر روز یک بار عصاره هیدروالکلی پوست لیمو (٤۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) را به مدت ۲۱ روز متوالی به صورت گاواژ دریافت نمودند.[۱۲]
- گروه بی‌حرکتی مزمن: به مدت ۲۱ روز متوالی هر روز ٦ ساعت در مقیدکننده قرار گرفتند.[۱۳]
- گروه بی‌حرکتی مزمن-پوست لیمو: علاوه بر قرار گرفتن در مقیدکننده، عصاره هیدروالکلی پوست لیمو را در طول ۲۱ روز بی‌حرکتی دریافت کردند.

لیمو عمانی از یک فروشگاه گیاهان دارویی خریداری و پودر پوست آن تهیه شد. یک صد گرم از پودر در یک بشر حاوی ۳۰۰ میلی‌لیتر اتانل ۷۰ درصد ریخته شد و به مدت ٤۸ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت. سپس محلول از کاغذ صافی عبور داده شد و در دمای ٥۰ درجه سانتی‌گراد (برای حذف حلال) در روتاری قرار گرفت. در نهایت با افزودن آب مقطر، مقدار ٤۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره را در حجم ۰/٤ میلی‌لیتر (حجم هر گاواژ) به دست آوردیم.

در پایان دوره، پس از بیهوشی با کلرال هیدرات (٤۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) خونگیری از قلب انجام و کبد حیوانات برای سنجش سطح مالون‌دی‌آلدهید و هم‌چنین برای بررسی بافت‌شناسی جدا شد.

پس از جداسازی پلاسما از نمونه خون، سطح فعالیت آنزیم‌های ALP، AST و ALT با استفاده از کیت‌های شرکت پارس‌آزمون (ایران) و توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

بخشی از کبد پس از همگن شدن در بافر تریس-اسیدکلریدریک، در سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۵

---

i-Malonedialdehyde
ii-Alanine transaminase (ALT)
iii-Aspartate aminotransferase (AST)
iv-*Alkaline phosphatase (ALP)*
v-Rutin
vi-Apigenin
vii-Quercetin
viii-Kaempferol
ix-Limonene
x-Myrecetin
xi-Apha-pinene
xii-Linalool

دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفته و محلول شناور رویی برای تعیین سطح مالون دی‌آلدهید، با استفاده از روش لوری،[14] استفاده شد. مالون‌دی‌آلدهید بر اساس واکنش با تیوباربیتوریک اسید (که رنگ ارغوانی ایجاد می‌کند) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در نظر گرفته شد و سطح جذب توسط اسپکتروفوتومتر (٥٣٢ نانومتر) تعیین گردید. در این آزمون، آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد در نظر گرفته شد.

بخش دیگری از کبد در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و پس از مراحل آماده‌سازی بافتی، برش‌های ٦ میکرومتری تهیه شده و به دنبال رنگ‌آمیزی توسط هماتوکسیلین-ائوزین برای بررسی بافت‌شناسی توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج حاصل از سنجش مالون‌دی‌آلدهید و آنزیم‌های کبدی سرم به صورت میانگین±خطای معیار ارایه شد. مقایسه آماری بین گروه‌ها نیز با استفاده از آزمون‌های تحلیل واریانس یک طرفه[i] و آزمون تعقیبی توکی[ii] انجام و P < ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سطح مالون‌دی‌آلدهید در کبد حیوانات گروه بی‌حرکتی مزمن در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P=۰/۰۰۸) در حالی‌که عصاره پوست لیمو توانست سطح آن را در موش‌های مواجه شده با بی‌حرکتی مزمن کاهش دهد (P=۰/۰۳۰). مقدار مالون‌دی‌آلدهید در گروه پوست لیمو در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج حاصل از اثر عصاره پوست لیموعمانی بر سطح مالون‌دی‌آلدهید کبد موش‌های صحرایی مواجه شده با بی‌حرکتی مزمن

شاخص	شاهد	پوست لیمو	بی‌حرکتی‌مزمن	بی‌حرکتی‌مزمن-پوست لیمو
مالون‌دی‌آلدهید (نانومول بر میلی‌گرم)	۰/۳٤۹ ± ۰/۰۲	۰/۳۲٥ ± ۰/۰۱٤	۰/٥۳۲ ± ۰/۰٤٥ *	۰/٤۰۷ ± ۰/۰۰٤ †

نتایج به صورت میانگین±خطای معیار نشان داده شده است. در هر گروه ٥ موش صحرایی قرار دارد. P< ۰/۰۱ * در مقایسه با گروه شاهد و P<۰/۰٥† در مقایسه با گروه بی‌حرکتی مزمن.

هم‌چنین فعالیت آنزیم‌های AST، ALP و ALT در گروه بی‌حرکتی مزمن در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد (به ترتیب P= ۰/۰۰۱، P=۰/۰۰۰ و P=۰/۰۰۱) مصرف عصاره پوست لیمو موجب کاهش سطح فعالیت این آنزیم‌ها در موش‌های مواجه شده با بی‌حرکتی مزمن شد (به ترتیب P=۰/۰۰۲، P=۰/۰۰۲ و P=۰/۰۰٦). فعالیت آنزیم‌های مذکور در گروه پوست لیمو در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

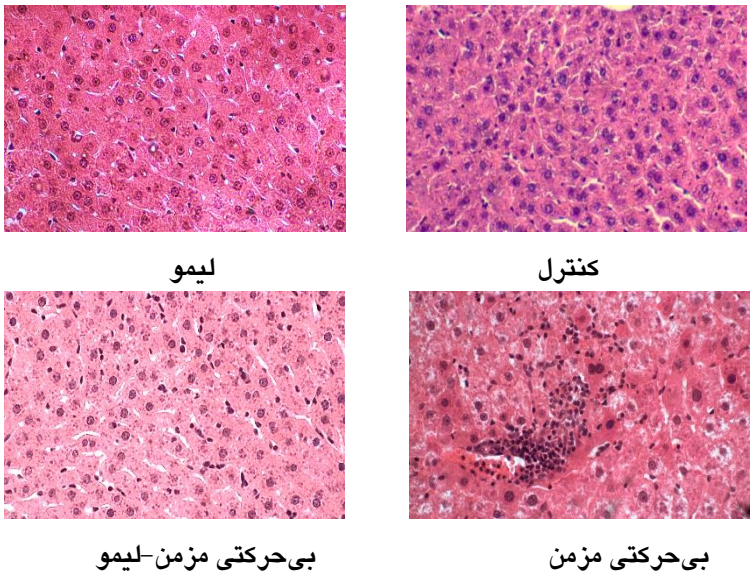
جدول ۲- نتایج حاصل از اثر عصاره پوست لیمو عمانی بر فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در موش‌های صحرایی مواجه شده با بی‌حرکتی مزمن.

سطح آنزیم در پلاسما (IU بر لیتر)	شاهد	پوست لیمو	بی‌حرکتی‌مزمن	بی‌حرکتی‌مزمن- پوست لیمو
AST	۷۳/۱۰±۷/۰۳	۷۹/٤±٤/٦۹	۱۲۳/۰۷±۸/۱۲*	۸۲/۰٤±٥/۷٦ †
ALT	۲۹/۷۷±۲/۹۸	۳۳/۷٤±۰/٦٦	٥۱/٦۱±٤/٥۸*	۳٥/۷۳±۲/۲۹†
ALP	۲۰۹/٥۳±۷/۰۰	۲۱٥/۰٤±۹/٥٤	۳۱۰/٦۲±۱۳/۹٦‡	۲۳۱/۰±۱٥/۹۱†

نتایج به صورت میانگین±خطای معیار نشان داده شده است. در هر گروه ٥ موش صحرایی قرار دارد. P<۰/۰۱ * و P< ۰/۰۰۱ ‡ در مقایسه با گروه شاهد و P< ۰/۰۱ † در مقایسه با گروه بی‌حرکتی مزمن.

بررسی میکروسکوپی برش‌های ٦ میکرومتری کبد حاکی از ورود سلول‌های التهابی به پارانشیم کبد در گروه بی‌حرکتی مزمن بود؛ در حالی‌که این پدیده در گروه‌های شاهد، پوست لیمو و بی‌حرکتی مزمن-پوست لیمو مشاهده نشد (شکل ۱).

i-One-way ANOVA
ii-Tukey



شکل ۱- اثر عصاره هیدروالکلی پوست لیمو عمانی بر تغییرات بافت‌شناختی کبد در موش‌های صحرایی مواجه شده با استرس بی‌حرکتی مزمن. بی‌حرکتی موجب نفوذ سلول‌های التهابی به پارانشیم کبد موش‌های صحرایی شد، در حالی‌که عصاره پوست لیمو تا حد زیادی از وقوع این پدیده در گروه بی‌حرکتی مزمن-پوست لیمو ممانعت نمود. تصاویر از برش‌های ۶ میکرومتری در بزرگ‌نمایی ۴۰۰× تهیه شده است.

بحث

در تحقیق حاضر، بی‌حرکتی مزمن موجب افزایش سطح مالون‌دی‌آلدهید در بافت کبد، نفوذ سلول‌های التهابی به پارانشیم کبدی و همچنین افزایش سطح آنزیم‌های کبدی AST، ALT و ALP در مقایسه با گروه شاهد شد که با نتایج حاصل از مطالعات پیشین[۳،٤] همسو می‌باشد. مصرف ۲۱ روزه عصاره هیدروالکلی پوست لیمو عمانی تا حدی زیادی از وقوع اثرات فوق در حیوانات مواجه شده با بی‌حرکتی ممانعت نمود.

عصاره پوست لیمو عمانی در مطالعه حاضر، سطح مالون‌دی‌آلدهید را در کبد موش‌های مواجه شده با بی‌حرکتی مزمن کاهش داد. گزارش شده است که آب لیمو (که ترکیباتی مشابه پوسته اما با مقدار متفاوت دارد) نیز می‌تواند با مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، سلول‌های کبدی را در برابر سدیم نیتروپروساید[i] محافظت کند.[۱۵] مالون‌دی‌آلدهید شاخصی برای پراکسیداسیون لیپیدی در بافت است[۱٦] که به دنبال استرس اکسیداتیو تولید شده و با افزایش عوامل پیش التهابی به آسیب کبدی منجر می‌گردد.[۱۷] اثر کاهشی عصاره پوست لیمو بر مالون‌دی‌آلدهید در کبد را می‌توان به ترکیبات موجود در این عصاره نسبت داد. به طور مثال آپی‌ژنین،[۱۸] کامفرول،[۱۹] آلفاپینن[۲۰] و کوئرستین[۲۱] همگی اثر آنتی‌اکسیدانی داشته و از تولید مالون‌دی‌آلدهید جلوگیری می‌کنند.

به دنبال تولید مالون‌دی‌آلدهید، تولید عوامل پیش‌التهابی و همچنین ورود گلبول‌های سفید تک‌هسته‌ای به پارانشیم کبدی تحریک می‌شود.[۲۲،۲۳] بررسی میکروسکوپی بافت کبدی در پژوهش حاضر نیز حاکی از حضور تجمعی از سلول‌های تک‌هسته‌ای در پارانشیم کبدی موش‌های مواجه شده با بی‌حرکتی مزمن بود؛ در حالی‌که این پدیده در کبد حیوانات گروه بی‌حرکتی مزمن- پوست لیمو مشاهده نشد. پیشتر نیز ذکر شد که عصاره پوست لیمو اثر ضدالتهابی دارد.[۵] این اثر را می‌توان به ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی و همچنین ترپنوئیدهای موجود در عصاره ربط داد. به طور مثال کوئرستین، لیمونن، روتین و آپی‌ژنین همگی از تجمع سلول‌های التهابی در پارانشیم کبدی جلوگیری می‌کنند.[۲٤-۲۷]

از سوی دیگر، افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی در بیماری‌های کبدی از نتایج التهاب و آسیب اکسیداتیو است.[۲۸،۲۹] عصاره هیدروالکلی لیمو توانست فعالیت هر سه آنزیم ALT، AST و ALP را در سرم موش‌های مواجه شده با بی‌حرکتی کاهش دهد. بر طبق نتایج یک تحقیق، تیمار با عصاره آبی ریشه لیمو؛ به مقدار ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۹۰ روز، موجب افزایش معنی‌دار سطح ALP در

i-Sodium Nitroprusside

مقایسه با شاهد شد اما بر مقادیر AST و ALT اثر نداشت. بنابراین اثر عصاره بر سطح ALP وابسته به زمان و مقدار بود و در مقدار و زمان مصرف کمتر، تفاوتی با گروه شاهد نداشت.[۳۰] اثر کاهشی برخی از ترکیبات موجود در عصاره پوست لیمو مثل کامفرول،[۱۹] کوئرستین[۳۱] و میرستین[۳۲] نیز بر فعالیت آنزیم‌های کبدی گزارش شده است.

با توجه به این که بی‌حرکتی مزمن موجد استرس اکسیداتیو در کبد است و به دنبال آن التهاب و آسیب بافتی در کبد القا می‌شود، بنابراین مهار استرس اکسیداتیو می‌تواند از بروز اختلالات بعدی جلوگیری کند. بر اساس نتایج بررسی‌های پیشین، عصاره پوست لیمو حاوی آنتی‌اکسیدان-های قوی است و در این تحقیق نیز اثر مهاری آن بر تولید مالون‌دی‌آلدهید (از نتایج وقوع استرس اکسیداتیو) در موش-های صحرایی مواجه شده با بی‌حرکتی مزمن مشاهده شد. ثابت شده است که لیمونن به عنوان ترکیب عمده موجود در لیمو، با تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی در کبد (از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش محتوای گلوتاتیون) و کاهش بیان عوامل پیش التهابی، اثر محافظتی خود را در کبد موش‌های صحرایی مواجه شده با بی‌حرکتی مزمن به جای می‌گذارد.[۱۳] احتمال دارد عصاره پوست لیمو به همین طریق توانسته باشد از آسیب بافتی و عملکردی کبد ممانعت کند.

بررسی التهاب بافتی در کبد حیوانات را می‌توان از نقاط قوت این مطالعه دانست. علاوه بر این، تاکنون اثر حفاظت کبدی پوست لیمو عمانی بررسی نشده بود و نتایج حاصل از تحقیق حاضر ممکن است راهگشای پژوهش‌گران در حوزه محافظت کبدی باشد. از محدودیت‌های این تحقیق نیز می‌توان به فقدان بررسی‌های ایمنوهیستوشیمی و مولکولی، از جمله بیان عوامل پیش التهابی در بافت کبد حیوانات اشاره نمود که ناشی از کمبود منابع مالی بود. پیشنهاد می‌شود این موارد در مطالعات آتی مورد بررسی قرار گیرد.

از مشاهدات صورت گرفته نتیجه گیری می‌شود که عصاره پوست لیمو را می‌توان یک عامل محافظت‌کننده کبدی دانست که با کاهش استرس اکسیداتیو می‌تواند کبد را در برابر آسیب‌های ناشی از بی‌حرکتی مزمن محافظت نماید.

سپاسگزاری: از آقای یعقوب بیگدلی برای کمک در مراحل کار با حیوانات قدردانی می‌شود.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌کنند که تضاد منافعی در این تحقیق وجود ندارد.

References

1. Şahin E, Gümüşlü S. Immobilization stress in rat tissues: alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2007; 144: 342-7.
2. Al-Mohaisen M, Cardounel A, Kalimi M. Repeated immobilization stress increases total cytosolic glucocorticoid receptor in rat liver. Steroids 2000; 65: 8-15.
3. Omer MA, Amel OB, Khalid AA. Immobilization stress-induced changes in liver function, oxidative balance and inflammatory responses of wistar albino rats. SJST 2018; 32: 521-8.
4. Zaidi SK, Ansari SA, Tabrez S, Ashraf GM, Shaki S, Jafri MA, et al. Hepato-protective effect of Allium sativum against immobilization stress in rats. Pak J Pharm Sci 2019; 32: 521-8.
5. Loizzo MR, Tundis R, Bonesi M, Menichini F, De Luca D, Colica C, et al. Evaluation of Citrus aurantifolia peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities. J Sci Food Agric 2012; 92: 2960-7.
6. Ibrahim FA, Usman LA, Akolade JO, Idowu OA, Abdulazeez AT, Amuzat AO. Antidiabetic potentials of citrus aurantifolia leaf essential oil. Drug Res 2019; 69: 201-6.
7. Dongmo PJ, Tchoumbougnang F, Boyom FF, Sonwa ET, Zollo PA, Menut C. Antiradical, antioxidant activities and anti-inflammatory potential of the essential oils of the varieties of Citrus limon and Citrus aurantifolia growing in Cameroon. J Asian Sci Res 2013; 3: 1046-57.
8. Abirami A, Nagarani G, Siddhuraju P. Hepatoprotective effect of leaf extracts from Citrus hystrix and C. maxima against paracetamol induced liver injury in rats. Food Sci Hum Wellne 2015; 4: 35-41.
9. Shu Y, He D, Li W, Wang M, Zhao S, Liu L, et al. Hepatoprotective Effect of Citrus aurantium L. Against APAP-induced Liver Injury by Regulating Liver Lipid Metabolism and Apoptosis. Int J Biol Sci 2020; 16: 752.
10. Gokulakrishnan K, Senthamilselvan P, Sivakumari V. Regenerating activity of Citrus aurantifolia on paracetamol induced heaptic damage. Asian J Biol Sci 2009; 4: 176-9. 11.
11. Adanma OP, Okolie NJ, Michael UI. Histomorphological Effects of Citrus Aurantifolia (LIME) Leaf Extract on Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Wistar Rats. IJIRAS 2019; 6: 26-30.
12. Egwim EC, Hamzah RU, Adepeju A. Effect of Ethyl Acetate Extracts from Peel of Citrus decumana and Citrus aurantifolia on aspirin induced gastric ulcer in mice. J Pharm Res Int 2015: 249-59.
13. Amini R, Asle-Rousta M, Aghazadeh S. Hepatoprotective effect of limonene against chronic immobilizeation induced liver damage in rats. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2020; 393: 2053-9.
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-75.
15. Oboh G, Bello FO, Ademosun AO, Akinyemi AJ, Adewuni TM. Antioxidant, hypolipidemic, and anti-angiotensin-1-converting enzyme properties of lemon (Citrus limon) and lime (Citrus aurantifolia) juices. Comp Clin Path 2015; 24: 1395-406.

16. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radic Biol Med 1990; 9: 515-40.
17. Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. Free Radic Biol Med 2002; 32: 303-8.
18. Zheng QS, Sun XL, Xu B, Li G, Song M. Mechanisms of apigenin-7-glucoside as a hepatoprotective agent. Biomed Environ Sci 2005; 18: 65-70.
19. Wang Y, Tang C, Zhang H. Hepatoprotective effects of kaempferol 3-O-rutinoside and kaempferol 3-O-glucoside from Carthamus tinctorius L. on CCl4-induced oxidative liver injury in mice. J Food Drug Anal 2015; 23: 310-7.
20. Khan-Mohammadi-Khorrami MK, Asle-Rousta M, Rahnema M, Amini R. Neuroprotective effect of alpha-pinene is mediated by suppression of the TNF-α/NF-κB pathway in Alzheimer's disease rat model. J Biochem Mol Toxicol 2022; 36: e23006.
21. Boots AW, Drent M, de Boer VC, Bast A, Haenen GR. Quercetin reduces markers of oxidative stress and inflammation in sarcoidosis. Clin Nutr 2011; 30: 506-12.
22. Busch CJ, Hendrikx T, Weismann D, Jäckel S, Walenbergh SM, Rendeiro AF, et al. Malondialdehyde epitopes are sterile mediators of hepatic inflammation in hypercholesterolemic mice. Hepatol 2017; 65: 1181-95.
23. Duryee MJ, Klassen LW, Freeman TL, Willis MS, Tuma DJ, Thiele GM. Lipopolysaccharide Is a Cofactor for Malondialdehyde-Acetaldehyde Adduct–Mediated Cytokine/Chemokine Release by Rat Sinusoidal Liver Endothelial and Kupffer Cells. Alcoholism: Clin Exp Res 2004; 28: 1931-8.
24. Pan PH, Lin SY, Wang YY, Chen WY, Chuang YH, Wu CC, et al. Protective effects of rutin on liver injury induced by biliary obstruction in rats. Free Rad Biol Med 2014; 73: 106-16.
25. Pavanato A, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, González-Gallego J, et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. Dig Dis Sci 2003; 48: 824-9.
26. Santiago JV, Jayachitra J, Shenbagam M, Nalini N. Dietary d-limonene alleviates insulin resistance and oxidative stress–induced liver injury in high-fat diet and L-NAME-treated rats. Eur J Nutr 2012; 51: 57-68.
27. Yang J, Wang XY, Xue J, Gu ZL, Xie ML. Protective effect of apigenin on mouse acute liver injury induced by acetaminophen is associated with increment of hepatic glutathione reductase activity. Food Funct 2013; 4: 939-43.
28. Cichoz-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. World J Gastroenterol 2014; 20: 8082-91.
29. Gowda S, Desai PB, Hull VV, Avinash AK, Vernekar SN, Kulkarni SS. A review on laboratory liver function tests. Pan Afr Med J 2009; 3: 17.
30. Chunlaratthanaphorn S, Lertprasertsuke N, Srisawat U, Thuppia A, Ngamjariyawat A, Suwanlikhid N, Jaijoy K. Acute and subchronic toxicity study of the water extract from root of Citrus aurantifolia (Christm. et Panz.) Swingle in rats. Sakha Witthayasat Lae Technol 2007; 29: 125-39.
31. Padma VV, Baskaran R, Roopesh RS, Poornima P. Quercetin attenuates lindane induced oxidative stress in wistar rats. Mol Biol Rep 2012; 39: 6895-905.
32. Kandasamy N, Ashokkumar N. Myricetin, a natural flavonoid, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-cadmium-induced experimental diabetic nephrotoxic rats. Biomed Prev Nutr 2012; 2: 246-51.

Original Article

The Effect of Dried Lemon Peel on Chronic Immobilization-Induced Liver Damage in Male Wistar Rats

Amini R[1], Asle-Rousta M[2]

[1]Department of Biology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran, [2]Department of Physiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, I.R. Iran.

e-mail: masoumeh.rousta@iau.ac.ir

Received: 01/11/2022 **Accepted:** 25/12/2022

Abstract

Introduction: Previous research has demonstrated that chronic immobilization can induce oxidative stress and result in liver damage. Dried lemons (*Citrus aurantifolia*) possess antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic properties, as well as neuroprotective and cardioprotective effects. The objective of the present study is to examine the impact of hydroethanolic extract from dried lemon peel on liver damage caused by chronic immobilization in male Wistar rats. Materials and Methods: In this experimental study, 20 male Wistar rats were divided into four groups: control, dried lemon peel, chronic immobilization, and chronic immobilization-dried lemon peel. The chronic immobilization groups were subjected to restraint stress for 6 hours daily, continuously for 21 days. The dried lemon peel groups received a hydroethanolic extract of dried lemon peel (at a dose of 400 mg/kg body weight) by gavage. At the end of the study period, the levels of liver enzyme activity and liver malondialdehyde were measured. Results: The level of malondialdehyde in the liver of rats in the chronic immobilization group (0.532±0.045) was significantly higher compared to the control group (0.349±0.02). Moreover, the serum activity of alanine aminotransferase (51.61±4.58), aspartate aminotransferase (123.07±8.12), and alkaline phosphatase (310.62±13.96) enzymes in immobilized rats showed a significant increase compared to the control group (29.77±2.98, 73.10±7.03, and 209.53±7.00, respectively), indicating infiltration of inflammatory cells into the liver parenchyma. On the other hand, the chronic immobilization-dried lemon peel group exhibited a significant decrease in the level of malondialdehyde (0.407±0.004) and the activity of liver enzymes (alanine aminotransferase 35.73±2.29, aspartate aminotransferase 82.04±5.76, and alkaline phosphatase 231.0±15.91) compared to the chronic immobilization group. Conclusion: It is concluded that dried lemon peel probably acts as a hepatoprotective agent by inhibiting oxidative stress and protecting the liver from damage caused by chronic immobilization.

Keywords: Dried lemon (*Citrus aurantifolia*), Malondialdehyde, Liver enzymes, Chronic immobilization