ORIGINAL ARTICLE

Antioxidant and Hepatoprotective Properties of Vicia cracca Against Carbon Tetrachloride Induced Oxidative Stress in Mice

Mohammad Shokrzadeh[1],
Farshid Rahimi[2],
Ali Ziar[3],
Mohammad Ali Ebrahimzadeh[4]

[1] Associate Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Pharmacy Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] MSc in Toxicology, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received June 6, 2017 Accepted November 26, 2017)

Abstract

Background and purpose: *Vicia cracca* (Papilionaceae) has 45 species in Iran. *Vicia spp.* are known medicinal plants. Some species in this family are well known with distinctive antioxidant activity. This investigation was designed to evaluate the antioxidant activities and hepatoprorective properties of *V. cracca* in mice.

Materials and methods: The aerial parts were extracted by maceration method using methanol as solvent. Antioxidative capacity was assessed by utilizing three different methods: DPPH, nitric oxide (NO) free radicals scavenging, and reducing power. Hepatoprotective activity was evaluated in 50, 100 and 200 mg/kg in CCl_4 induced oxidative toxicity. Also, the levels of serum ALT, AST and ALP and hepatic glutathione were measured.

Results: Total phenolic content was 17.2 ± 0.9 mg GAE and flavonoid content was 9.78 ± 0.25 mg QE. In DPPH radical scavenging activity, the IC_{50} value was 1.98 ± 0.25 mg ml^{-1}. The extract showed good reducing power activity indicating significant difference with that of the positive controls ($P< 0.05$). The extract increased liver glutation content and decreased ALT, AST and ALP levels in mice serum. These effects were dose dependent. The results of histopathology showed a significant decrease in inflammation and necrosis in liver tissues.

Conclusion: The findings clearly indicated moderately good antioxidant capacities and potent hepatoprotective properties of the *Vicia cracca* extract.

Keywords: *Vicia cracca*, antioxidant, phenol, flavonoids, hepatoprotection, glutathion, hepatic enzymes, CCl_4

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 27 (156): 50- 65 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۶ دی سال ۱۳۹۶ (۶۵-۵۰)

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی و محافظت کبدی اندام هوایی گیاه ماشک کلاغی Vicia cracca در مقابل سمیت ناشی از تتراکلرید کربن در کبد موش سوری

محمد شکرزاده[۱]
فرشید رحیمی[۲]
علی زیار[۳]
محمد علی ابراهیم زاده[۴]

چکیده

سابقه و هدف: ماشک کلاغی(Vicia cracca) ، از خانواده Papilionaceae دارای ۴۵ گونه در ایران است. از گونه‌های مختلف این جنس اثرات درمانی فراوانی گزارش شده است. برخی گیاهان موجود در این جنس فعالیت آنتی اکسیدانی اثبات شده‌ای دارند. این مطالعه به منظور بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماشک کلاغی و اثر حفاظتی آن در کبد موش سوری طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، عصاره‌گیری به روش خیساندن با حلال متانول انجام گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با سه روش، به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH (دی فنیل پیکریل هیدرازین)، نیتریک اکساید و تست احیا کنندگی مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس اثر حفاظت کبدی آن در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورد ارزیابی قرار گرفته و میزان گلوتاتیون کبدی و هم‌چنین میزان آنزیم‌های ALT،AST و ALP سرمی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: محتوای تام فنلی ۰/۹ ± ۱۷/۲ میلی‌گرم معادل گالیک اسید و مقدار فلاونوئید تام ۰/۲۵±۹/۷۸ میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره بود. مقدار IC50 در به دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH، برای عصاره ۱/۹۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. عصاره اثر خوبی در تست احیا کنندگی از خود نشان داد و اختلاف معنی‌داری بین عصاره و کنترل مثبت وجود داشته است ($p > ۰/۰۵$). عصاره موجب افزایش میزان گلوتاتیون کبدی گردید و میزان ALT، AST و ALP سرمی کاهش یافت. تمامی اثرات، وابسته به دوز بوده است و نتایج حاصل از مطالعه هیستوپاتولوژی کبد، کاهش قابل ملاحظه‌ای در التهاب و نکروز نشان داد.

استنتاج: نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی ماشک کلاغی، دارای اثر آنتی اکسیدانی متوسطی است اما اثر حفاظت کبدی بسیار خوبی دارد.

واژه های کلیدی: ماشک کلاغی، آنتی اکسیدان، فنل، فلاونوئید، محافظت کبدی، گلوتاتیون، آنزیم‌های کبدی، تترا کلرید کربن.

مقدمه

حضور رادیکال‌های آزاد در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها به روشنی مشخص شده است(۱). واکنش‌های بیوشیمیایی مختلفی در بدن رادیکال‌های آزاد تولید می‌کنند که توانایی تخریب مولکول‌های بزرگ را دارا می‌باشند. ترکیبات آنتی‌اکسیدان، این اثرات مخرب را متوقف کرده و موجب به دام‌اندازی رادیکال

مولف مسئول: محمدعلی ابراهیم زاده– ساری، کیلومتر ۱۸ جاده دریا، دانشکده داروسازی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران Email: zadeh20@yahoo.com
۱. دانشیار، گروه سم شناسی، مرکز تحقیقات علوم داروئی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجوئی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. کارشناس ارشد سم شناسی، کمیته تحقیقات دانشجوئی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استاد، گروه شیمی دارویی، مرکز تحقیقات علوم داروئی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۳/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۶/۴/۱۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۹/۵

های آزاد و همچنین موجب سمیت زدایی می‌گردند. غذاهای غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌های قلبی- عروقی، سرطان، بیماری‌های دژنراتیو (پارکینسون و الزایمر) بازی می‌کنند(۲،۳). به دلیل این که گیاهان منبع خوبی برای آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشند، تحقیقات در این زمینه رو به افزایش است(۴). هم‌چنین گیاهانی که غنی از ترکیبات آنتی اکسیدان هستند می‌توانند سلول‌ها را از استرس‌های اکسیداتیو محافظت کنند. امروزه مطالعات گسترده‌ای بر روی عصاره‌های گیاهی، برای دستیابی به نمونه‌هایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا صورت می‌گیرد(۵).

ماشک کلاغی (Vicia cracca)، از خانواده Papilionaceae دارای ۴۵ گونه در ایران است. از گونه‌های مختلف این جنس اثرات درمانی فراوانی گزارش شده است V. sativum .نقش حفاظتی در سرطان داشته، و علاوه بر آن فعالیت حفاظتی بر کبد در مقابل سمیت ناشی از تترا کلرید کربن و فعالیت حشره کشی نیز از آن گزارش شده است(۶،۷). فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مختلف جنس Vicia در V. cracca ، V. sativum، V. faba، V. canescence و V. sojakii ، فعالیت خوب ضد دردی و ضد التهابی V. sativa ، V. hirsuta، V. Canescence و اثر ضد میکروبی در V. faba نیز گزارش شده است(۶،۸،۱۴). هم‌چنین تاثیر روش استخراج بر فعالیت آنتی اکسیدانی V. faba مورد بررسی قرار گرفته و گزارش شده است(۱۵). فعالیت آنتی هیپوکسی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بررسی تاثیر روش‌های مختلف استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گونه V. hirsuta نیز به تازگی به چاپ رسیده است(۱۶،۱۷). هم‌چنین اثر ضد افسردگی گونه V. sojakii نیز گزارش شده است(۷). فعالیت بسیار خوب ضد افسردگی، ضد دردی و ضد التهابی در تست‌های مختلف از V. faba نیز به چاپ رسیده است(۱۸،۱۹). هیچ گزارش مستقیمی از فعالیت آنتی اکسیدانی و تاثیر روش‌های مختلف استخراج در گیاه V. cracca به دست نیامده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی اتانولی چندین گیاه از کشور ترکیه به روش‌های DPPH و FRAP مورد ارزیابی قرار گرفت(۸). در متن مقاله آمده است که تست FRAP به علت کمبود عصاره‌ی اندام هوایی V. cracca روی این عصاره انجام نشده است. اما فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH عصاره‌ی اندام هوایی V. cracca از سایر گونه‌ای تست شده کم‌تر بوده است. این عصاره در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی لیتر، تنها حدود ۱۳ درصد اثر مهاری از خود نشان داد. همچنین در این مقاله به دلیل آن که هیچ فنل و فلاونوئیدی در این گیاه یافت نشده است، می‌توان توضیح داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه کم بوده است.

به دلیل تفاوت گونه‌ی ایرانی با گونه‌ی موجود در سایر نقاط، مطالعه بر روی گونه‌ی ایرانی انجام گرفت. با سنجش میزان فنل و فلاونوئیدی در حدود ۳۵۰ گونه گیاهی در مازندران، تاکنون گیاهی که میزان فنل و فلاونوئید آن حدود صفر باشد، مشاهده نشده است(۲۰،۲۱). در ترکیه از برگ و دانه‌های این گیاه به عنوان علوفه و هم‌چنین غذای پرندگان اهلی استفاده می‌شود. گیاه پخته شده به عنوان شیر افزا و برگ‌های آن به عنوان نوشیدنی به جای چای استفاده می‌شود(۸). این مطالعه به منظور تعیین محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی، بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه ماشک کلاغی V. cracca و اثر حفاظتی آن بر کبد در موش سوری انجام شده است.

مواد و روش ها

نمونه گیاهی

در این مطالعه تجربی، اندام هوایی گیاه ماشک کلاغی V. cracca از اطراف ساری جمع‌آوری شد. نمونه هرباریومی در هرباریوم دانشکده بیولوژی دانشگاه آزاد قائم شهر به شماره ۷۹۴ نگهداری می‌شود. این

بخش گیاه در سایه خشک گردید و بعد از تبدیل به قطعات ریز، عصاره‌گیری به روش خیساندن انجام گرفت.به منظور عصاره گیری به روش خیساندن، ۴۰ گرم از برگ خشک گیاه با ۱۲۰ میلی‌لیتر متانول مخلوط، و مجموعه به مدت ۲۴ ساعت رها گردید. روز بعد فاز آلی (متانول) جدا گردید و مجددا به حلال جدید اضافه شد. این عمل برای سه بار تکرار گردید. در روز آخر، مجموعه حلال آلی توسط دستگاه تبخیر کننده چرخان حذف گردید(۵).

تعیین محتوای کلی فنولی و فلاونوئید

محتوای تام فنولی از طریق متد فولین سیو کالتیو انجام شد(۲۲). ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره با غلظت ۰/۵ میلی گرم / میلی‌لیتر با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر و ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتیو مخلوط شد. و ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم (۷/۵ درصد) به آن اضافه گردید. جذب نمونه پس از ۲ ساعت در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر ماوراء بنفش در ۷۶۰ نانو متر اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت مقادیر هم ارز با استاندارد اسید گالیک بیان گردید. میانگین جذب حاصل، در معادله خط به دست آمده از ترسیم منحنی استاندارد گالیک اسید قرار داده شد و نتیجه به عنوان محتوای تام فنولی عصاره به صورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره، گزارش گردید. آزمایشات برای هر عصاره و استاندارد ۳ بار تکرار شد.

میزان محتوای تام فلاونوئید عصاره از طریق روش‌های رنگ سنجی مورد ارزیابی قرار گرفت(۲۲). ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم / میلی‌لیتر با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول مخلوط، و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد. آن‌گاه ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد و مجموعه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانو متر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی- ماوراء بنفش اندازه‌گیری شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره گزارش گردید. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین آن‌ها گزارش گردید.

ارزیابی میزان توانایی به دام اندازی رادیکال DPPH

به ۱/۵ میلی‌لیتر از عصاره، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه گردید و مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده شد. سپس جذب مخلوط توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV در ۵۱۷ نانو متر با بلانک متانول قرائت گردید. اسکوربیک اسید و BHA به عنوان استاندارد استفاده شدند و میزان IC50 (غلظتی از هر عصاره که لازم است تا ۵۰ درصد رادیکال‌ها پاکسازی شوند) برای عصاره تعیین شد. در نهایت درصد به دام اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول شماره ۱ محاسبه گردید.

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B}\right)\times 100 \qquad \text{(فرمول شماره ۱)}$$

در فرمول شماره ۱، =ABجذب بلانک و =AS جذب نمونه یا استاندارد می‌باشد(۲۲).

تعیین قدرت احیاء کنندگی

میزان قدرت احیاءکنندگی عصاره‌ها از طریق متد ین و چن ارزیابی شد. غلظت‌های مختلف از عصاره تهیه گردید. یک میلی‌لیتر از هر غلظت با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفاته ۰/۲ مولار pH برابر با ۶/۵ و ۱ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد پتاسیم فری سیانید مخلوط شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری گردید، سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول‌تری کلرواستیک اسید به نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه

سانتریفوژ ۲۵۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام این مرحله ۰/۵ میلی‌لیتر از قسمت بالای محلول با ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد فریک کلرید (FeCl3) به آن اضافه گردید. سپس جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانو متر قرائت شد. در این آزمایش آسکوربیک اسید با غلظت‌های۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر به عنوان استاندارد استفاده شد. آزمایش برای هر نمونه و استاندارد سه بار تکرار گردید(۲۲).

ارزیابی میزان به دام اندازی نیتریک اکساید

سدیم نیتروپروساید در محلول‌های آبی در pH فیزیولوژیک به آهستگی نیتریک اکساید تولید می‌کند، که با اکسیژن محیط واکنش داده و یون نیتریت تولید می‌گردد. یون نیتریت تولید شده در حضور واکنش‌گر گریس سنجیده می‌شود. به دام اندازی نیتریک اکساید در رقابت با اکسیژن، موجب کاهش تولید یون نیتریت خواهد شد. به این منظور سدیم نیتروپروساید (۱۰ میلی مولار) در بافر سالین فسفات با غلظت‌های مختلفی از عصاره مجاور شد. مجموعه به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. همان مخلوط واکنش بدون عصاره مورد (اما مقادیر هم حجم آب مقطر) به عنوان بلانک به کار گرفته شد. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون، ۰/۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر گریس (شامل، سولفانیل آمید ۱ درصد، نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید ۰/۱ درصد در اسید فسفریک ۲ درصد) اضافه شد. جذب مخلوط در ۵۴۶ نانو متر در مقابل بلانک قرائت گردید. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین آن‌ها گزارش گردید. کوئرستین به عنوان استاندارد برای مقایسه به کار گرفته شد. میانگین درصد به دام اندازی هم طبق فرمول شماره ۱ محاسبه گردید و بر اساس آن IC50 برای تمامی عصاره‌ها بیان شد.

روش تست‌های حیوانی

برای آماده‌سازی نمونه و حیوان مورد مطالعه، دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره به کمک انحلال در نرمال سالین تهیه شد. در تمامی موارد ۰/۵ میلی‌لیتر برای تزریق به کار رفت. از موش‌های سوری نر با سن ۱۰-۸ هفته‌ای از مرکز حیوانات آزمایشگاهی د.ع.پ. مازندران استفاده گردید. گروه‌های مورد مطالعه (در هر گروه ۶ سر موش سوری با وزن ۲۵-۲۲ گرم در قفس‌های مجزا تحت وضعیت کنترل شده درجه حرارت (بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) و روشنایی (دوره ای ۱۲ ساعت روشن ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شد. پودر غذا و آب جهت تغذیه در دسترس آن‌ها قرار گرفت.

برای تزریق داخل صفاقی و جراحی حیوان، از روغن زیتون به عنوان حلال تتراکلریدکربن استفاده شد. در تمام مراحل انجام کار تتراکلرید کربن به روشip، به میزان 1 ml/kgانجام گردید. در هر گروه ۶ سر حیوان به مدت ۲۸ روز مورد مطالعه قرار گرفت(۲۳).

حیوانات به ۶ گروه تقسیم‌بندی شدند وتزریق حیوانات به صورت زیر انجام گرفت.

گروه۱: گروه شاهد ۱ بار در روز به مدت ۲۸ روز نرمال سالین دریافت کردند.

گروه۲: گروه کنترل به میزانml/kg ۱ ، ۲ بار در هفته به مدت ۲۸ روز تتراکلرید کربن دریافت کردند.

گروه۳: این گروه به میزان ۲ بار در هفته، و دوز ۵۰ mg/kg/day عصاره به مدت ۲۸ روز تتراکلرید کربن دریافت کردند.

گروه۴: این گروه به میزان ۲ بار در هفته، و دوز ۱۰۰ mg/kg/day عصاره به مدت ۲۸ روز تتراکلرید کربن دریافت کردند.

گروه۵: این گروه به میزان ۲ بار در هفته، و دوز ۱۰۰ mg/kg/day عصاره به مدت ۲۸ روز تتراکلرید کربن دریافت کردند.

گروه۶: این گروه به میزان ۲ بار در هفته، و دوز ۵۰ mg/kg/day ویتامین ث به مدت ۲۸ روزتتراکلرید کربن دریافت کردند.

جراحی حیوان

با رعایت اصول اخلاقی، ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق، حیوانات با مخلوطی از کتامین و زایلازین بیهوش و سپس کشته شدند. بلافاصله پس از شکافتن شکم و سینه‌ی حیوان، حدود ۲ میلی‌لیتر خون با سرنگ انسولین از قلب خارج و سانتریفوژ شد تا اندازه‌گیری آنزیم‌ها از سرم حیوانات صورت پذیرد. سرم مربوط به هر حیوان به لوله‌های استریل فالکون منتقل گردید و در فریزر نگهداری شد تا در روز کاری مناسب سطح سرمی آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز(ALT) ، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) اندازه‌گیری شود. بلافاصله پس از خون‌گیری، کبد حیوان برای اندازه‌گیری گلوتاتیون به روش المن و بررسی پاتولوژی خارج به وسیله سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و در فرمالین ۱۰ درصد، برای تثبیت بافت و انجام مطالعات هیستوپاتولوژی قرار گرفت(۲۳).

۰/۱ گرم از بافت کبد به لوله هموژنایزر انتقال داده شد. ۱ میلی‌لیتر EDTA به آن اضافه شد و چند بار عمل هموژن کردن با پیستون انجام گرفت تا مخلوط یکنواختی حاصل گردید. سپس محتویات لوله هموژنایزر به لوله سانتریفیوژ یخچال دار انتقال یافت. در مرحله بعدی به لوله سانتریفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتر ۱۰ درصد TCA جهت رسوب پروتئین‌ها اضافه شد. لوله‌ها در دور ۳۵۰۰، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و ۱ میلی‌لیتر از محلول، به لوله آزمایش منتقل گردید و به آن ۲/۵ میلی‌لیتر بافر تریس ۰/۴ مولار با pH ۸/۹ = و ۰/۵ میلی‌لیتر DTNB اضافه شد. سپس لوله به خوبی تکان داده شد تا رنگ زرد یکنواختی در لوله حاصل گردید. در نهایت جذب محلول حاصله در nm ۴۱۲ خوانده شد و با کمک منحنی استاندارد، غلظت گلوتاتیون اندازه‌گیری شد(۲۴،۲۳).

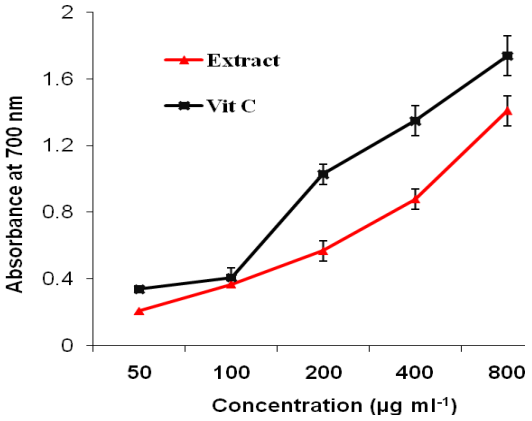
برای اندازه‌گیری ALT، AST و ALP سرم، بعد از جراحی شکم موش و کنار زدن پرده‌های رویی، به طور مستقیم از قلب موش ۱/۵ الی ۲ میلی‌لیتر خون دریافت شد و به لوله سانتریفیوژ منتقل گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه گذاشته شد تا انکوبه شود، بعد با دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس حدود ۱ میلی‌لیتر سرم به دست آمد. برای سنجش هر سه آنزیم، AST، ALT و ALP، از کیت استفاده شد. نتیجه به دست آمده از این سه آنزیم به صورت U/L گزارش گردید(۲۴،۲۳).

برای هیستوپاتولوژی، برش برداری از نمونه‌ها، از بخش مرکزی نمونه کبدی در فرمالین ۱۰ درصد، برش‌های طولی و عرضی گرفته شد و در بسکت‌های مخصوص دستگاه Tissue Processor قرار گرفت و کد مربوط به نمونه در آن گذاشته شد. بسکت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت تا فرمالین به قسمت‌های درونی بافت نیز نفوذ کند. سپس بسکت‌ها داخل دستگاه TissueProcessor که دارای مراحل مختلف به ترتیب شامل فرمالین ۱۰ درصد، الکل ۷۰ درصد، الکل ۸۰ درصد، الکل ۹۰ درصد، الکل ۱۰۰ درصد (مطلق)، گزیلن و پارافین (دمای پارافین تقریبا ۶۴ درجه سانتی‌گراد) است، گذاشته شد. پس از خروج بسکت‌ها از دستگاه Tissue Processor ، بافت‌ها از بسکت خارج، و پارافینه شدند. در نهایت پس از تهیه‌ی برش‌های مناسب، بافت برای مرحله رنگ آمیزی آماده گردید. سپس رنگ آمیزی آن‌ها با متد گیمسا انجام شد.

نتایج حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS 16 به صورت آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) تجزیه وتحلیل شد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش گردید. هم‌چنین برای مقایسه بین گروه‌ها از روش tukey test استفاده شد. در مقایسه میانگین بین گروه‌ها، $p > ۰/۰۵$، معنادار تلقی گردید. برای ترسیم منحنی‌ها از اکسل ۲۰۱۰ استفاده شده است. مقادیر IC_{50} از روی رگرسیون خطی بین درصد مهار و غلظت‌های مربوطه به دست آمد.

یافته ها

بـا انـدازه‌گیـری وزن عصـاره پـس از انجـام عصاره‌گیری، بازده عصاره‌گیری ۱۳/۵ درصد بـه دسـت آمد. در اندازه‌گیری فنل تام در عصاره با متد فولین سیو کاتیو، محتوای تام فنولی موجود در عصـاره معـادل ۰/۹ ± ۱۷/۲میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره تعیـین شد. با اندازه‌گیری فلاونوئیـد تـام در عصـاره بـا کمـک آلومینیوم کلراید، محتـوای تـام فلاونوئیـدی در عصـاره معادل ۰/۲۵ ± ۹/۷۸ میلی گـرم کوئرسـتین در هـر گـرم عصـاره تعیـین گردیـد. مقـدار IC50 در بـه دام انـدازی رادیکال آزاد DPPH، برای عصـاره ۱/۹۸ میلـی‌گـرم در میلـی‌لیتـر بـه دسـت آمـد. هـم‌چنـین مقـدار IC_{50} بـرای کوئرستین ۲۰۱/۰۷ میکروگرم در میلی‌لیتر و مقدار IC_{50} بـرای ویتـامین ث ۴۹۲/۷۶ میکروگـرم در میلـی‌لیتـر بـه دست آمد. نتایج حاصل از سنجش قدرت احیا کنندگی در نمودار شماره ۱ نشان داده شـده اسـت. ویتـامین c بـه عنـوان کنتـرل مثبـت بـه کـار رفـت. در تمـامی مـوارد اختلاف معنی‌داری بـین عصـاره و کنتـرل مثبـت وجـود داشته است ($p > ۰/۰۵$).



نمودار شماره ۱: میـزان قـدرت احیـا کننـدگی عصـاره گیاه ماشک کلاغی، ویتامین c به عنوان کنترل مثبـت بـه کار رفته است.

نتایج سنجش قـدرت بـه دام انـدازی رادیکـال آزاد نیتریـک اکسـاید در جـدول شـماره ۱ نشـان داده شـده است. عصاره فعالیـت خـوبی در ایـن تسـت نشـان نـداد. عصاره در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلـی‌لیتـر، موجـب مهـار ۱/۲۹ ± ۴۶/۴۱ درصـدی شـد. میـزان IC50 بـرای کوئرستین که به عنوان کنترل مثبت به کار رفـت و برابـر ۱۹۵ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

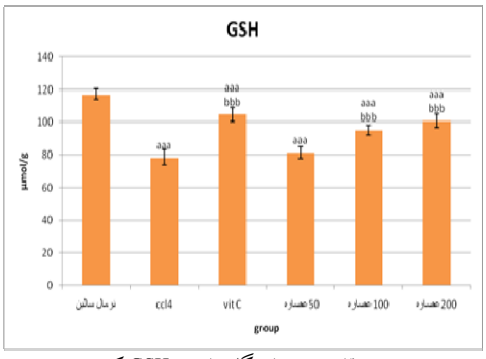
جدول شماره ۱: میزان به دام اندازی نیتریک اکساید توسط عصاره گیاه ماشک کلاغی

غلظت (میکرو گرم در میلی لیتر)	میزان جذب	درصد به دام اندازی (٪)
۸۰۰	۱/۲۱	۴۶/۴۱± ۱/۲۹
۴۰۰	۱/۴۴	۳۵/۱۲± ۱/۶۷
۲۰۰	۱/۵۳	۳۱/۸۷± ۰/۸۸
۱۰۰	۱/۸۹	۱۴/۸۴± ۰/۷۰
۵۰	۲/۰۶	۷/۲۷±۰/۱۵

هریک ازمقادیر جدول حاصل، میـانگین بـه دسـت آمـده از سـه آزمـایش مختلـف ± انحـراف اسـتاندارد می‌باشد.

نتایج تست‌های حیوانی

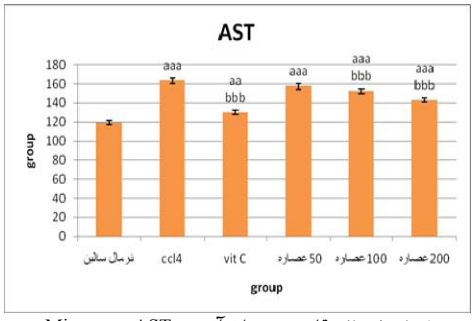
نتایج مربوط به اندازه‌گیـری گلوتـاتیون GSH کبـد موش سوری (µmol/g) در گروه‌های مورد مطالعـه بعـد از مواجه مزمن با عصاره هیدروالکلی ماشک کلاغی در نمودار شماره ۱ آمده است.



نمودار شماره ۱: مقایسه میزان گلوتاتیون GSH کبد موش سوری (µmol/g) در گروه‌های مورد مطالعه با گروه دریافت کننده تتراکلرید کربن (کنترل) و نرمال سالین (شاهد ، ویتامین c به عنوان کنترل مثبت به کار رفته است.، aaa: معنا داری با PValue 001/0 در مقایسه با نرمال سالین، bbb: معنا داری با PValue 001/0 در مقایسه با تتراکلرید کربن

نتایج مربوط به اندازه‌گیری گلوتاتیون GSH کبد موش سوری نشان داد که بیش‌ترین مقدار میزان آنزیم گلوتاتیون در گروه نرمال سالین (شاهد) برابر µmol/g ۳/۳۱ ± ۱۱۷/۱۶ وجود داشته است و کم‌ترین مقدار میزان آنزیم گلوتاتیون در گروه تتراکلرید کربن برابر µmol/g ۶/۶۸ ± ۷۸/۳۳ بوده است. عصاره، به شکل معنی‌دار و وابسته به دوز موجب افزایش مقدار گلوتاتیون در موش‌ها شده است.

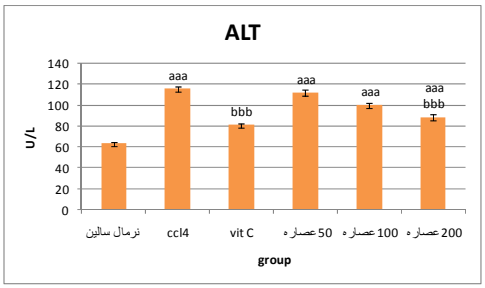
مقایسه میزان آنزیم AST در سرم موش سوری در گروه‌های مورد مطالعه با گروه دریافت کننده تتراکلرید کربن و نرمال سالین در نمودار شماره ۲ بیان شده است.



نمودار شماره ۲: مقایسه میزان آنزیم AST سرم Miceدر گروه‌های مورد مطالعه با گروه دریافت کننده تتراکلرید کربن و نرمال سالین. ویتامین c به عنوان کنترل مثبت به کار رفته است. aaa: معنا داری با PValue = ۰/۰۰۱ در مقایسه با نرمال سالین، aa: معنا داری با PValue = ۰/۰۱ در مقایسه با نرمال سالین، bbb: معنا داری با PValue = ۰/۰۰۱ در مقایسه با تتراکلرید کربن

مقایسه میزان آنزیم AST سرم موش سوری در گروه‌های مورد مطالعه با گروه دریافت کننده تتراکلرید کربن و نرمال سالین در نمودار شماره ۲ مشخص شده است. بیش‌ترین مقدار میزان AST سرم، مربوط به گروه دریافت کننده‌ی تترا کلرید کربن با ۲/۶۸ ± ۱۶۸/۸۳ U/L ، کم‌ترین مقدار میزان AST در سرم مربوط به گروه دریافت کننده‌ی نرمال سالین ۳/۳۱ ± ۱۱۹/۵۰ و ویتامین ث ۳/۱۸ ± ۱۳۰/۰۰ U/L می‌باشد. عصاره به شکل معنی‌دار و وابسته به دوز، موجب کاهش میزان آنزیم AST در سرم موش سوری نسبت به گروه دریافت کننده تتراکلرید کربن شد.

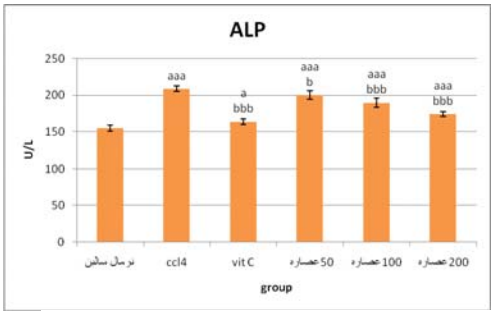
مقایسه میزان آنزیم ALT سرم موش سوری در گروه‌های مورد مطالعه با گروه دریافت کننده تتراکلرید کربن و نرمال سالین در نمودار شماره ۳ بیان شده است.



نمودار شماره ۳: مقایسه میزان آنزیم ALT سرم موش سوری در گروه‌های مورد مطالعه با گروه دریافت‌کننده تتراکلرید کربن و نرمال سالین، ویتامین c به عنوان کنترل مثبت به کار رفته است.، aaa: معناداری با PValue = ۰/۰۰۱ در مقایسه با نرمال سالین، bbb: معنا داری با PValue = ۰/۰۰۱ در مقایسه با تتراکلرید کربن

بیشترین مقدار میزان ALT سرم مربوط به گروه دریافت‌کننده‌ی تترا کلرید کربن برابر با ۴/۵۰ ± U/L۱۱۵/۱۶ ، کم‌ترین مقدار میزان ALT در سرم مربوط به گروه دریافت‌کننده‌ی نرمال سالین برابر با ۱/۵۲ ± ۶۳/۱۶ و ویتامین c برابر با ۱/۶۳ ± ۸۰/۶۶ U/L می‌باشد. عصاره به شکل معنی‌دار و وابسته به دوز، موجب کاهش میزان آنزیم ALT در سرم موش سوری نسبت به گروه دریافت کننده تتراکلرید کربن گردید.

مقایسه میزان آنزیم ALP سرم موش سوری در گروه‌های مورد مطالعه با گروه دریافت کننده تتراکلرید کربن و نرمال سالین در نمودار شماره ۴ مشخص شده است.



نمودار شماره ٤: مقایسه میزان آنزیم ALP سرم موش سوری در گروه‌های مورد مطالعه با گروه دریافت کننده تتراکلرید کربن و نرمال سالین، ویتامین c به عنوان کنترل مثبت به کار رفته است.، aaa: معناداری با PValue = ۰/۰۰۱ در مقایسه با نرمال سالین، a: معنا داری با PValue = ۰/۰۵ در مقایسه با نرمال سالین، bbb: معنا داری با PValue = ۰/۰۰۱ در مقایسه با تتراکلرید کربن

بیش‌ترین مقدار میزان ALP سرم مربوط به گروه دریافت کننده ی تترا کلرید کربن برابر با ۳/۵۱ ± ۲۰۹/۰۱U/L ، کم‌ترین مقدار میزان ALP در سرم مربوط به گروه دریافت کننده نرمال سالین برابر با ۳/۷۹ ± ۱۵۴/۸۳ و ویتامین ث ۳/۰۶ ± ۱۶۳/۸۳U/L می‌باشد. عصاره به شکل معنی‌دار و وابسته به دوز، موجب کاهش میزان آنزیم ALP در سرم موش سوری نسبت به گروه دریافت کننده تتراکلرید کربن شد.

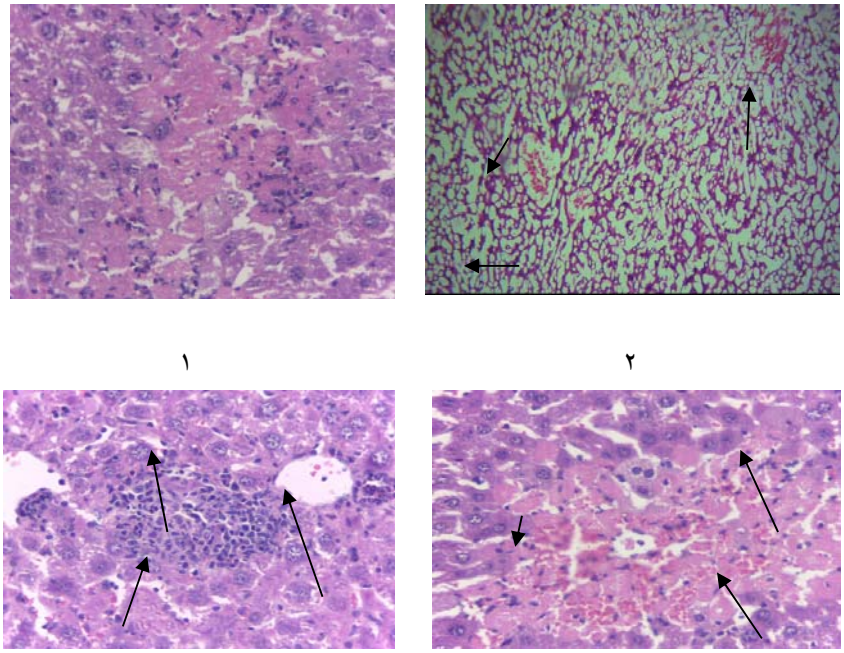
نتایج حاصل از مطالعات هیستوپاتولوژی کبد در ۴ گروه اول به شرح زیر است.

گروه اول: در گروه دریافت کننده‌ی نرمال سالین، کبد نرمال و بدون التهاب در ناحیه‌ی پروتال و نکروز هپاتوسیت‌ها، بوده است.سلول‌ها بدون خونریزی، و عروق مرکزی طبیعی بود.

گروه دوم: در گروه دریافت کننده‌ی تترا کلرید کربن، التهاب شدید و نکروز وسیع هپاتوسیت‌ها دیده شد. نکروز در اطراف عروق مرکزی و خونریزی وسیع مشاهده گردید هم‌چنین التهاب موضعی و نکروز پارانشیمال وسیع در سلول‌های کبدی دیده شد.

گروه سوم: در گروه دریافت کننده عصاره ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم وزن بدن موش، خونریزی عروق مرکزی کم‌تر گردید. التهاب موضعی بسیار کم مشاهده شد و نکروز سلول‌های پارانشیمال قابل رویت نبوده است هم‌چنین التهاب پرتال تراکت‌ها نیز کم‌تر گردید.

گروه چهارم: در گروه دریافت کننده عصاره ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش، التهاب پرتال تراکت‌ها و التهاب موضعی دیده نشد. هم‌چنین نکروز در هپاتوسیت‌ها کم گردید و خونریزی به صورت بسیار پراکنده دیده شد (شکل ۱).



۱ ۲

۳ ۴

شکل شماره ۱: نتایج حاصل از مطالعات هیستوپاتولوژی کبد موش سوری در گروه کنترل منفی، گروه دریافت کننده تترا کلرید کربن و گروه دریافت کننده عصاره ماشک کلاغی.۱: نرمال سالین،۲: تتراکلرید کربن، ۳: عصاره ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم، ۴: عصاره ۲۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم

بحث

امروزه بیماری‌های کبدی یکی از مشکلات مهم جوامع بشری بوده است و یافتن دارویی مؤثر در درمان این اختلالات مورد توجه محققین می‌باشد(۲۵). تولید ذرات فعال اکسیژن و القای استرس اکسیداتیو مکانیسم‌های اصلی ایجاد آسیب کبدی، توسط بسیاری از سموم کبدی است(۲۳). کبد یکی از بزرگ‌ترین اعضا بدن بوده که ۳ تا ۵ درصد توده‌ی بدن را تشکیل می‌دهد.به دلیل آن که یکی از مهم‌ترین فعالیت کبد، سم زدایی مواد می‌باشد در اکثر موارد، از آنزیم‌های سیتوکروم P_{450} استفاده می‌شود که گاهی با ایجاد متابولیت‌های سمی، می‌تواند موجب آسیب‌های بافت‌های مختلف از جمله خود کبد شود(۲۶). به دلیل این که بیماری‌های کبدی و بروز آسیب به بافت آن تهدیدی برای حیات می‌باشد، تلاش در پی کشف و استفاده از ترکیباتی که اثر حفاظتی کبدی داشته باشند رو به افزایش است و هم‌چنین توجه به طب‌های مکمل و درمان با ترکیبات طبیعی با منشا گیاهی نیز افزایش یافته است(۲۷). تیواستامید، اتانول، استامینوفن و تتراکلرید کربن از جمله موادی هستند که پس از ورود به بدن، توسط این سیستم آنزیمی متابولیزه می‌شوند(۲۶). تتراکلرید کربن یک حلال آلی است که به واسطه تولید این ذرات و القاء استرس اکسیداتیو به طور گسترده‌ای به عنوان یک مدل سمیت کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرد(۲۸). در ایجاد سمیت کبدی توسط CCl4 پیوند بین کربن و کلر شکسته شده و رادیکال آزاد تری کلرومتیل به وجود می‌آید(۲۹). اندازه‌گیری سطوح برخی آنزیم‌های سرمی به عنوان شناساگر (بیومارکر) در آسیب‌های کبدی استفاده می‌شوند. این آنزیم‌ها از سیتوزول و اندامک‌ها به خون رها می‌شوند AST .به میزان زیاد در بافت‌های کبد، قلب و عضله اسکلتی و به

میزان کم‌تر در مغز، پانکراس، ریه، لکوسیت و اریتروسیت یافت می‌شود. چنان چه این بافت‌ها دچار ضایعه شوند، میزان AST سرم افزایش می‌یابد. در صورتی که ALT به مقدار زیاد فقط در بافت کبد یافت می‌شود سطح سرمی ALT در نکروز کبدی افزایش می‌یابد به همین دلیل اندازه‌گیری سطح این آنزیم یک تست انتخابی برای نکروز کبدی است(۲۳،۳۰). سطح سرمی ALT معیار حساس تر و اختصاصی تری نسبت به AST برای آسیب کبدی می‌باشد(۳۰). اندازه‌گیری این آنزیم (ALT) در بیماری‌های کبدی، صفراوی و استخوانی اهمیت بیش‌تری دارد(۳۱). در مطالعات قبلی، آسیب کبدی ناشی از تجویز ۱ mg/kg از تترا کلرید کربن به شکل داخل صفاقی به خوبی به کار رفت و اثر آن اثبات شده است(۳۲،۳۳). در این مطالعه تجویز ۱ mg/kg از تترا کلرید کربن به شکل داخل صفاقی، باعث افزایش معنی‌داری در میزان آنزیم‌های AST، ALTو ALP سرم خون نسبت به گروه شاهد شد. تجویز عصاره دو بار در هفته برای ۴ هفته، به طور قابل ملاحظه‌ای موجب کاهش میزان آنزیم‌های AST ، ALT و ALP سرم خون شد و مقادیر این آنزیم‌ها را به سطح نرمال نزدیک‌تر کرد.

گیاهان فراوانی در درمان مسمومیت‌ها و بیماری‌های کبدی در طب سنتی کاربرد دارند. گزارش شده که ۱۷۰ جزء گیاهی از ۱۱۰ گیاه متعلق به ۵۵ خانواده نقش حفاظت کبدی دارند. گیاهانی مانند خار مریم، قاصدک، شاه تره، زرد چوبه، کنگر فرنگی و چندین گیاه دیگر در درمان بیماری‌های کبدی موثر بوده‌اند. تعدادی از گیاهان تیره نعناع مانند اکلیل کوهی و برخی گیاهان از جنس سالویا از این خانواده، اثرات محافظت کبدی از خود نشان می‌دهند(۳۴).

اثر حفاظت کبدی علف هفت بند (Polygonum) نیز گزارش شده است(۲۳). تجویز دوز تتراکلرید کربن به صورت داخل صفاقی باعث افزایش معنی‌داری در میزان آنزیم‌های کبدی ALT و AST در پلاسما و میزان پراکسیداسیون لیپیدی در بافت کبدی گردید. تجویز عصاره متانولی گیاه هفت بند در دوزهای مختلف ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ mg/kg موجب کاهش معنی‌داری در سطح آنزیم‌های کبدی و میزان پراکسیداسیون لیپیدی شد. چندین گیاه دارویی جهت درمان مسمومیت و بیماری‌های کبدی در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که عمدتا حاوی ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئید ی هستند که از مهم‌ترین آنتی اکسیدان‌ها می‌باشند(۳۵). تعدادی دیگری از گیاهان دارویی به عنوان محافظ کبدی بررسی و مورد تایید قرار گرفته‌اند که می‌توان به کنگر فرنگی (Cynara scolymus) ، رازیانه (Feniculum vulgare)، تاجریزی(Solanum nigrum) ، زنیان (Carum copticum) و هلیله (Terminalia chebula) اشاره نمود. اثر محافظت کبدی این گیاهان به وجود گلیکوزید، فلاونوئید، تری‌ترپن‌ها و فنول ها نسبت داده شده است(۳۶،۳۷).

در گزارشی دیگر، تتراکلریدکربن سبب افزایش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی در موش شده است در حالی که تیمار با عصاره کرفس با غلظت‌های ۲۰۰ mg/kg تا ۴۰۰ موجب کاهش شاخص‌های فوق گردیده است(۳۸). غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره میوه زرشک به صورت خوراکی به موش تجویز شده است. تیمار با تتراکلریدکربن سطح سرمی آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز سرم موش‌های صحرایی را به صورت معنی‌داری افزایش داده و تیمار با عصاره متانولی میوه زرشک، سطوح افزایش یافته و آنزیم‌ها را به صورت معنی‌داری تقریبا تا حد طبیعی تغییر داد(۳۹).

گزارش شده است که تزریق درون صفاقی تتراکلرید کربن در موش باعث افزایش فعالیت AST ، ALT، ALPبه ترتیب به میزان ۱۱۷/۸۵، ۴۶۸/۶ و ۱۳۴/۹۷ درصد در مقایسه با گروه کنترل شده است (۲۵). مصرف عصاره گیاه بیلهر (Dorema auchri) به میزان

۲۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم به گاواژ، سبب گردید این فاکتورها به طور معنی‌داری به وضعیت نرمال نزدیک شوند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد عصاره گیاه بیلهر در برابر آسیب‌های کبدی ایجاد شده توسط تتراکلریدکربن دارای اثرات محافظتی است(۲۵). در مطالعه‌ی دیگری، تتراکلریدکربن با دوز ۱/۲۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم باعث ایجاد آسیب کبدی شده است و میزان ترانس‌آمینازهای خون را به میزان قابل توجه‌ای افزایش داد. تجویز عصاره صمغ پسته با دوزهای ۰/۵ و ۱ گرم به کیلوگرم قبل از تتراکلریدکربن به طور مشخصی از افزایش ALT جلوگیری کرد ولی اثری بر روی غلظت AST نداشته است(۴۰).

گلوتاتیون فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی داخل بدن می‌باشد. این ترکیب در حالت طبیعی به فرم احیا شده و در حال تعادل با فرم اکسید شده‌ی خود می‌باشد(۴۱). موادی مانند ویتامین c و ویتامین E مسیر را معکوس کرده تا به طور مجدد گلوتاتیوم اولیه تولید شود(۴۲). در این مطالعه، تجویز عصاره به شکل معنی‌دار و وابسته به دوز موجب افزایش مقدار گلوتاتیون در موش‌ها شد. اثر محافظتی کبدی عصاره به خوبی با شواهد هیستوپاتولوژی نیز تایید شده است.

از سویی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان را می‌توان عمدتا به حضور ترکیبات فنولی در آن نسبت داد(۱۸). این ترکیبات تقریبا در تمام بخش‌های گیاه وجود دارند و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک نقش دارند. از پلی فنول‌ها فعالیت‌های بیولوژیکی متفاوتی از جمله، فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد آلرژی و گشاد کننده عروق گزارش شده است(۱۸). در اندازه‌گیری فنل تام در عصاره، محتوای تام فنولی موجود در عصاره معادل ۰/۹ ± ۱۷/۲ میلی گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره تعیین شد. این میزان بسیار کم‌تر از محتوای تام فنلی گیاهان دیگر در منطقه‌ی مازندران است(۲۰،۲۱). فلاونوئیدها تقریبا حدود نیمی از ۸۰۰۰ فنول های شناسایی شده را تشکیل می‌دهند(۱۸). فلاونوئیدها مسئول ایجاد رنگ در گ‌ها و میوه‌ها می‌باشند و به علت فعالیت آنتی‌اکسیدانی در صنایع دارویی و غذایی مورد توجه هستند(۱۸). مکانسیم عمل فلاونوئیدها به دام‌اندازی رادیکال آزاد و یا شلاته کردن یون‌ها می‌باشد. فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی به عنوان پیشگیری کننده در پیشرفت سرطان و بیماری‌های قلبی شناخته شده‌اند(۱۸). با اندازه‌گیری فلاونوئید تام در عصاره، محتوای تام فلاونوئیدی در عصاره معادل ۰/۲۵ ±۹/۷۸ میلی گرم کوئرستین در هر گرم عصاره تعیین شد. این مقدار نسبت به محتوای تام فلاونوئیدی بسیاری از گیاهان منطقه‌ی مازندران، کم است(۲۰،۲۱).

مدل به دام‌اندازی رادیکال DPPH به طور گسترده‌ای در ارزیابی توانایی به دام‌اندازی رادیکال آزاد در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد(۴۳). در این تست ویتامین ث و BHA (بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول) به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. مقدار IC_{50} در به دام اندازی رادیکال آزادDPPH ، برای عصاره ۱/۹۸ میلی گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. قدرت عصاره در این تست نسبت به دو استاندارد به کار رفته ضعیف بود. قدرت احیا کنندگی به عنوان شاخصی در تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی به کار می‌رود(۴۴). حضور عوامل احیا کننده، فعالیت خود را از طریق اهدا الکترون اعمال می‌کنند. سنجش احیا کنندگی نمونه، ناشی از احیا آهن III به آهن II با اهداء الکترون می‌باشد. میزان کمپلکس آهن، با اندازه‌گیری میزان تشکیل آبی پروس قابل اندازه‌گیری است. عصاره در این تست فعالیت خوبی از خود نشان داده است (نمودار شماره ۱). رادیکال نیتریک اکساید در بسیاری از اعمال فیزیولوژیک از جمله تنظیم فشار خون، گشاد شدن عضلات صاف عروق و سیستم ایمنی نقش دارد. تولید بیش از حد این ذره می‌تواند ایجاد استرس اکسیداتیو کند که منجر به تخریب ماکرومولکول‌ها و پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. قدرت به دام‌اندازی رادیکال نیتریک اکساید عصاره‌ها ضعیف اما وابسته به

دوز بوده است. نتایج سنجش قدرت به دام‌اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید در عصاره فعالیت خوبی را نشان ندادند. عصاره در غلظت ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر، موجب ۱/۲۹ ±۴۶/۴۱ درصد مهار شد.

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی ماشک کلاغی، دارای اثر آنتی‌اکسیدانی متوسطی می‌باشد اما اثر حفاظت کبدی بسیار خوبی از خود نشان می‌دهد. این اثر حفاظتی عمدتا از طریق مهار استرس اکسیداتیو در سلول‌های کبدی در مقابل ترکیبات اکسیدان اعمال شده است. بررسی بافتی نمونه کبدی موش‌ها روند بهبودی را به خوبی اثبات نمود. از آن‌جا که محتوای تام فنلی و فلاونوئیدی این گیاه کم است، به نظر می‌رسد که ترکیبات دیگری در گیاه از تخریب بافت کبد توسط تتراکلرید کربن جلوگیری می‌کند. برای پی بردن به این نکته، مطالعات بیوشیمیایی و فارماکولوژیک گسترده‌تری در جهت استخراج و خالص‌سازی ترکیبات موجود در گیاه مورد نیاز است.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی حوزه معاونت محترم تحقیقات و فنآوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام گردید. بدین وسیله از ایشان تشکر می‌گردد.

References

1. Kumaran A, Karunakaran RJ. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus. Food Chem .2006; 97: 109-114.
2. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM,etal. Binkoski AE, Hilpert KF Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. Am J Med .2002; 113, 71S-88S.
3. Di Matteo V, Esposite E. Biochemical and therapeutic effect of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord .2003; 2(2): 95-107.
4. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Antioxidant activity of the bulb and aerial parts of Ornithogalum sintenisii L (Liliaceae) at flowering stage. Trop J Pharm Res .2010;9(2): 141-148.
5. Jamshidi M, Shabani E, Hashemi Z, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from leaf and aerial parts of Lythrum salicaria L. Food Res Int. 2014; 21(2):783-788.
6. Amarowicz R, Troszyńska A, Pegg RB. Antioxidative and radical scavenging effects of phenolics from Vicia sativum. Fitoterapia. 2008; 79(2): 121-122.
7. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF. Antidepressant and antihemolytic activities of Vicia sojakii. Eur Rev Med Pharmacol. Sci .2014;18(7): 971-974.
8. Orhan I, Kartal M, Abu-Asaker M, Sezer Senol F, Yilmaz G, Sener B. Free radical scavenging properties and phenolic characterization of some edible plants. Food Chem .2009;114(1): 276-281.
9. Akroum S, Satta D, Lalaoui K. Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic

activities and phytochemical screening of some Algerian plants. Eur J Sci Res. 2009; 31: 289-295.

10. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B. Antioxidant activity of vicia canescence. Pharmacologyonline 2009; 3:688-694.
11. Eslami B, Nabavi SF, Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA. Free radicals scavenging and antioxidant activity of Vicia sojakii. Rev Chim (Bucharest). 2011; 62: 1216-1218.
12. Gamal-Eldeen AM, Kawashty SA, Ibrahim LF, Shabana MM, El-Negoumy SI. Evaluation of antioxidant, antiinflammatory and antinociceptive properties of aerial parts of Vicia sativa and its flavonoids. J Nat Remed. 2004;4(1):81-96.
13. Mahmoudi M, Hosseini M, Allami A, Ebrahimzadeh MA. Anti-inflammatory activities of vicia canescence and vicia hirsuta aerial parts. Pharmacologyonline. 2016;2:147-150.
14. Mahmoudi M, Gholipour E, Allami A, Arimi A, Ebrahimzadeh MA. Antinociceptive activities of vicia canescence aerial parts. Pharmacologyonline. 2016; 2: 143-146.
15. Hashemi Z, Ebrahimzadeh MA. Evaluation of three methods for the extraction of antioxidants from vicia faba L. bean and hulls. Latin Am Appl Res .2014; 44: 203-208.
16. Yazdanpanah M, Mousavi Z, Ebrahimzadeh M A. Protective effects of vicia hirsuta against hypoxia-induced lethality in mice. Int J Life Sci Pharm Res .2016; 6(4): 17-21.
17. Montahaedargah S, Ebrahimzadeh M A, Moradi P. Evaluation of antioxidant activity of Vicia hirsuta and the effect of extraction method. J Mazandaran Univ Med Sci. 2017; 27(153): 123-128.(Persian)
18. Afshar Alam MA, Mahmoudi M, Hosseinpour Z, Allami A, Ebrahimzadeh MA. Antiinflammatory and antinociceptive activities of Vicia faba hulls. Pharmacologyonline .2016; 3:104-108.
19. Afshar Alam MA, Mahmoudi M, Zolfaghari S, Allami A, Ebrahimzadeh MA. Antidepressant activity of Vicia faba hulls. Pharmacologyonline .2016; 3: 122-126.
20. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF. Correlation between the in vitro iron chelating activity and poly phenol and flavonoid contents of some medicinal plants. Pak J Biol Sci .2009;12(12): 934-938.
21. Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Bekhradnia AR. Iron chelating activity screening, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. Afr J Biotechnol .2008. 7; (18): 3188-3192.
22. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Dehpour AA. Antioxidant activity of hydroalcholic extract of Ferula gummosa Boiss roots. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2011; 15(6): 658-664.
23. Moradi-Afrapoli F, Shaki F, Heidari M, Seyedmirzaee M, Mandegary A. Hepatoprotective effect of Polygonum hyrcanicum methanolic extract on the carbon tetrachloride induced

hepatotoxicity in mice. Iran JPP .2015; 1(1): 43-48. (Persian)

24. Shokrzadeh M, Ebrahimnejad H, Zear A, Chabra A, Naghshvar F, Ahmadi A. In vivo protective effect of myricetin on liver biochemical damage induced by endosulfan. J Mazandaran Univ Med Sci .2016; 26 (143): 28-36 (Persian).
25. Sadeghi H, Ghaitasi E, Mazrooghi N, Sabzali S. The hepatoprotective effects of Dorema auchri on carbon tetrachloride induced liver damage in rats. 2007; 9(1):38-43.
26. Ahmad A, Pillai KK, Najmi AK, Ahmad SJ, Pal SN, Balani DK. Evaluation of hepatoprotective potential of Jigrine post-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. J Ethnopharmacol .2002; 79(1): 35-41.
27. Brewer M. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. Com Rev Food Sci Food Saf. 2011; 10(4):221-247.
28. Abdel Salam O, Sleem AA, Shaffie NM. Effect of Viscum album on acute hepatic damage caused by carbon tetrachloride in rats. Turk J Med Sci .2010; 40 (3): 421-426.
29. Panovska TK, Kulevanova S, Gjorgoski I, Bogdanova M, Petrushevska G. Hepatoprotective effect of the ethyl acetate extract of Teucrium polium L. Against carbon tetrachloride-induced hepatic injury in rats. Acta Pharm .2007; 57(2): 241-248.
30. Lin CC, Chang CH, Yang JJ, Namba T, Hattori M. Hepatpprotective effect of emodin from Ventilago leiocarpa, J Ethnopharmacol. 1996; 52(2): 107-111.
31. Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of liver function. In: Braunwald E, Kasper AS, Fauci AL, (eds). Harrison's principles of internal medicine. 21st ed. New York: McGraw-Hill; 2005. P: 1813-1817.
32. Rice-evans CA. Flavonoids and oflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. Free radical Biol and Med .2004 ;36 (7): 827-828.
33. Badrish S, Nishant P. Ameliorative action of cyanobacterial phycoerythrin on CCl4- induced toxicity in rats. Toxicology 2008;248(1): 59-65.
34. Evans WC. Trease and Evans Pharmaxognosy. 14th ed. London. WB Saunders . 1999.
35. Jannu V, Baddam PG, Boorgula AK, Jambula SR. A review on hepatoprotective plants. Int J Drug Devel Res. 2012; 4(3): 1-8.
36. Adewusi EA, Afolayan AJ. A review of natural products with hepatoprotective activity. J Med Plant Res. 2010; 4(13): 1318 -1334.
37. Heidarian E, Jafari-Dehkordi E, SeidkhaniNahal A. Effect of garlic on liver phosphatidate phosphohydrolase and plasma lipid levels in hyperlipidemic rats. Food Chem Toxicol. 2011; 49(5): 1110-1114.
38. Talebanpour bayat Z, Aqababa H, Shojaiefard M.B. Protective effects of hydro-alcoholic extract of Apium graveolens on carbon tetrachloride

induced hepatotoxicity in sprague-dawley male rats . J Fasa Univ Med Sci .2015; 5(1):102-110. (Persian)

39. Eidi A, Zaringhalam J, Rezazadeh Sh, Adeli R. Hepatoprotective effect of berberis vulgaris. Extract on CCl4-induced toxicity in rats. Kowsar Medical Journal 2011; 16(3): 169-173.(Persian)
40. Parvardeh S, Niapoor M, Hosseinzadeh H. Hepatoprotective activity of Pistacia vera L. gum extract in rats. J Medical Plants .2002; 1(4):27-34.
41. Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalianthioredoxin system. Free Radic Biol Med .2001; 31(11): 1287-1312.
42. Cotgreave IA, Gerdes RG. Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? Biochem Biophys Res Commun. 1998; 242(1):1-9.
43. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Eslami B, Ehsanifar S. Antioxidant activity of Hyoscyamus squarrosus fruits. Pharmacologyonline. 2009; 2:644-650.
44. Nabavi SM, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Eslami B, Dehpour AA. Antioxidant and antihaemolytic activities of Ferula foetida regel (Umbelliferae). Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2011; 15(2): 157-164.