ORIGINAL ARTICLE

The Effect of Diospyros lotus on Liver Glutathione Level in Mice Administered by Senecio vulgaris Extract

Mohammad Shokrzadeh[1], Mohammad Azadbkht[2], Saied Abadean[3], Mohammad Ali Abotorabi[4]

[1] Pharmaceutical Research Center, Department of Toxicology and pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Department of Pharmacognosy and Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Student in Pharmacy, Faculty of pharmacy, Sari, Iran

(Received July 2, 2012 ; Accepted February 12, 2012)

Abstract

Background and purpose: Glutathione is one of the main antioxidants in animals which can protect against hazardous oxidative substances. *Diospyros lotus* consisted of antioxidants such as flavonoids and naphthoguinones which can influence the glutathione levels. On the other hand, *Senecio vulgaris* is expected to change the glutathione level, because of possessing toxic and oxidative compounds called pyrrolizidine alkaloid. The purpose of this study was to determine the effect of *Senecio vulgaris* extract on the glutathione level and the protective effect of *Diospyros lotus* plant.

Materials and methods: At the beginning, the plants *Senecio vulgaris* and *Diospyros lotus* were extracted. Then, the selected six groups of mice (n=5) were administered by the extracts and the liver glutathione levels were measured separately and coincidently through spectrophotometry method.

Results: This study showed that the extract of *Diospyros lotus* plant significantly increased the level of glutathione ($P<0.001$) compared with that of the control group but senecio vulgaris decreased the amount of glutathione ($P<0.001$). But, *Senecio vulgaris* decreased the glutathione level ($p<0.001$). According to the increased level of glutathione ($P<0.05$) compared to the groups exposed to *Senecio vulgaris*, the plant *Diospyros lotus* extracts showed more protective effects.

Conclusion: The results revealed the protective effect of *Diospyros lotus* plant extracts. It is believed that the protective mechanism against toxic compounds is contributed to the existence of antioxidative substances including flavonoids and naphthoguinones in *Diospyros lotus*, that protect the liver against toxic pyrrolizidine alkaloid compound found in *Senecio vulgaris*.

Keywords: Glutathione, *Diospyros lotus*, *Senesce vulgaris*

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(98): 200-206 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۹۷ اسفند سال ۱۳۹۱ (۲۰۶-۲۰۰)

تأثیر شیرابه میوه گیاه خرمندی بر میزان گلوتاتیون کبدی در حیوانات مواجه یافته با عصاره آلکالوئیدی گیاه پیرگیاه

محمد شکرزاده[۱] محمد آزادبخت[۲] سعید عابدیان[۳] محمد علی ابوترابی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: گلوتاتیون یکی از ساده‌ترین پپتیدها بوده و در عین حال جزء اصلی‌ترین آنتی اکسیدانت‌های بدن جانوران است که می‌تواند جلوی ترکیبات سمی و اکسیدانت را بگیرد. گیاه دیوسپیروس لوتوس به دلیل دارا بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانت مانند فلاونوئید و نفتوکینون به احتمال زیاد می‌تواند در سطح گلوتاتیون کبدی تأثیرگذار باشد همچنین گیاه سنسیوولگاریس به دلیل دارا بودن ترکیب سمی و اکسیدانت به نام آلکالوئید پیرولیزیدین انتظار می‌رود عصاره این گیاه هم بتواند میزان گلوتاتیون کبدی را تغییر دهد. هدف این مطالعه بررسی اثر عصاره گیاه سنسیو وولگاریس روی سطح گلوتاتیون کبدی و اثرمحافظتی گیاه دیوسپیروس لوتوس بر حیوانات مواجه یافته می باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا از گیاهان دیوسپیروس لوتوس و سنسیو وولگاریس عصاره تهیه شد، سپس ۶ گروه ۵ تایی Mice انتخاب گردید. سپس میزان گلوتاتیون کبدی آن‌ها بعد از مواجهه یافتن با هر دوگیاه به طور جداگانه و همزمان مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

یافته‌ها: این مطالعه نشان داد عصاره گیاه دیوسپیروس لوتوس سبب افزایش گلوتاتیون ($p<۰/۰۰۱$) نسبت به گروه کنترل می‌شود ولی گیاه سنسیو و ولگاریس سبب کاهش گلوتاتیون ($p<۰/۰۰۱$) نسبت به گروه کنترل می‌شود. برای بررسی اثر محافظتی گیاه دیوسپیروس لوتوس عصاره دو گیاه به Mice تزریق شد و مشاهده شد نسبت به گروه تزریق شده با سنسیو وولگاریس، میزان گلوتاتیون افزایش ($p<۰/۰۵$ -$p<۰/۰۰۱$) پیدا کرده است که با افزایش غلظت دیوسپیروس این محافظت بیش تر شد ($p<۰/۰۵$ -$p<۰/۰۰۱$).

استنتاج: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه دیوسپیروس لوتوس نقش محافظتی در مقابل گیاه سنسیو ولگاریس دارد. به نظر می‌رسد مکانیسم اثر محافظتی مربوط به وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی مثل فلاونوئید و نفتوکینون‌ها در دیوسپیروس لوتوس می‌باشد که ترکیب سمی و رادیکالی آلکالوئید پیرولیزیدینی سنسیو وولگاریس را خنثی می‌کند.

واژه های کلیدی: گلوتاتیون، دیوسپیروس لوتوس، سنسیو وولگاریس

مقدمه

در بدن جانوران همواره تحت تأثیر واکنش‌های مختلف یا مواجه با عوامل محیطی مضر، اکسی رادیکال‌های آزاد مختلف تولید می شود که ویژگی مشترک تمام آن‌ها این است که همگی واجد اوربیتال

مؤلف مسئول: محمد شکرزاده- ساری: مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران E-mail: mslamuk@yahoo.com

۱. مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم شناسی/فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. گروه فارماکوگنوزی و بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشجوی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۰/۴/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۰/۸/۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۱/۱۱/۲۴

مولکولی خالی در لایه آخر خود هستند. این اوربیتال خالی یا در اکسیژن وجود دارد یا در نیتروژن، به عواملی که واجد این گونه از اکسیژن و نیتروژن در ساختار خود باشند به ترتیب ROS (Reactive oxygen species) و RNS (Reactive nitrogen species) می گویند. RNS اختصاصاً در سلول‌های مغزی و ROS در تمام سلول‌ها یافت می‌شود. رادیکال‌های فعال تولید شده به دنبال جفت الکترون آزاد در بدن می‌گردند و هر کجا که جفت الکترون آزاد وجود داشته باشد مثل پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، مولکول DNA و RNA مورد حمله الکتروفیلی آن‌ها قرار می‌گیرند. بنابراین باید ترکیباتی در بدن جانداران وجود داشته باشد که به علت داشتن جفت الکترون آزاد و تمایل بیش‌تر به جذب رادیکال‌های آزاد، به طور رقابتی با این عوامل زیان‌آور رقابت کنند. اسید آمینه سیستئین از جمله این عوامل است(۱). سیستئین به عنوان یک اسید آمینه آزاد به طور بالقوه، سمی است و به طور خود به خودی و فوری در لوله معدی روده‌ای و یا پلاسمای خون، کاتابولیزه و تخریب می‌شود. از این رو به تنهایی برای ارائه به سلول‌های بدن با هدف فوق مناسب نیست اما هنگامی که به صورت دی پپتیدی سیستئین- سیستئین در بیاید، سیستین نامیده می‌شود و نسبت به حالت قبل بسیار پایدارتر می‌گردد. دی پپتید سیستین بدون آن‌که دچار کاتابولیسم شود، به راحتی از لوله معدی- روده‌ای جذب می‌گردد و در جریان خون سیستمیک حرکت می‌کند. اما با اتصال پیوند دی سولفیدی و تشکیل دی پپتید سیستین، جفت الکترون‌های سیستئین درگیر پیوند با یکدیگر می‌شوند و قابلیت آنتی‌اکسیدانتی خود را از دست می‌دهند. بنابراین راه حل سنتز ترکیب پایداری مثل گلوتاتیون است تا علاوه بر پایداری، بتواند به طور رقابتی رادیکال‌های آزاد را مهار نماید(۲). گلوتاتیون در داخل سلول‌ها از اتصال سه اسید آمینه L-glutamate, L-cysteine, L-glycine ساخته می شود و یکی از ساده‌ترین پپتیدها است در عین حال گلوتاتیون اصلی ترین آنتی‌اکسیدانت بدن جانوران است(۳).

دیوسپیروس لوتوس در ایران بومی جنگل‌های شمال کشور است و از قسمت‌های ساحلی دریای خزر تا ارتفاع ۱۱۰۰ متر از سطح دریا و از آستارا تا رامیان گرگان دیده می‌شود(۴). این گیاه همانند دیگر گونه‌های دیوسپیروس دارای میزان بالای از نفتاکینون‌ها به خصوص ۷- متیل ژوگلون می باشد. بسیاری از مطالعات نشان دادند که میوه این گیاه دارای اثرات فارماکولوژیکی مانند ضد تب، خواب آور و ضد سرفه و به تازگی اثرات ضد التهابی، آنتی اکسیدانتی و اثرات سایتوتوکسیک در برابر تومور کلون به اثبات رسیده است(۵). اخیراً در سال ۲۰۰۹ بر روی اثر آنتی‌اکسیدانتی عصاره میوه گیاه دیوسپیروس لوتوس با ۶ روش متداول و متفاوت تحقیق شده است. در این مطالعه نشان داده شده که عصاره میوه گیاه دیوسپیروس لوتوس با میزان بالایی از محتوای فنل و فلاونوئید و نفتاکینون ها دارای اثرات آنتی اکسیدانتی و جاروب کننده رادیکال های آزاد (Free Radical Scavenging) می‌باشد(۶).

گیاه سنسیو ولگاریس که به نام پیرگیاه معروف است از خانواده کاسنی می باشد و از گندم زارهای استان مازندران به عنوان علف هرز برداشت می‌شود(۷، ۸). در اعضای این گیاه مخصوصاً در ریشه آن، آلکالوئیدهای پیرولیزیدین alkaloid pyrrolizidine (PAs) به نام‌های سنه سیونین(Senecionin) و سنه سیوفیلین (Seneciphylline)، همراه با یک ماده رزینی یافت می‌شود(۹، ۱۰). پاتوفیزیولوژی PAs نتیجه تشکیل متابولیت‌های پیرول از PAs به وسیله اکسیداسیون میکروزومال کبدی توسط سیتوکروم P450 (Cyp3A4) و Cross-linking نوارهای DNA با متابولیت‌های پیرول می‌باشد به عبارتی متابولیت‌های پیرول که عوامل آلکیله کننده قوی هستند با نوکلئوفیل‌های سلولی مناسب مانند نوکلئیک اسید و پروتئین واکنش می‌دهند(۱۱-۱۳). با مکانیسم فوق PAs اختلالات عروقی ایجاد می‌کنند که شامل واسکولیت ریوی (Pulmonary vasculitis) آسیب

بـه سـلول‌هـای عضـلات صـاف عـروق، پرولیفراسـیون اندوتلیوم بافت پیوندی در کبد که به دنبال این اختلالات عروقی هایپرتانسیون ریوی و بیماری انسدادی سیاهرگ کبـدی Hepatic veno occlusive disease (VOD) حاصل می‌شود. پاتولوژی اصلی VOD که نشانه سمیت است، شامل انسداد سیاهرگ کبدی مرکز لوبولی با نکروز خونریزی دهنده آن، مگالوسیتوز هپاتوسلولار، هایپرپلازی مجرای صفراوی و سیروز می‌باشند(۱۴، ۱۵). لذا با توجه به ترکیبات موجود در این گیاهان، نقش های متفاوتی را که از آن‌ها قید شده و بومی بودن این دو گیاه در استان مازندران ما مطالعه‌ای را طراحی نمودیم تا بررسی اثر عصاره گیاه سنسیو و ولگاریس را روی سطح گلوتاتیون کبدی و اثر محافظتی گیاه دیوسپیروس لوتوس را بر حیوانات مواجه یافته بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه یک روش آزمایشگاهی بوده که در این مطالعه روش استخراج بر اساس روش عصاره گیری سنتی که در استان مازندران، شمال ایران، انجام می‌شود طراحی شده است. در این روش هسته‌ها از میوه‌های رسیده و تازه جدا می‌گردد و سپس به طریقه پرس کردن شیرابه از میوه جدا می‌گردد. که ما از ۲۰ کیلوگرم میوه تازه به میزان ۴ کیلوگرم شیرابه به‌دست آوردیم. گیاه خشک شده سنسیو در دستگاه آسیاب برقی پودر و سپس در ترازو به مقدار ۱۰ گرم وزن شد و ۱۰۰ سی سی متانول در ارلن به آن اضافه گردید. مخلوط حاصله روی هیتر استیرر قرار داده شد که در دمای ۴۰ و در دور ۲۵۰ تنظیم شده بود. بعد از گذشت ۱ ساعت مخلوط صاف گردید و محصول روی صافی دوباره با ۱۰۰ سی‌سی متانول در ارلن گذاشته شد و دوباره روی هیتر استیرر قرار گرفت و بعد از ۱ ساعت دوباره کار تکرار شد و در نهایت ۳۰۰ سی سی متانول حاوی عصاره جمع‌آوری شد. مخلوط متانولی حاصل توسط روتاری در دمای ۴۸ و دور ۲۰۵ پرانده شد. قبل از پریدن کامل حلال، دستگاه خاموش و ترکیب حاصل توسط بنماری در دمای ۵۰ خشک شد. ۱ گرم عصاره متانولی تهیه شده توسط ۱۰۰ سی‌سی اسید کلرید ترکیب گردید و بعد از به هم زدن روی بنماری به دکانتور انتقال داده شد و سپس دی اتیل اتر هم به دکانتور اضافه شد و بعد از بهم زدن فاز آبی استخراج شد. در تست‌های اولیه‌ای که انجام گرفت اوج اثر عصاره سنسیو وولگاریس و دیوسپیروس لوتوس بر گلوتاتیون کبد Mice (موش سوری با وزن ۲۰ تا ۲۵ گرم و رعایت شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و دسترسی مطلوب و استاندارد به آب و غذا) به ترتیب ۲۰ و ۲۴ ساعت مشخص شد (جدول شماره ۱) نحوه طبقه‌بندی و تزریق نمونه‌ها به موش در ذیل آمده است. گروه‌های مورد آزمون عبارتند از:

گروه کنترل که نرمال سالین دریافت کرده است و ۲۴ ساعت بعد مورد آزمایش قرار گرفتند.

گروهی که فقط عصاره گیاه Diospyros lotus (۲۰mg/kg) دریافت کرده است و ۲۴ ساعت بعد مورد آزمایش قرار گرفتند.

گروهی که فقط عصاره گیاه Senecio vulgaris (۲۷mg/kg) در یافت کرده است و ۲۰ ساعت بعد مورد آزمایش قرار گرفتند.

گروهی که عصاره گیاه Diospyros lotus (۲۰mg/kg) و ۴ ساعت بعد عصاره گیاه Senecio vulgaris(۲۷mg/kg) در یافت کرده است. سپس بعد از ۲۰ ساعت مورد آزمایش قرار گرفته است.

گروهی که عصاره گیاه Diospyros lotus (۴۰mg/kg) و ۴ ساعت بعد عصاره گیاه Senecio vulgaris(۲۷mg/kg) در یافت کرده است. سپس بعد از ۲۰ ساعت مورد آزمایش قرار گرفته است.

گروهی که عصاره گیاه Diospyros lotus (۸۰mg/kg) و ۴ ساعت بعد عصاره گیاه Senecio vulgaris(۲۷mg/kg) دریافت کرده است. سپس بعد از ۲۰ ساعت مورد آزمایش قرار گرفته است. بعد از مواجهه

حیوانات با غلظت‌های متفاوت عصاره های مورد نظر در زمان‌های مشخص شده موش‌ها توسط کتامین و زایلیزین بیهوش شده و برای اندازه‌گیری گلوتاتیون مورد بررسی قرار گرفتند. با عمل جراحی شکم حیوان باز شده و اعماء و احشاء آن به یک طرف هدایت گردید. سپس کبد آن با پنس و قیچی جدا شده و ۰/۱ گرم آن با ترازو وزن شده و به لوله هموژنیزر انتقال داده می شود. ۱ سی‌سی EDTA(Ethylene diamine tetraacetic acid) به آن اضافه شد و چند بار عمل هموژن کردن با پیستون انجام گرفت تا مخلوط یک نواختی حاصل شود. سپس محتویات لوله هموژنایزر به لوله سانتریفیوژ انتقال می‌یابد و همچنین ۰/۵ سی‌سی EDTA دوباره به لوله هموژنایزر ریخته و پس از تکان دادن، محتویات آن به لوله سانتریفیوژ منتقل گردید. لازم به ذکر است که لوله سانتریفیوژ در تمامی مراحل باید در ظرف حاوی یخ نگهداری شود. در مرحله بعدی به لوله سانتریفیوژ ۱/۵ سی‌سی TCA(Trichloroacetic acid) ۱۰ درصد جهت رسوب پروتئین‌ها اضافه شد TCA در واقع با پروتئین‌ها از ۶ محل کمپلکس محلول تشکیل می‌دهد و باعث رسوب پروتئین های کمپلکس داده شده می‌شود لازم به ذکر است که هدف این مطالعه اندازه‌گیری سطح سیستئین احیاء شده در گلوتاتیون است و پروتئین‌هایی دیگر نیز ممکن است حاوی این اسید آمینه در ساختمان خود باشند و در اندازه‌گیری، خطا ایجاد کنند، بنابراین با این کار حذف می شوند. سپس لوله سانتریفیوژ به دستگاه سانتریفیوژ انتقال داده شد و در دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ صورت گرفت وسپس ۱ سی‌سی از محلول بالایی به لوله سانتریفیوژ دیگر منتقل گردید و به آن ۲.۵ سی سی بافرتریس (Tris(hydroxymethyl aminomethane pH=۸/۹ (۰/۴ مولار) و ۰/۵ سی‌سی DTNB(5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) اضافه شد سپس لوله به خوبی تکان داده شد تا رنگ زرد یکنواختی در لوله حاصل گردید. در نهایت جذب محلول حاصله در ۴۱۲nm خوانده شد(DTNB با گلوتاتیون احیاء شده واکنش می‌دهد و یک ترکیب رنگی تولید می‌کند که در طول موج ۴۱۲ nm جذب دارد). بنابراین با خواندن جذب آن در این طول موج ومقایسه با منحنی استاندارد، که به‌صورت روزانه رسم می‌گردد غلظت گلوتاتیون بر حسب µmol/ml به‌دست می‌آید، به دلیل این‌که حجم کل لوله سانتریفیوژ ۳ سی‌سی است و ۱ سی سی از آن مورد بررسی قرار گرفت و همچنین ۰/۱ گرم از بافت کبد استفاده شد بنابراین اگر میزان غلظت حاصله در عدد ۳۰ ضرب شود میزان گلوتاتیون کبد برحسب µmol/g liver به‌دست می آید و چون عدد به‌دست آمده عدد بزرگی است در این مطالعه به‌صورت mmol/g liver بیان شده است(۱۶، ۱۷). به منظور بررسی و مقایسه سطح گلوتاتیون پس از محاسبه میانگین و انحراف معیارغاظت در گروه‌های مورد بررسی با استفاده از نرم افزار Prism به روش آنالیز واریانس‌ها مقایسه به‌عمل آمد که p <۰/۰۰۱ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تعیین میزان گلوتاتیون کبد موش بعد از تزریق عصاره گیاه دیوسپیروس لوتوس به مقدار mg/kg، ۲۰ نشان می دهد که این داده‌ها با نتایج حاصل از تعیین میزان گلوتاتیون کبد موش بعد از تزریق آب مقطر به عنوان گروه کنترل، اختلاف آماری معنی‌داری دارد (p <۰/۰۰۱). لذا تغییرات میزان گلوتاتیون را در گروه کنترل (آب مقطر) و گروه عصاره دیوسپیروس لوتوس به ترتیب ۰/۵۵ ± ۲۶/۸۹ می باشد.

نتایج حاصل از تعیین میزان گلوتاتیون کبد موش بعد از تزریق عصاره گیاه سنسیو وولگاریس به مقدار ۲۷kg/mg، نشان می دهد که این داده ها نیز با نتایج حاصل از تعیین میزان گلوتاتیون کبد موش بعد از تزریق آب مقطر به عنوان کنترل، اختلاف آماری معنی داری دارد (p<۰/۰۰۱). بنابراین عصاره گیاه دیوسپیروس لوتوس باعث افزایش میزان گلوتاتیون کبد موش می‌شود. در این

رابطه جدول شماره ۱ تغییرات میزان گلوتاتیون را در گروه کنترل و گروه عصاره دیوسپیروس لوتوس را نشان می‌دهد که به ترتیب ۰/۵۵ ± ۲۶/۸۹ و ۰/۸۳ ± ۳۰/۸۲ می‌باشد.

نتایج حاصل از تعیین میزان گلوتاتیون کبد موش بعد از تزریق عصاره گیاه سنسیو وولگاریس به مقدار ۲۷ mg/kg، نشان می‌دهد که این داده‌ها نیز با نتایج حاصل از تعیین میزان گلوتاتیون کبد موش بعد از تزریق آب مقطر به عنوان کنترل، اختلاف آماری معنی‌داری دارد (p <۰/۰۰۱). بنابراین عصاره گیاه سنسیو و ولگاریس باعث کاهش میزان گلوتاتیون کبد موش می‌شود. لازم به ذکر است که طبق جدول شماره ۱، تغییرات میزان گلوتاتیون را در گروه عصاره سنسیو وولگاریس ۰/۸۴ ± ۱۷/۲۲ می باشد.

نتایج حاصل از اثر محافظتی عصاره گیاه دیوسپیروس لوتوس در ۳ غلظت ۴۰، ۲۰ و ۸۰ میلی گرم در میلی‌لیتر در برابر غلظت ۲۷ میلی گرم در میلی‌لیتر عصاره سنسیو وولگاریس نشان می‌دهد، که مقدار گلوتاتیون حاصل از این سه گروه دیوسپیروس لوتوس و سنسیو وولگاریس نسبت به گروه سنسیو وولگاریس به تنهایی افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است که این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p <۰/۰۰۱). در این رابطه میزان تغییرات غلظت گلوتاتیون طبق جدول شماره ۲ در سه گروه فوق به ترتیب ۰/۵۲ ± ۲۱/۸۹، ۰/۳۵ ± ۲۲/۹۶ و ۰/۳۹ ± ۲۴/۸۶ می باشد. برای بررسی اثر افزایش غلظت گیاه دیوسپیروس لوتوس در سه گروه دیوسپیروس لوتوس + سنسیو وولگاریس، غلظت ۲۰mg/ml با ۴۰mg/ml و غلظت ۴۰mg/ml با ۸۰mg/ml مقایسه شد که در هر دو گروه اختلاف مشاهده شد.

بحث

در این مطالعه ابتدا به بررسی اثرات گیاه دیوسپیروس لوتوس بر روی میزان گلوتاتیون پرداخته شد و همان‌طور که مشاهده شد عصاره گیاه دیوسپیروس لوتوس در مقایسه با گروه کنترل سبب افزایش معنی‌دار سطح گلوتاتیون خون شد. در توجیه این فرایند می‌توان به اثر آنتی‌اکسیدانتی گیاه دیوسپیروس لوتوس اشاره کرد که با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد بدن میزان مصرف گلوتاتیون را در بدن کم‌تر کرده است و همچنین می‌شود این فرضیه را مطرح کرد که عصاره گیاه دیوسپیروس لوتوس نقش ویتامین E و C را می‌تواند

جدول شماره ۱: نتایج حاصل از گلوتاتیون کبد Mice (mmol/g liver) بعد از مواجعه شدن با عصاره دیوسپیروس لوتوس و سنسیو وولگاریس جهت بدست آوردن زمان اوج اثر عصاره دیوسپیروس و سنسیو

زمان (h) / گروه	۴	۸	۱۲	۱۶	۲۰	۲۴	۲۸
گروه تزریق شده با عصاره دیوسپیروس لوتوس ۲۰mg/ml	۲۷/۰۹	۲۷/۳۹	۲۷/۹۲	۲۸/۲۱	۲۹/۱۳	۳۰/۷۸	۲۹/۲۶
گروه تزریق شده با عصاره سنسیو وولگاریس ۲۷mg/ml	۲۵/۷۲	۲۴/۳۳	۲۲/۷۹	۲۰/۲۸	۱۷/۲۰	۱۹/۴۲	۲۳/۱۸

[a]. زمان اوج اثر عصاره دیوسپیروس لوتوس ۲۴ ساعت است.

[b]. زمان اوج اثر عصاره سنسیو وولگاریس ۲۰ ساعت است.

جدول شماره ۲: نتایج حاصل از گلوتاتیون (mmol/g liver) کبد Miceهای مواجعه شده با عصاره گیاه دیوسپیروس لوتوس و سنسیو وولگاریس

گروه / Mice	کنترل	دیوسپیروس ۲۰ (mg/ml)	سنسیو (۲۷mg/ml)	دیوسپیروس (۲۰ mg/ml) + سنسیو (۲۷mg/ml)	دیوسپیروس (۴۰mg/ml)+ سنسیو (۲۷mg/ml)	دیوسپیروس (۸۰ mg/ml) +سنسیو (۲۷mg/ml)
±SD میانگین	۰/۵۵ ±۲۶/۸۹	۰/۸۳ ± ۳۰/۸۲	۰/۸۴ ± ۱۷/۲۲	۰/۵۲ ± ۲۱/۸۹	۰/۳۵ ± ۲۲/۹۶	۰/۳۹ ± ۲۴/۸۶

a. اختلاف آماری معنی دار نسبت به گروه کنترل (p <۰/۰۰۵).

b. اختلاف آماری معنی دار نسبت به گروه سنسیو ۲۷ mg/ml (p <۰/۰۵۰۰).

c. اختلاف آماری معنی دار نسبت به گروه دیوسپیروس ۲۰ mg/ml+ سنسیو 27mg/ml (p <۰/۰۵).

d. اختلاف آماری معنی دار نسبت به گروه دیوسپیروس ۴۰ mg/ml + سنسیو ۲۷ 7mg/ml (p <۰/۰۵).

بازی می‌کند (چون مشابه این دو ویتامین احتمالاً می‌تواند گلوتاتیون را افزایش و نقش آنتی‌اکسیدانی داشته باشد) و در تبدیل فرم اکسید گلوتاتیون (GSSG) به فرم احیائیش (GSH) نقش دارد. دیوسپیروس لوتوس همانند دیگر گونه‌های دیوسپیروس دارای میزان بالای از نفتاکینون‌ها به خصوص ۷- متیل ژوگلون می‌باشد. بسیاری از مطالعات نشان دادند که میوه این گیاه دارای اثرات فارماکولوژیکی مانند: ضد تب، خواب آور و ضد سرفه و به تازگی اثرات ضد التهابی، آنتی اکسیدانتی و اثرات سایتوتوکسیک در برابر تومور کلون به اثبات رسیده است(۵،۶). در این مطالعه به اثر عصاره گیاه سنسیو وولگاریس روی گلوتاتیون کبدی پرداخته شد که مشخص شد عصاره این گیاه نسبت به گروه کنترل سبب کاهش میزان گلوتاتیون می‌شود که این نتیجه را می‌توان به وجود آلکالوئید پیرازولیدینی (PAs) گیاه مربوط دانست. بیش‌تر موارد ضایعات حاصل از آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی ناشی از این گیاه به آرامی و پس از مصرف مداوم به مدت بیش از چند روز تا چند هفته ایجاد می‌شود ولی ظهور علایم بالینی به صورت ناگهانی اتفاق می‌افتد(۱۳-۱۱). در مرحله بعدی این مطالعه به اثر محافظتی گیاه دیوسپیروس لوتوس در مقابل گیاه سنسیو وولگاریس پرداخته شد که برای این کار ابتدا سه دوز ۲۰ ، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر عصاره گیاه دیوسپیروس لوتوس و سپس عصاره سنسیو وولگاریس به Mice تزریق شد، که مقدار گلوتاتیون حاصل از این سه گروه دیوسپیروس لوتوس و سنسیو وولگاریس نسبت به گروه سنسیو وولگاریس به تنهایی افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است که این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار بود. لازم به ذکر است که برای بررسی اثر افزایش غلظت گیاه دیوسپیروس لوتوس در سه گروه دیوسپیروس لوتوس + سنسیو وولگاریس، غلظت 20mg/ml با ۴۰ mg/ml و غلظت ۴۰ mg/ml با ۸۰ mg/ml مقایسه شد که در هر دو گروه اختلاف مشاهده شد که از لحاظ آماری معنی‌دار بود.

در این مطالعه به وضوح نشان داده شد که عصاره گیاه دیوسپیروس لوتوس در افزایش گلوتاتیون نقش دارد و به اثبات رسید که عصاره سنسیو وولگاریس سبب کاهش گلوتاتیون می‌شود و در نهایت نشان داده شد که عصاره گیاه دیوسپیروس لوتوس در مقابل گیاه سنسیو وولگاریس اثر محافظتی دارد که با افزایش غلظت عصاره دیوسپیروس لوتوس این محافظت بیش‌تر می‌شود، یعنی تا حدود زیادی جلوی کاهش سطح گلوتاتیون کبد Mice را می‌گیرد که دلیل آن می‌تواند وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی مانند فنول، فلاونوئید و نفتوکینون‌ها در گیاه دیوسپیروس لوتوس دانست که ترکیب سمی و اکسیدانتی پیرولیزیدینی گیاه سنسیو و ولگاریس را خنثی می‌کند(۱۱،۱۸). آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی تقریباً در همه گیاهان، میکرو ارگانیسم‌ها، قارچ‌ها و حتی در بافت‌های حیوانات یافت می‌شوند واکثر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از دسته ترکیبات فنلی می‌باشند(۱۸).

در مازندران هر دو گیاه به صورت بومی وجود دارد و متأسفانه گیاه سنسیو و ولگاریس در کنار محصولات کشاورزی برداشت و وارد سبد غذایی مردم می‌شود و می‌تواند مسمومیت خفیف تا متوسط و گاهاً شدید به خصوص عوارض کبدی را ایجاد نماید(۱۹، ۲۰) لذا با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان ازشیره یا دوشاب (عصاره) میوه گیاه دیوسپیروس لوتوس در افرادی که بیش‌تر در تماس با گیاه سنسیو وولگاریس هستند، به عنوان محافظتی و پیشگیری کننده بهره جست. از سوی دیگر با ارزیابی جامع تر بر روی سایر فاکتورهای بیوشیمایی و پاتولوژیکی حیوانی می‌توان نتایج قطعی‌تری را به دست آورد تا قابلیت تعمیم داده‌ها به جامعه انسانی بیش‌تر گردد.

References

1. Proctor PH, Reynolds ES. Free radicals and disease in man. Physiol Chem Phys Medical

NMR 1984; 16(3): 175-195.
2. Viña J, Saez GT, Wiggins D, Roberts AF, Hems R, Krebs HA. The effect of cysteine oxidation on isolated hepa-tocytes. Biochem J 1983; 212(1): 39–44.
3. Meister A, Anderson ME. Glutathione. Ann Rev Biochem 1983; 52: 711-760.
4. Azadbakht M. Medical plants classification. Tehran: Teimorzadeh; 1999. p. 153-255.
5. Mallavadhani, UV, Panda AK, Rao YR. Review article number 134 Pharmacology and chemotaxonomy of Diospyros. Phytochemistry 1998; 49(4): 901-951.
6. Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA, Eslami B. In Vitro Antioxidant Activity of Pyrus Boissieriana, Diospyros Lotus, Eryngium Caucasicum and Froriepia Subpinnata. J Rafsenjan Univ Med Sci 2009; 8(2): 139-150 (Persian).
7. Prakash AS, Pereira TN, Reilly PE, Seawright AA. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. Mutat Res 1999; 443(1-2): 53-67.
8. Domínguez-Díaz D, Reina M, Santos-Guerra A, Santana O, Agulló-Ortuño T, López-Barboa C, et al. Pyrrolizidine Alkaloids from Canarian endemic plants and their biological effects. Biochemical Systematics and Ecology 2007; 36(3): 153-166.
9. Evans WC. Trease and Evans Pharmacognosy. London: W.B. Saunders; 2002. p. 138-190.
10. Waston DH. Natural toxicants in food, 1st ed. England: Sheffield Academic Press; 1998. p. 13, 16, 23, 25.
11. Klaassen CD, Amdur MO, Doull J. Cassartt & Doulls Toxicology: the basic science of poisons. 6th ed. New York: McGraw-Hill, Medical Publishing Division; 2001. p. 158, 877-878.
12. Steglich W, Fugmann B, Lang-fugmann S, Adam G. Natural product, Stuttgart. New York: Thieme; 2000. p. 580.
13. Dewick PM. Medicinal Natural products: a biosynthetic approach. Chichester, England; New York: John Wiley & Sons; 1997. p. 284-285.
14. Rossoff IS. Encyclopedia of clinical toxicology. 1st ed. New York: The Parthenon publishing Group; 2002. p. 925.
15. Dart RC. The 5 minute toxicology consults. USA: Lippincott William and Wilkins; 2000. p. 610.
16. Hissin PJ, Hilf R. A Fluorometric Method for Determination or Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. Anal Biochem 1976; 74(1): 214-226.
17. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione Reductase and 2-vinylpyridine 2-vinypyridine. Anal Biochem 1980; 106(1): 207-212.
18. Ruberto G, Renda A, Daquino C, Amico V, Spatafora C, Tringali C, et al. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pom-ace extracts from five Sicilian grape cultivars. Food Chem 2007; 100(1): 203-210.
19. Azadbakht M, Talavaki M. Qualitative and Quantitive determination of pyrrolizidine alkaloids of wheat and flour contaminated with Senecio in Mazandaran province farms. Iranian J pharm Res 2003; 2(3): 179-183.
20. Azadbakht M, Nematzadeh GHA, Hosseinpour Azad N, Shokri E. Quantitative and Qualitative Investigation of Pyrrolyzidine Alkaloids in Roots, Leaves, Petals and Seeds of Iranian Echium Amoenum Fisch. & Mey. J Mazand Univ Med Sci 2012; 21(suppl 1): 131-137 (Persian).