

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

Mohammad Shokrzadeh<sup>1</sup>,  
Farshid Rahimi<sup>2</sup>,  
Ali Ziar<sup>3</sup>,  
Mohammad Ali Ebrahimzadeh<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Associate Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> Pharmacy Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> MSc in Toxicology, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>4</sup> 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 hepatoprotective 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<sub>4</sub> induced oxidative toxicity. Also, the levels of serum ALT, AST and ALP and hepatic glutathione were measured.

**Results:** Total phenolic content was  $17.2 \pm 0.9$  mg GAE and flavonoid content was  $9.78 \pm 0.25$  mg QE. In DPPH radical scavenging activity, the IC<sub>50</sub> value was  $1.98 \pm 0.25$  mg ml<sup>-1</sup>. The extract showed good reducing power activity indicating significant difference with that of the positive controls ( $P < 0.05$ ). The extract increased liver glutathione 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, glutathione, hepatic enzymes, CCl<sub>4</sub>

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

محمد شکرزاده<sup>۱</sup>  
فرشید رحیمی<sup>۲</sup>  
علی زیار<sup>۳</sup>  
محمد علی ابراهیم زاده<sup>۴</sup>

## 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 آنتی اکسیدانی ماشک کلاغی و اثر حفاظتی آن در کبد موش سوری طراحی شده است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، عصاره گیری به روش خیساندن با حلال متانول انجام گردید. فعالیت آنتی اکسیدانی 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 میلی گرم بر کیلوگرم مورد ارزیابی قرار گرفته و میزان گلو تاتیون کبدی و هم چنین میزان آنزیم‌های ALT، AST و ALP سرمی اندازه گیری شد.

**یافته‌ها:** محتوای تام فنلی  $0/9 \pm 17/2$  میلی گرم معادل گالیک اسید و مقدار فلاونوئید تام  $9/78 \pm 0/25$  میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره بود. مقدار IC50 در به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH، برای عصاره  $1/98$  میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. عصاره اثر خوبی در تست احیا کنندگی از خود نشان داد و اختلاف معنی داری بین عصاره و کنترل مثبت وجود داشته است ( $p > 0/05$ ). عصاره موجب افزایش میزان گلو تاتیون 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، گلو تاتیون، آنزیم‌های کبدی، تراکلرید کربن.

## مقدمه

می کنند که توانایی تخریب مولکول‌های بزرگ را دارا می‌باشند. ترکیبات آنتی اکسیدان، این اثرات مخرب را متوقف کرده و موجب به دام اندازی رادیکال

حضور رادیکال‌های آزاد در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها به روشنی مشخص شده است (۱). واکنش‌های بیوشیمیایی مختلفی در بدن رادیکال‌های آزاد تولید

Email: zadeh20@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** محمد علی ابراهیم زاده - ساری، کیلومتر ۱۸ جاده دریا، دانشکده داروسازی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۱. دانشیار، گروه سم شناسی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. کارشناس ارشد سم شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استاد، گروه شیمی دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۴/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۴/۵

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 کم تر بوده است. این عصاره در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر، تنها حدود ۱۳ درصد اثر مهاري 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 (۲۱). (۲۰). 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 روش‌ها

### 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

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 آنتی‌اکسیدان 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. canescence*، *V. faba*، *V. sativum*، *cracca*، *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 (۸، ۱۴، ۶). هم‌چنین تاثیر روش استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی *V. faba* مورد بررسی قرار گرفته و گزارش شده است (۱۵). فعالیت آنتی‌هیپوکسی، 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

بخش گیاه در سایه خشک گردید و بعد از تبدیل به قطعات ریز، عصاره گیری به روش خیساندن انجام گرفت. به منظور عصاره گیری به روش خیساندن، ۴۰ گرم از برگ خشک گیاه با ۱۲۰ میلی لیتر متانول مخلوط، و مجموعه به مدت ۲۴ ساعت رها گردید. روز بعد فاز آلی (متانول) جدا گردید و مجدداً 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 میلی لیتر از عصاره با غلظت ۰/۵ میلی گرم / میلی لیتر با ۲/۵ میلی لیتر واکنش گر و ۰/۲ نرمال فولین سیو کالتیو مخلوط شد. ۲ میلی لیتر 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 نانومتر اندازه گیری 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 میلی گرم 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 روش های رنگ سنجی مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۲). ۰/۵ میلی لیتر از نمونه با غلظت ۰/۵ میلی گرم / میلی لیتر با ۱/۵ میلی لیتر متانول مخلوط، و سپس ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد به آن اضافه شد. آن گاه ۰/۱ میلی لیتر از محلول پتاسیم استات ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر 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 نانومتر توسط دستگاه

اسپکتروفوتومتر مرئی - ماوراء بنفش اندازه گیری شد. کوئرستین به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. میزان فلاونوئید به صورت میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره گزارش گردید. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین آن ها گزارش گردید.

#### ارزیابی میزان توانایی به دام اندازی رادیکال

##### DPPH

به ۱/۵ میلی لیتر از عصاره، ۱/۵ میلی لیتر 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 نانومتر 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 رادیکال ها پاکسازی شوند) برای عصاره تعیین شد. در نهایت درصد به دام اندازی رادیکال DPPH طبق فرمول شماره ۱ محاسبه گردید.

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

در فرمول شماره ۱، AB= جذب بلانک و AS= جذب نمونه یا استاندارد می باشد (۲۲).

#### تعیین قدرت احیاء کنندگی

میزان قدرت احیاء کنندگی عصاره ها از طریق متد این و چن ارزیابی شد. غلظت های مختلف از عصاره تهیه گردید. یک میلی لیتر از هر غلظت با ۱ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار pH برابر با ۶/۵ و ۱ میلی لیتر محلول ۱ درصد پتاسیم فری سیانید مخلوط شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری گردید، سپس ۱ میلی لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید به نمونه ها اضافه شد. نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه

سانتریفوژ ۲۵۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام این مرحله ۰/۵ میلی لیتر از قسمت بالای محلول با ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۱ میلی لیتر محلول ۰/۱ درصد فریک کلرید (FeCl<sub>3</sub>) به آن اضافه گردید. سپس جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. در این آزمایش آسکوربیک اسید با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر 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 نیتريت تولید می‌گردد. یون نیتريت تولید شده در حضور واکنش گر گریس سنجیده می‌شود. به دام اندازی نیتریک اکساید در رقابت با اکسیژن، موجب کاهش تولید یون نیتريت 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 میلی لیتر واکنش گر 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 نانومتر در مقابل بلانک قرائت گردید. آزمایشات ۳ بار تکرار شد و میانگین آن‌ها گزارش گردید. کوئرتین 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 IC<sub>50</sub> برای تمامی عصاره‌ها بیان شد.

#### روش تست‌های حیوانی

برای آماده‌سازی نمونه و حیوان مورد مطالعه، دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره به کمک انحلال در نرمال سالین تهیه شد. در تمامی موارد ۰/۵ میلی لیتر 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 تتراکلرید کربن استفاده شد. در تمام مراحل انجام کار تتراکلرید کربن به روش ip، به میزان ۱ ml/kg انجام گردید. در هر گروه ۶ سر حیوان به مدت ۲۸ روز مورد مطالعه قرار گرفت (۲۳).

حیوانات به ۶ گروه تقسیم‌بندی شدند و تزریق حیوانات به صورت زیر انجام گرفت.

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

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

گروه ۳: این گروه به میزان ۲ بار در هفته، و دوز ۵۰ mg/kg/day عصاره به مدت ۲۸ روز تتراکلرید کربن دریافت کردند.

گروه ۴: این گروه به میزان ۲ بار در هفته، و دوز ۱۰۰ mg/kg/day عصاره به مدت ۲۸ روز تتراکلرید کربن دریافت کردند.

گروه ۵: این گروه به میزان ۲ بار در هفته، و دوز ۱۰۰ mg/kg/day عصاره به مدت ۲۸ روز تتراکلرید کربن دریافت کردند.

گروه ۶: این گروه به میزان ۲ بار در هفته، و دوز ۵۰ mg/kg/day ویتامین ث به مدت ۲۸ روز تتراکلرید 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 فالتون منتقل گردید و در فریزر نگهداری شد تا در روز کاری مناسب سطح سرمی آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) اندازه‌گیری شود. بلافاصله پس از خون‌گیری، کبد حیوان برای اندازه‌گیری گلوکاتایون 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).

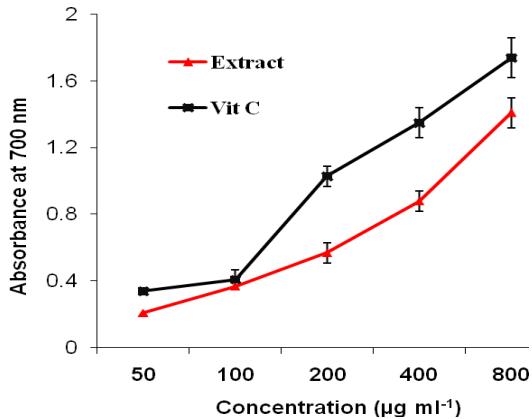
۰/۱ گرم از بافت کبد به لوله هموژنایزر انتقال داده شد. ۱ میلی‌لیتر EDTA به آن اضافه شد و چند بار عمل هموژن کردن با پیستون انجام گرفت تا مخلوط یکنواختی حاصل گردید. سپس محتویات لوله هموژنایزر به لوله سانتریفوژ یخچال دار انتقال یافت. در مرحله بعدی به لوله سانتریفوژ ۱/۵ میلی‌لیتر ۱۰ درصد TCA جهت رسوب پروتئین‌ها اضافه شد. لوله‌ها در دور ۳۵۰۰، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ 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 ۴۱۲ nm خوانده شد و با کمک منحنی استاندارد، غلظت گلوکاتایون اندازه‌گیری شد (۲۳، ۲۴).

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 سانتریفوژ منتقل گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه گذاشته شد تا انکوبه شود، بعد با دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ 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 (۲۳، ۲۴).

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 Tissue Processor که دارای مراحل مختلف به ترتیب شامل فرمالین ۱۰ درصد، الکل ۷۰ درصد، الکل ۸۰ درصد، الکل ۹۰ درصد، الکل ۱۰۰ درصد (مطلق)، گزین و پارافین (دمای پارافین تقریباً 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 و تحلیل شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش گردید. هم‌چنین برای مقایسه بین گروه‌ها از روش tukey test استفاده شد. در مقایسه میانگین بین گروه‌ها،  $p > 0/05$  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



نمودار شماره ۱: میزان قدرت احیا کنندگی عصاره گیاه ماشک کلاغی، ویتامین C به عنوان کنترل مثبت به کار رفته است.

نتایج سنجش قدرت به دام اندازی رادیکال آزاد نیتریک اکساید در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. عصاره فعالیت خوبی در این تست نشان نداد. عصاره در غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، موجب مهار  $1/29 \pm 46/41$  درصدی شد. میزان  $IC_{50}$  برای کوئرستین که به عنوان کنترل مثبت به کار رفت و برابر ۱۹۵ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد.

با اندازه گیری وزن عصاره پس از انجام عصاره گیری، بازده عصاره گیری ۱۳/۵ درصد به دست آمد. در اندازه گیری فنل تام در عصاره با متد فولین سیو کاتیو، محتوای تام فنولی موجود در عصاره معادل ۰/۹  $\pm 17/2$  میلی گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره تعیین شد. با اندازه گیری فلاونوئید تام در عصاره با کمک آلومینیوم کلراید، محتوای تام فلاونوئیدی در عصاره معادل  $0/25 \pm 9/78$  میلی گرم کوئرستین در هر گرم عصاره تعیین گردید. مقدار  $IC_{50}$  در به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH، برای عصاره ۱/۹۸ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. هم چنین مقدار  $IC_{50}$  برای کوئرستین ۲۰۱/۰۷ میکروگرم در میلی لیتر و مقدار  $IC_{50}$  برای ویتامین C  $492/76$  میکروگرم در میلی لیتر به دست آمد. نتایج حاصل از سنجش قدرت احیا کنندگی در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. ویتامین C به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. در تمامی موارد اختلاف معنی داری بین عصاره و کنترل مثبت وجود داشته است ( $p > 0/05$ ).

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

غلظت (میکروگرم در میلی لیتر)	میزان جذب	درصد به دام اندازی (%)
۸۰۰	۱/۲۱	$46/41 \pm 1/29$
۴۰۰	۱/۴۴	$35/12 \pm 1/67$
۲۰۰	۱/۵۳	$31/87 \pm 0/88$
۱۰۰	۱/۸۹	$14/84 \pm 0/70$
۵۰	۲/۰۶	$7/27 \pm 0/15$

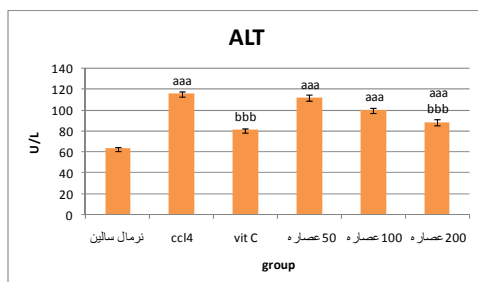
نتایج مربوط به اندازه گیری گلو تاتیون GSH کبد موش سوری ( $\mu\text{mol/g}$ ) در گروه های مورد مطالعه بعد از مواجهه مزمن با عصاره هیدروالکلی ماشک کلاغی در نمودار شماره ۱ آمده است.

هریک از مقادیر جدول حاصل، میانگین به دست آمده از سه آزمایش مختلف  $\pm$  انحراف استاندارد می باشد.

نتایج تست های حیوانی

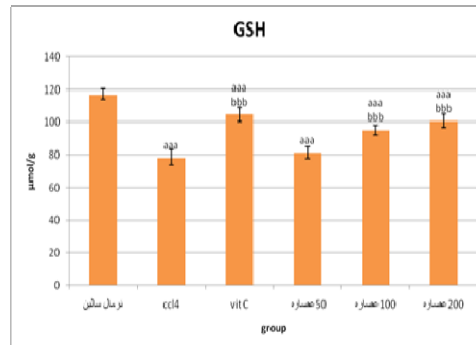
مقایسه میزان آنزیم AST سرم موش سوری در گروه‌های مورد مطالعه با گروه دریافت کننده تراکلرید کربن و نرمال سالین در نمودار شماره ۲ مشخص شده است. بیشترین مقدار میزان AST سرم، مربوط به گروه دریافت کننده تراکلرید کربن با  $168/83 \pm 2/68$  U/L، کمترین مقدار میزان AST در سرم مربوط به گروه دریافت کننده نرمال سالین  $119/50 \pm 3/31$  و ویتامین ث  $130/00 \pm 3/18$  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 تراکلرید کربن شد.

مقایسه میزان آنزیم ALT سرم موش سوری در گروه‌های مورد مطالعه با گروه دریافت کننده تراکلرید 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 دریافت کننده تراکلرید کربن و نرمال سالین، ویتامین c به عنوان کنترل مثبت به کار رفته است. aaa: معناداری با  $PValue = 0/001$  در مقایسه با نرمال سالین، bbb: معناداری با  $PValue = 0/001$  در مقایسه با تراکلرید کربن

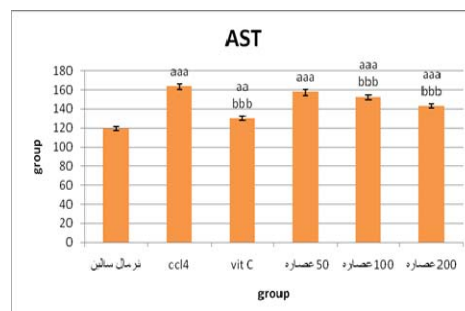
بیشترین مقدار میزان ALT سرم مربوط به گروه دریافت کننده تراکلرید کربن برابر با  $4/50 \pm$  U/L، کمترین مقدار میزان ALT در سرم مربوط به گروه دریافت کننده نرمال سالین برابر با  $1/52 \pm 63/16$  و ویتامین c برابر با  $1/63 \pm 80/66$  U/L می‌باشد. عصاره به شکل معنی‌دار و وابسته به دوز، موجب کاهش میزان آنزیم ALT در سرم موش سوری نسبت به گروه دریافت کننده تراکلرید کربن گردید.



نمودار شماره ۱: مقایسه میزان گلوتاتیون GSH کبد موش سوری ( $\mu\text{mol/g}$ ) در گروه‌های مورد مطالعه با گروه دریافت کننده تراکلرید کربن (کنترل) و نرمال سالین (شاهد، ویتامین c به عنوان کنترل مثبت به کار رفته است. aaa: معناداری با  $PValue 001/0$  در مقایسه با نرمال سالین، bbb: معناداری با  $PValue 001/0$  در مقایسه با تراکلرید کربن

نتایج مربوط به اندازه‌گیری گلوتاتیون GSH کبد موش سوری نشان داد که بیشترین مقدار میزان آنزیم گلوتاتیون در گروه نرمال سالین (شاهد) برابر  $117/16 \pm 3/31$   $\mu\text{mol/g}$  وجود داشته است و کمترین مقدار میزان آنزیم گلوتاتیون در گروه تراکلرید کربن برابر  $78/33 \pm 6/68$   $\mu\text{mol/g}$  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 تراکلرید کربن و نرمال سالین در نمودار شماره ۲ بیان شده است.



نمودار شماره ۲: مقایسه میزان آنزیم AST سرم Mice در گروه‌های مورد مطالعه با گروه دریافت کننده تراکلرید کربن و نرمال سالین. ویتامین c به عنوان کنترل مثبت به کار رفته است. aaa: معناداری با  $PValue = 0/001$  در مقایسه با نرمال سالین، aa: معناداری با  $PValue = 0/01$  در مقایسه با نرمال سالین، bbb: معناداری با  $PValue = 0/001$  در مقایسه با تراکلرید کربن



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

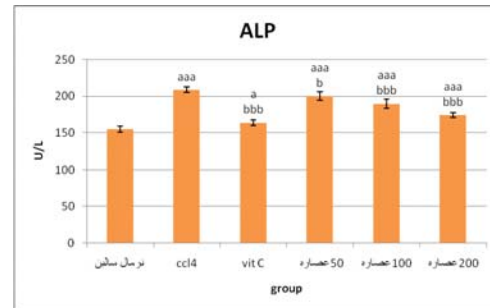
گروه اول: در گروه دریافت کننده‌ی نرمال سالین، کبد نرمال و بدون التهاب در ناحیه‌ی پروتال و نکروز هپاتوسیت‌ها، بوده است. سلول‌ها بدون خونریزی، و عروق مرکزی طبیعی بود.

گروه دوم: در گروه دریافت کننده‌ی تتراکلرید 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 کننده‌ی عصاره ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم 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 کننده‌ی 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).

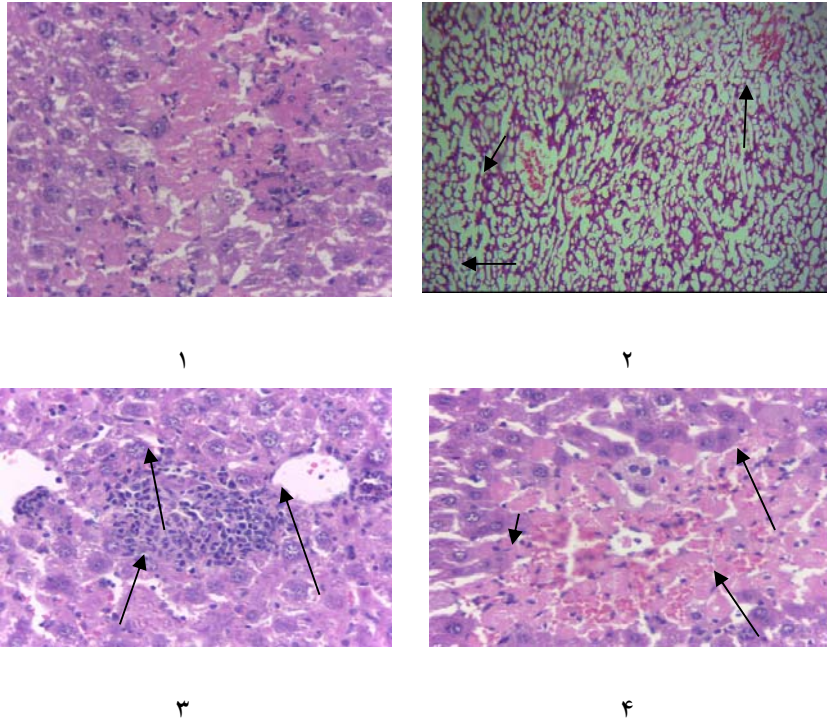
مقایسه میزان آنزیم ALP سرم موش سوری در گروه‌های مورد مطالعه با گروه دریافت کننده تتراکلرید کربن و نرمال سالین در نمودار شماره ۴ مشخص شده است.



نمودار شماره ۴: 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  $PValue = 0/001$  در مقایسه با نرمال سالین، a: معناداری با  $PValue = 0/05$  در مقایسه با نرمال سالین، bbb: معناداری با  $PValue = 0/001$  در مقایسه با تتراکلرید کربن

بیش‌ترین مقدار میزان ALP سرم مربوط به گروه دریافت کننده‌ی تتراکلرید کربن برابر با  $3/51 \pm$  U/L  $209/01$ ، کم‌ترین مقدار میزان ALP در سرم مربوط به گروه دریافت کننده نرمال سالین برابر با  $3/79 \pm$  U/L  $163/83 \pm 3/06$  و ویتامین C  $154/83 \pm$  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.



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

## بحث

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 تراکلرید کربن از جمله موادی هستند که پس از ورود به بدن، توسط این سیستم آنزیمی متابولیزه می‌شوند (۲۶). تراکلرید 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  $CCl_4$  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

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

میزان کم‌تر در مغز، پانکراس، ریه، لکوسیت و اریتروسیت یافت می‌شود. چنان‌چه 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 نکرروز کبدی افزایش می‌یابد به همین دلیل اندازه‌گیری سطح این آنزیم یک تست انتخابی برای نکرروز کبدی است (۳۰، ۲۳). 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 بیش تری 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، ALT و 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 عمدتاً حاوی ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی 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، تری‌ترین‌ها و فنول‌ها نسبت داده شده است (۳۶، ۳۷).

در گزارشی دیگر، تتراکلرید کربن سبب افزایش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی در موش شده است در حالی که تیمار با عصاره کرفس با غلظت‌های ۲۰۰ تا ۴۰۰ mg/kg 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 تتراکلرید کربن سطح سرمی آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات 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 تقریباً تا حد طبیعی تغییر داد (۳۹).

گزارش شده است که تزریق درون صفاقی تتراکلرید کربن در موش باعث افزایش فعالیت AST، ALT، ALP به 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 گاو، سبب گردید این فاکتورها به طور معنی داری به وضعیت نرمال نزدیک شوند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد عصاره گیاه بیلهر در برابر آسیب های کبدی ایجاد شده توسط تراکلرید کربن دارای اثرات محافظتی است (۲۵). در مطالعه دیگری، تراکلرید کربن با دوز ۱/۲۵ میلی لیتر بر کیلوگرم باعث ایجاد آسیب کبدی شده است و میزان ترانس آمینازهای خون را به میزان قابل توجهی افزایش داد. تجویز عصاره صمغ پسته با دوزهای ۰/۵ و ۱ گرم به کیلوگرم قبل از تراکلرید کربن به طور مشخصی از افزایش ALT جلوگیری کرد ولی اثری بر روی غلظت AST نداشته است (۴۰).

گلو تاتیون فراوان ترین آنتی اکسیدان غیر آنزیمی داخل بدن می باشد. این ترکیب در حالت طبیعی به فرم احیا شده و در حال تعادل با فرم اکسید شده خود می باشد (۴۱). موادی مانند ویتامین C و ویتامین E مسیر را معکوس کرده تا به طور مجدد گلو تاتیوم اولیه تولید شود (۴۲). در این مطالعه، تجویز عصاره به شکل معنی دار و وابسته به دوز موجب افزایش مقدار گلو تاتیون در موش ها شد. اثر محافظتی کبدی عصاره به خوبی با شواهد هیستوپاتولوژی نیز تایید شده است.

از سویی فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان را می توان عمدتاً به حضور ترکیبات فنولی در آن نسبت داد (۱۸). این ترکیبات تقریباً در تمام بخش های گیاه وجود دارند و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک نقش دارند. از پلی فنول ها فعالیت های بیولوژیکی متفاوتی از جمله، فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد آلرژی و گشاد کننده عروق گزارش شده است (۱۸). در اندازه گیری فنل تام در عصاره، محتوای تام فنولی موجود در عصاره معادل  $17/2 \pm 0/9$  میلی گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره تعیین شد. این میزان بسیار کم تر از محتوای تام فنلی گیاهان دیگر در منطقه مازندران است (۲۰، ۲۱). فلاونوئیدها تقریباً حدود نیمی از ۸۰۰۰ فنول های شناسایی شده را تشکیل

می دهند (۱۸). فلاونوئیدها مسئول ایجاد رنگ در گ ها و میوه ها می باشند و به علت فعالیت آنتی اکسیدانی در صنایع دارویی و غذایی مورد توجه هستند (۱۸). مکانسیم عمل فلاونوئیدها به دام اندازی رادیکال آزاد و یا شلاته کردن یون ها می باشد. فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی به عنوان پیشگیری کننده در پیشرفت سرطان و بیماری های قلبی شناخته شده اند (۱۸). با اندازه گیری فلاونوئید تام در عصاره، محتوای تام فلاونوئیدی در عصاره معادل  $0/25 \pm 9/78$  میلی گرم کوئرستین در هر گرم عصاره تعیین شد. این مقدار نسبت به محتوای تام فلاونوئیدی بسیاری از گیاهان منطقه مازندران، کم است (۲۰، ۲۱).

مدل به دام اندازی رادیکال DPPH به طور گسترده ای در ارزیابی توانایی به دام اندازی رادیکال آزاد در نمونه های مختلف مورد استفاده قرار می گیرد (۴۳). در این تست ویتامین C و BHA (بوتیلیند هیدروکسی آنیزول) به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. مقدار  $IC_{50}$  در به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH، برای عصاره  $1/98$  میلی گرم در میلی لیتر 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 آنتی اکسیدانی گیاهان دارویی به کار می رود (۴۴). حضور عوامل احیا کننده، فعالیت خود را از طریق اهدا الکترون اعمال می کنند. سنجش احیا کنندگی نمونه، ناشی از احیا آهن III به آهن II با اهداء الکترون می باشد. میزان کمپلکس آهن، با اندازه گیری میزان تشکیل آبی پروس قابل اندازه گیری 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 می تواند ایجاد استرس اکسیداتیو کند که منجر به تخریب ماکرومولکول ها و پراکسیداسیون لیپیدها می شود. قدرت به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید عصاره ها ضعیف اما وابسته 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 فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام گردید. بدین وسیله از ایشان تشکر می‌گردد.

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  $1/29 \pm 46/41$  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 عمدتاً 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

### 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, et al. 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, Esposito 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 hydroalcoholic extract of *Ferula gummosa* Boiss roots. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011; 15(6): 658-664.
  23. Moradi-Afrapoli F, Shaki F, Heidari M, Seyedmiraee 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. Hepatoprotective 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 CCl<sub>4</sub>- induced toxicity in rats. Toxicology 2008;248(1): 59-65.
34. Evans WC. Trease and Evans Pharmacognosy. 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.