

بررسی اثر محافظتی عصاره زرشک بر آنزیم های کبدی ناشی از مسمومیت با سم دیازینون در بافت کبد موش های صحرایی نر

محمد جلیلی^۱، امیررضا کرمی بناری^۲، فرشته مهری^۳

۱. دکتری حرفه ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران

moh.jalili1376@gmail.com

۲. استادیار فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.

pharmakarami@yahoo.com

۳. دانشیار سم شناسی و داروشناسی، مرکز تحقیقات سلامت تغذیه، پژوهشکده علوم و فناوری بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، ایران.

freshteh_mehri@yahoo.com

چکیده:

هدف: این مطالعه با هدف بررسی اثر محافظتی عصاره زرشک (*Berberis vulgaris* L) بر آسیب های کبدی ناشی از مسمومیت با سم دیازینون (DZN)، به عنوان یک سم ارگانوفسفره رایج در کشاورزی، در بافت کبد موش های صحرایی نر انجام شد. دیازینون باعث افزایش سطوح آنزیم های کبدی مانند آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) می شود که نشان دهنده آسیب اکسیداتیو و اختلال در عملکرد کبد است. عصاره زرشک به دلیل دارا بودن ترکیبات آنتی اکسیدانی مانند بربرین، می تواند به عنوان یک عامل محافظتی طبیعی عمل کند و از انباشت رادیکال های آزاد و آسیب سلولی جلوگیری نماید. این پژوهش بر پایه شواهد پیشین مبنی بر اثرات آنتی اکسیدانی زرشک در مدل های حیوانی، به ارزیابی سطوح آنزیم های کبدی و نقش محافظتی آن پرداخت.

مواد و روش ها: این تحقیق تجربی (interventional) بر روی ۲۴ موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۱۸۰-۲۵۰ گرم انجام گردید. موش ها به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (دریافت کننده آب مقطر به صورت خوراکی)، گروه دیازینون (Diazinon)، گروه زرشک (*Berberis vulgaris* L) و گروه دیازینون + زرشک (دریافت همزمان هر دو). درمان به مدت ۱۴ روز ادامه یافت. پس از پایان دوره، موش ها با کتامین (Ketamin) و زایلازین (Zylazin) بیهوش شدند و خون گیری از قلب انجام گرفت. سطوح آنزیم های ALT، AST و ALP در سرم با استفاده از کیت های استاندارد اندازه گیری شد. داده ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ تحلیل گردید و سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که سطوح آنزیم های کبدی در گروه دیازینون (ALP: ۳۴۵ U/L، ALT: ۵۸ U/L، AST: ۸۸/۲ U/L) نسبت به گروه کنترل (ALP: ۳۲۷ U/L، ALT: ۳۲/۶ U/L، AST: ۴۰/۶ U/L)، به طور معنادار افزایش یافت که حاکی از آسیب کبدی است. در گروه زرشک + دیازینون، سطوح این آنزیم ها کاهش چشمگیری داشت (ALP: ۳۲۰ U/L، ALT: ۵۴، AST: ۶۲/۳ U/L) و به سطوح نزدیک به کنترل رسید. گروه زرشک تنها نیز سطوح پایین تری نشان داد (ALP: ۲۰۸ U/L، ALT: ۴۳/۴ U/L، AST: ۴۵/۵ U/L)، که بیانگر اثر محافظتی مستقل زرشک است.

نتیجه گیری: عصاره زرشک با کاهش سطوح آنزیم های کبدی، اثر محافظتی قابل توجهی بر آسیب های ناشی از دیازینون در کبد موش ها نشان داد. این یافته ها پیشنهاد می کنند که زرشک می تواند به عنوان یک مکمل طبیعی برای کاهش آسیب سلول های کبد ناشی از مسمومیت های ارگانوفسفره مورد استفاده قرار گیرد، هر چند مطالعات بیشتر بر روی مدل های انسانی ضروری است. این پژوهش بر اهمیت ترکیبات گیاهی در مقابله با سموم محیطی تأکید دارد.

واژگان کلیدی: عصاره زرشک، دیازینون، آنزیم های کبد

مقدمه:

سموم ارگانوفسفره به علت پایداری و اثر تجمعی کم در اکوسیستم، کاربرد وسیعی دارند. دیازینون بعنوان یکی از ارگانوفسفره ها، بطور گسترده در کشاورزی و دامپزشکی استفاده می شود. این سم برای انسان و حیوان بسیار سمی است (Aluigi et al., ۲۰۱۰).

اساساً مکانیسم اولیه مسمومیت دیازینون بعلت مهار آنزیم استیل کولین استراز از طریق فسفریلاسیون می باشد، که منجر به انباشته شدن استیل کولین در سیناپس های کولینرژیک سیستم عصبی و ایجاد سندرم کولینرژیک می باشد (Abdel-Daim et al., ۲۰۱۶). امروزه این باور که سموم ارگانوفسفات تنها از طریق مهار استیل کولین استراز سبب بیماریزی می شوند، منسوخ شده است (Seyyed Ali).

Haghighitjoo et al. ۲۰۱۹. شواهد قابل توجه نشان می‌دهد رویدادهای سلولی و ملکولی ثانویه در مسمومیت تحت مزمن و مزمن دخیل هستند که استرس اکسیداتیو در این میان نقش مهمی ایفا می‌کنند، در حقیقت استرس اکسیداتیو به‌عنوان مکانیسم ثانویه سمیت ناشی از ارگانوفسفرها نظیر دیازینون مطرح شده است به طور کلی کبد در برابر استرس اکسیداتیو بسیار آسیب پذیر است (Poulose SM. ۲۰۱۳). تحقیقات اخیر، نقش آسای رادیکالهای آزاد را در ایجاد مشکلات کبد و حتی مرگ آنها نشان می‌دهد (Ratliff et al. ۲۰۱۶). زرشک ترکیبی است که در بسیاری از کشورها به دلیل کاهش چربی خون، اثرات ضد پلاکتی و بهبود گردش خون مصرف می‌شوند (Arayne & MS et al. ۲۰۲۲). (Jahan F et al. ۲۰۰۷).

به نظر می‌رسد برخی از فرآورده‌های زرشک دارای فعالیت‌های محافظ کبد، تقویت‌کننده سیستم ایمنی، ضد سرطان، پیشگیری‌کننده شیمیایی و آنتی‌اکسیدانی هستند. اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی عصاره زرشک در بافت‌های مختلف نشان داده شده است (Shekarabi et al. ۲۰۲۲).

هدف از این مطالعه، بررسی اثرات محافظتی احتمالی عصاره زرشک بر سمیت تحت حاد کبد با سم دیازینون در موش صحرایی ناشی از تاثیر آن بر آنزیم‌های کبدی آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در نمونه‌های سرمی موش‌های صحرایی می‌باشد.

مواد و روش کار:

این پژوهش به صورت تجربی و مداخله‌ای (interventional) انجام شد. ابزار گردآوری اطلاعات به روش مشاهده، نمونه‌برداری، تجهیزات آزمایشگاهی و نمونه‌برداری از حیوانات و آنالیز نمونه‌ها توسط روش‌های بیوشیمیایی انجام و یافته‌ها در چک لیست محقق ساخته جمع‌آوری شد. عصاره زرشک با استفاده از دستگاه سوکسله تهیه شد.

این پژوهش بر روی ۲۴ موش صحرایی نر نژاد ویستار ۸ هفته‌ای تهیه شده از حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی همدان با میانگین وزنی ۱۸۰ تا ۲۵۰ گرم انجام شد. موش‌های صحرایی نر در حیوان خانه دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی همدان در شرایط مساعد در اتاق حیوانات به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط جدید در دمای 22 ± 1 درجه سانتی‌گراد با غذایی یکسان و رطوبت مناسب و دوازده ساعت نور و دوازده ساعت تاریکی و تهویه مناسب و دسترسی آسان و آزاد به آب و غذا داشتند، نگه‌داری و تیمار شدند. بعد از تعیین دوزهای موثر موش‌های صحرایی نر به طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم گردیدند:

گروه اول: حیوانات گروه کنترل روزانه ۲ میلی لیتر آب مقطر را به عنوان حلال به صورت خوراکی به مدت ۱۴ روز دریافت نمودند.

گروه دوم: حیوانات این گروه سم دیازینون به صورت خوراکی (۷۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به مدت ۱۴ روز دریافت نمودند (Sonei A et al ۲۰۲۰).

گروه سوم: حیوانات این گروه عصاره زرشک به صورت خوراکی (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به مدت ۱۴ روز دریافت نمودند. (Hoshyar R et al. ۲۰۱۶).

گروه چهارم: حیوانات این گروه سم دیازینون به صورت خوراکی (۷۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و سپس عصاره زرشک (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت خوراکی به مدت ۱۴ روز دریافت نمودند.

بعد از اتمام دوره درمان با رعایت اصول اخلاقی، حیوانات با روش آسان‌کشی عمیق با کتامین (۱۰۰ میلی گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن) به علاوه زایلازین (xylazine) (۱۰ تا ۵ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی قرار گرفته و سریع بیهوش شده و سریعاً نمونه خون از قلب جمع‌آوری و با رعایت زنجیره سرد جهت تعیین فعالیت آنزیم‌های کبدی به آزمایشگاه ارسال گردید. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کبدی (AST, ALT, ALP) در سرم با استفاده از کیت‌های سنجش آنزیم‌های کبدی مرک آلمان و متناسب با پروتوکول کیت انجام شد. داده‌های جمع‌آوری شده از آزمایشات بیوشیمیایی با نرم افزار SPSS v.۲۲ آنالیز شدند. به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها، از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. در مرحله بعد آنالیز واریانس یکطرفه برای بررسی تفاوت مشاهده شده بین گروه‌های آزمایشی انجام گرفت. سپس برای سنجش اختلاف بین گروه‌ها از Post-Hoc bounferoni, استفاده گردید تمامی نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار میانگین گزارش شدند و مقایسات میانگین‌ها در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج:

- تعیین و مقایسه میزان آنزیم‌های کبدی AST - ALT - ALP در سرم گروه‌های مورد مطالعه (کنترل، دیازینون، دیازینون و عصاره زرشک و گروه دریافت‌کننده عصاره زرشک) در جدول و نمودار ۱ نشان داده شده است.

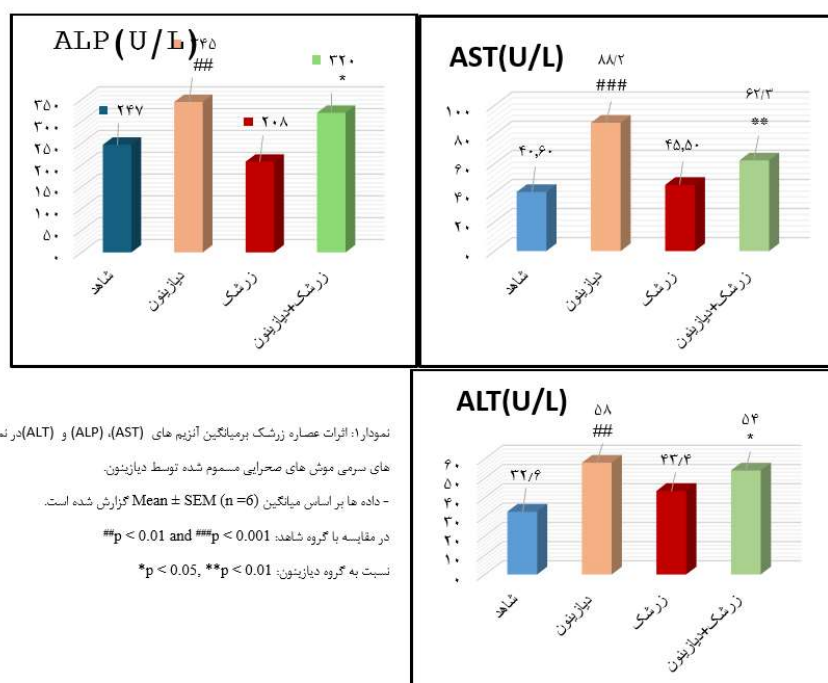
جدول شماره ۱: میانگین آنزیم های کبدی در گروه های مورد آزمایش

عنوان	کنترل	دiazینون	زرشک	دiazینون+زرشک
ALT(U/L)	۳۲,۶ ۰,۴۷	۵۸ ۰,۷۳	۴۳,۴ ۰,۴۳	۵۴ ۰,۴۶
ALP(U/L)	۲۴۷ ۰,۸۵	۳۴۵ ۰,۱۶	۲۰۸ ۰,۸۲	۳۲۰ ۰,۷۳
AST(U/L)	۴۰,۶ ۰,۴۴	۸۸,۲ ۰,۵	۴۵,۵ ۰,۴۱	۶۲,۳ ۰,۴۶

با توجه به جدول ونمودار (۱) با تجویز Diazینون به طور قابل توجهی فعالیت سرمی AST و ALP و ALT نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. این امر گویای این موضوع است که سم Diazینون باعث تخریب سلولهای کبد موجب افزایش آنزیم های کبدی گردیده است و اثر توکسیک بر سلولهای کبد دارد. در گروه دریافت کننده ترکیب عصاره زرشک و سم Diazینون میزان سطح سرمی ALT و ALP و AST در مقایسه با گروه دریافت کننده سم Diazینون به تنهایی به طور معنی داری کاهش یافته است.

بحث و نتیجه گیری:

یافته های مطالعه ما نشان می دهد که پس از تجویز Diazینون، سطح سرمی AST، ALP و ALT نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافت. همچنین یافته های ما نشان داد که پس از تجویز زرشک، سطح سرمی AST، ALP و ALT نسبت به گروه دریافت کننده Diazینون به طور معنی داری کاهش یافت. همچنین فعالیت سرمی AST، ALP و ALT در گروه تحت درمان با زرشک و Diazینون نسبت به گروه زرشک افزایش معنی داری داشت. مطالعه لطفی و همکاران در سال ۲۰۲۳ بر اثرات محافظت کبدی روغن بذر کتان بر استرس اکسیداتیو ناشی از Diazینون (DZN) در کبد موش صحرایی نشان داد که Diazینون سطح ALT، AST و ALP سرم را افزایش داد. مصرف روغن بذر کتان به طور قابل توجهی وضعیت استرس اکسیداتیو و آزمایش های عملکرد کبد را بهبود بخشید. این اثربخشی کاملاً وابسته به دوز بود. همچنین، روغن کتان تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد ناشی از Diazینون را بهبود بخشید. داده های ما نیز سمیت کبدی ناشی از Diazینون را با افزایش سطح آنزیم های کبدی نشان داد.



در یک مطالعه بالینی بر روی دانشجویان مبتلا به کبد چرب غیر الکلی و هیپرتری گلیسیریدمی، مصرف عصاره آبی زرشک سیاه به مدت ۶۰ روز منجر به کاهش معنی دار سطوح تری گلی سیرید خون، کاهش سطح آنزیم های کبدی و بهبود درجه کبد چرب در سونوگرافی شد. این اثرات حفاظتی کبدی احتمالاً به دلیل حضور ترکیبات فنولیک و آنتی اکسیدانی زرشک است که التهاب کبدی را کاهش داده و از آژاد سازی آنزیم های کبدی به خون جلوگیری می کنند. بربرین، به عنوان یکی از اصلی ترین ترکیبات زرشک، با مهار مسیرهای التهابی مانند NF- κ B و کاهش تولید سایتوکاین های التهابی، نقش کلیدی در پایین آوردن سطوح ALT و AST ایفا می کند و از آپوپتوز سلول های کبدی جلوگیری می نماید (Mohammadi & Mosavi, ۲۰۱۸). در مطالعه ای دیگر بر روی موش های تحت رژیم پر چرب، تجویز عصاره زرشک به طور معنی داری سطح ALP را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد، در حالی که سطوح ALT و AST نیز در گروه های دریافت کننده عصاره به طور قابل توجهی پایین تر بود. این کاهش می تواند نتیجه مهار اکسیداسیون لیپیدها و کاهش آسیب سلولی کبدی باشد، زیرا زرشک با افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز و خنثی سازی رادیکال های آزاد، از سلول های کبدی محافظت می کند (Arian et al ۲۰۱۵). نتایج فوق همسو با یافته های ما می باشد.

به طور کلی می توان نتیجه گیری کرد که زرشک با بهره گیری از خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی ترکیبات خود، می تواند به عنوان یک مکمل طبیعی در مدیریت آسیب های کبدی عمل کند. با این حال، مطالعات بیشتری برای تعیین دوز بهینه، مکانیسم های مولکولی دقیق و کاربرد بالینی گسترده تر مورد نیاز است.

منابع:

- Abdel-Daim, M. M. (۲۰۱۶). Synergistic protective role of ceftriaxone and ascorbic acid against subacute diazinon-induced nephrotoxicity in rats. *Cytotechnology*, ۶۸(۲), ۲۷۹-۲۸۹. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9779-z>
- Abd Elmonem, H. (۲۰۱۴). Assessment the effect of pomegranate molasses against diazinon toxicity in male rats. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, ۸(۲), ۱۳۵-۱۴۱. <https://doi.org/10.9790/2402-082135141>
- Aluigi, M., Guida, C., & Falugi, C. (۲۰۱۰). Apoptosis as a specific biomarker of diazinon toxicity in NTERA۲-D۱ cells. *Chemico-Biological Interactions*, ۱۸۷(۱-۳), ۲۹۹-۳۰۳. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.04.007>
- Arayne, M. S., Sultana, N., & Bahadur, S. S. (۲۰۰۷). The berberis story: *Berberis vulgaris* in therapeutics. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, ۲۰(۱), ۸۳-۹۲.
- Arian, B., Karimi, A., & Hajinezhad, M. R. (۲۰۱۵). Comparison between the effects of *Berberis vulgaris* aqueous extract and Lovastatin drug on liver enzymes in hyperlipidemic mice. *Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences*, ۳(۱), ۱-۷.
- Brunetti, L., Menghini, L., Orlando, G., Recinella, L., Leone, S., Epifano, F., ... & Chiavaroli, A. (۲۰۰۹). Antioxidant effects of garlic in young and aged rat brain in vitro. *Journal of Medicinal Food*, ۱۲(۵), ۱۱۶۶-۱۱۶۹. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.1123>
- Fatehi-Hassanabad, Z., Jafarzadeh, M., Tarhini, A., & Fatehi, M. (۲۰۰۵). The antihypertensive and vasodilator effects of aqueous extract from *Berberis vulgaris* fruit on hypertensive rats. *Phytotherapy Research*, ۱۹(۳), ۲۲۲-۲۲۵. <https://doi.org/10.1002/ptr.1661>
- Haghighijoo, S. A., Shariati, M., Mokhtari, M., & Moghadamnia, D. (۲۰۱۹). Effect of diazinon on functional tests and liver tissue alterations in adult rats. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*, ۲۱(۱), ۳۸-۴۵.
- Hoshyar, R., Mahboob, Z., & Zarban, A. (۲۰۱۶). The antioxidant and chemical properties of *Berberis vulgaris* and its cytotoxic effect on human breast carcinoma cells. *Cytotechnology*, ۶۸(۴), ۱۲۰۷-۱۲۱۳. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9879-4>

- Jahan, F., Alvi, S. S., & Islam, M. H. (۲۰۲۲). Berberis aristata and its secondary metabolites: Insights into nutraceutical and therapeutical applications. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, ۴, ۱۰۰۱۸۴. <https://doi.org/۱۰.۱۰۱۶/j.prmcm.۲۰۲۲.۱۰۰۱۸۴>
- Lotfi, S., Esfahani, M., Ranjbar, A., & Asl, S. S. (۲۰۲۳). Protective effect of flaxseed oil on diazinon-induced hepatotoxicity in male rats. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, ۸۹(۳), ۶۵۵–۶۶۳. <https://doi.org/۱۰.۱۰۰۷/s۴۳۵۳۸-۰۰۲۳-۰۰۱۷۰-۰>
- Mehri, F., Ranjbar, A., Shirafkan, N., Asl, S. S., & Esfahani, M. (۲۰۲۲). The protective effect of resveratrol on diazinon-induced oxidative stress and glucose hemostasis disorder in rats' liver. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, ۳۶(۷), e۲۳۰۶۳. <https://doi.org/۱۰.۱۰۰۲/jbt.۲۳۰۶۳>
- Mohammadi, S. M. A.-R., & Mosavi, S. A. A.-M. (۲۰۱۸). Effect of aqueous Berberis integerrima extract on fatty liver and triglyceridemia. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, ۲۷(۱), ۱۱۴۱–۱۱۴۹.
- Poulose, S. M., Bielinski, D. F., & Shukitt-Hale, B. (۲۰۱۳). Walnut diet reduces accumulation of polyubiquitinated proteins and inflammation in the brain of aged rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, ۲۴(۵), ۹۱۲–۹۱۹. <https://doi.org/۱۰.۱۰۱۶/j.jnutbio.۲۰۱۲.۰۶.۰۰۹>
- Shekarabi, S. P. H., Mehrgan, M. S., Ramezani, F., Dawood, M. A. O., Van Doan, H., Moonmanee, T., ... & Munglue, P. (۲۰۲۲). Effect of dietary barberry fruit (*Berberis vulgaris*) extract on immune function, antioxidant capacity, antibacterial activity, and stress-related gene expression of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Aquaculture Reports*, ۲۳, ۱۰۱۰۴۱. <https://doi.org/۱۰.۱۰۱۶/j.aqrep.۲۰۲۲.۱۰۱۰۴۱>
- Sonei, A., Fazelipour, S., Kanaani, L., & Jahromy, M. H. (۲۰۲۰). Protective effects of *Berberis vulgaris* on diazinon-induced brain damage in young male mice. *Preventive Nutrition and Food Science*, ۲۵(۱), ۶۵–۷۰. <https://doi.org/۱۰.۳۷۴۶/pnf.۲۰۲۰.۲۵.۱.۶۵>

