

ORIGINAL ARTICLE

Effect of Shilajit on the Levels of Pro-inflammatory and Anti-inflammation Cytokines in Hepatic Injury in Male Rats

Farhood Ghazaai Firozsalari¹,
Nader Shahrokh²,
Mohammad Khaksari Hadad³,
Gholamreza Asadikaram³,
Jaber Atashbar¹

¹ MSc Student in Physiology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

² Associate Professor, Physiology Research Center, Institute of Basic and Clinical Physiology Sciences, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

³ Professor, Endocrinology and Metabolism Research Center, Institute of Basic and Clinical Physiology Sciences, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

(Received April 9, 2017 ; Accepted October 16, 2017)

Abstract

Background and purpose: Cytokines regulate a broad range of biological and pathological processes. They play an important role in liver damage. Inflammatory and antioxidant factors are important causes of liver damage. Shilajit is known as an anti-inflammatory and antioxidant agent. Therefore, the main aim of this study was to determine the effect of Shilajit on levels of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in liver injury.

Materials and methods: In this experimental study, 80 male Wistar rats were randomly divided into two main groups: A and B. Each group was organized into five subgroups: control, acetaminophen (A) or bile duct obstruction (BDL) (B), low dose, high dose, and vehicle. All subgroups except the controls in group A received 500 mg/kg acetaminophen via IP injection, while BDL was performed in all subgroups in group B. Then in group A, two hours and in group B seven days after injury, the treatment subgroups with drug and vehicle received 150 mg/kg (low dose) and 250 mg/kg (high dose) shilajit and distilled water as vehicle, for one and six days, respectively. After completing treatment, liver samples were taken for laboratory analysis.

Results: Low-dose Shilajit treatment reduced IL-10, IL-6, IL-1 β , and TNF- α levels, which had been increased by a single dose of 500 mg/kg acetaminophen ($p<0.05$).

Conclusion: Shilajit is effective in reducing inflammation and liver damage caused by high-dose consumption of acetaminophen.

Keywords: Shilajit, acetaminophen, bile duct, cytokine, liver

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (159): 1-13 (Persian).

اثر شیلاجیت بر سطح سایتوکاین های پیش التهابی و ضد التهابی در آسیب کبدی در موش صحرایی نر

فرهود قاضی فیروزسالاری^۱

نادر شاهرخی^۲

محمد خاکساری حداد^۳

غلامرضا اسدی کرم^۴

جابر آتش بار^۱

چکیده

سابقه و هدف: سایتوکاین ها طیف وسیعی از فرایندهای پاتولوژیکی و بیولوژیکی را تنظیم می کنند و نقش مهمی در آسیب های کبدی دارند. عوامل التهابی و اکسیدانی از علل مهم آسیب های کبدی می باشند. از آنجایی که شیلاجیت به عنوان یک عامل ضدالتهابی و آنتی اکسیدانی شناخته می شود، لذا هدف اصلی این مطالعه تعیین اثر شیلاجیت بر سطح سایتوکاین های پیش التهابی و ضد التهابی در آسیب کبد می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۸۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به دو دسته A و B تقسیم شدند که هر دسته شامل ۵ گروه کترل، استامینوفن (A) و یا انسداد مجرای صفوای (B)، دوز کم مومنایی، دوز زیاد مومنایی و حلال می باشند. تمامی گروه ها به جز گروه کترل، در دسته A، ۵۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم استامینوفن به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و در دسته B، انسداد مجرای صفوای انجام شد. سپس در دسته A پس از ۲ ساعت و در دسته B، هفت روز بعد از آسیب، به مدت یک و شش روز به ترتیب گروه های تحت درمان ۱۵۰ mg/kg و ۲۵۰ mg/kg شیلاجیت و گروه حلال، آب مقطار به عنوان حلال شیلاجیت دریافت کردند. پس از اتمام دوره درمان، نمونه هی کبد جهت انجام آزمایشات تهیه شد.

یافته ها: درمان با دوز کم شیلاجیت، میزان سطح IL-10، IL-6 و TNF-α که با مصرف تک دوز ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر استامینوفن افزایش یافته بود، را کاهش داد ($p < 0.05$).

استنتاج: شیلاجیت در کاهش التهاب و آسیب های کبدی ناشی از مصرف دوز زیاد استامینوفن موثر است.

واژه های کلیدی: شیلاجیت، استامینوفن، مجرای صفوای، سیتوکین، کبد

مقدمه

بیماری های متعددی هم چون سنگ کیسه صفوایی، انسداد مجرای صفوایی، تومورهای پانکراسی و سمیت های دارویی موجب تداوم کلستازیس شده و انباستگی اسیدهای صفوایی سمی و تشدید التهاب و جراحت سلول های کبدی از فاکتورهای عمدتی هستند که باعث آسیب کبدی و فیروز می شوند (۱-۳).

Email: nshahrokhisa@yahoo.com

مؤلف مسئول: نادر شاهرخی- کرمان: دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۲. دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، پژوهشکده علوم پایه و فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۳. استاد، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشکده علوم پایه و فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۴. تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۲۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۳/۲۹

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۷/۲۴

و همکاران توصیف کردند که هومیک اسید به تنها بی و یا همراه با سایر داروهای ضد التهابی مانند ایندوماتاسین در کاهش التهاب حاد و مزمن در موش‌های نر مفید هستند^(۲۰). Goel و همکاران هم چنین نشان دادند که شیلاجیت دارای خواص ضد التهابی می‌باشد^(۲۱). گزارش شده است که شیلاجیت می‌تواند التهاب در ادم پدال و (pedal oedema and granuloma pouch) کیسه گرانولوم (pedal oedoma and granuloma pouch) را کاهش دهد^(۲۲). ناشی از کاراگنین (carrageenan) را کاهش دهد^(۲۳). Van Rensburg و همکاران نشان دادند که ترکیبات هوم دار مانند پتاسیم هومات باعث کاهش سطوح سایتوکین‌های پیش التهابی TNF α , IL-6 و IL-1 β از سلول‌های تک هسته‌ای می‌شوند^(۲۴). با توجه به این که سایتوکین‌ها نقش مهمی در آسیب‌های کبدی بازی می‌کنند، بنابراین اندازه‌گیری مقادیر آن‌ها می‌تواند شاخص مهمی در پاسخ به درمان با داروها باشد^(۲۵). سایتوکاین‌ها طیف وسیعی از فرایندهای پاتولوژیکی و بیولوژیکی را کنترل می‌کنند و نشان داده شده است که در برخی از انواع التهاب که تولید IL-1 و TNF α افزایش می‌یابد، با مهار این سایتوکین‌ها، شدت بیماری کاهش یافته است^(۲۶). از آنجایی که آسیب‌های کبدی اغلب ناشی از افزایش التهاب و عوامل اکسیدانی ایجاد می‌شود و با توجه به این که اثرات حفاظتی شیلاجیت در بهبود آسیب کبدی در مطالعه قبلی گروه، با هدف بررسی‌های بیوشیمیایی و هیستو پاتولوژی نشان داده شد، لذا ما در این مطالعه جهت بررسی برخی از مکانیسم‌های احتمالی هپاتوپروتکتیو شیلاجیت این فرضیه را مورد آزمون قرار دادیم که آیا اثر شیلاجیت بر کاهش آسیب کبدی ناشی از مصرف دوز زیاد استامینوفن و کلستاز خارج کبدی از طریق اثر بر سیتوکین‌ها اعمال می‌شود؟ لذا اثرات شیلاجیت بر این سیتوکین‌ها بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از ۸۰ سر موش صحرایی نر

نهایتاً منجر به اختلالات کبدی، فیروز، سیروز و مرگ می‌شوند^(۶-۷). اورسودوکسی کولیک اسید (UDCA) و آنالوگ‌های آن می‌تواند باعث مهار التهاب و نیز باعث از بین رفتن اسیدهای صفراءوی سمی شوند. این تنها داروی تأیید شده‌ای است که به طور گسترده‌ای در بالین برای درمان بیماران کلستاز مانند سیروز صفراءوی اولیه (PBC) "primary biliary cirrhosis" استفاده می‌شود^(۸,۹). با این حال، یک تا دو سوم از بیماران کلستازیس مبتلا به PBC به طور کامل به UDCA پاسخ نمی‌دهند^(۹). فارنزوئید آگونیست رسپتور farnesoid X receptor agonist (X) اثرات آنتی کلستازیس خود را با تغییر در متابولیسم اسیدهای صفراءوی در مدل‌های آزمایشگاهی ایجاد می‌کند^(۱۰,۱۱). بنابراین، جستجو برای داروهایی که به طور بالقوه هدف‌شان بهبود التهاب و کاهش اسیدهای صفراءوی سمی باشد، برای درمان آسیب‌های داخل و خارج کبدی مهم است.

ماده طبیعی شیلاجیت با نام علمی Asphaltum یک ماده قهوه‌ای کمرنگ متمایل به قهوه‌ای سوخته است که از صخره‌های موجود برخی رشته کوه‌ها به دست می‌آید که مشکل از یک ترکیب پیچیده از مواد هوموسی و متابولیت‌های گیاهی و میکروبی واقع در ریزوسفرهای صخره‌های سنگی است. اجزای آلی اصلی آن عبارتند از اسید هیومیک، اسید فولویک، اسید بنزوئیک، اسید هیپوریک، اسیدهای چرب، رزین، مواد موم مانند، صمغ‌ها، آلبومینویدها و مواد گیاهی می‌باشد^(۱۵). نشان داده شده است که این ترکیبات می‌توانند با مهار متازنیز و جاروب رادیکال‌های آزاد و حذف ترکیبات سمی از گسترش سرطان جلوگیری کنند^(۱۶,۱۷).

شیلاجیت می‌تواند تولید سیتوکین توسط سلول‌های ایمنی فعال را افزایش داده و انسجام و یکپارچگی سلولی را حفظ کند^(۱۸). شیلاجیت و ترکیبات هومیک آن دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد ویروسی، ضد التهابی، ضد اولسراتیو و آنتی موتابنیک است^(۱۹).

۳. گروه دوز کم شیلایجیت: (L) حیواناتی که یک هفته بعد از انسداد به مدت ۶ روز دوز 150 mg/kg شیلایجیت به صورت گاواز دریافت کردند.^(۲۷)
۴. گروه دوز زیاد شیلایجیت (H): حیواناتی که یک هفته بعد از انسداد به مدت ۶ روز دوز 250 mg/kg شیلایجیت به صورت گاواز دریافت کردند.^(۲۶)
۵. گروه حلال (Veh): حیواناتی که یک هفته بعد از انسداد به مدت ۶ روز، حلال شیلایجیت برابر با حجم شیلایجیت مصرفی به صورت گاواز دریافت کردند.

روش القاء آسیب کبدی

برای ایجاد کلستاز خارج کبدی، حیوانات با کتامین (50 mg/kg) و زایلazین (10 mg/kg) به طور کامل بیوهش شده و پس از لاپاراتومی، مجرای صفوراوی با دو گره در فاصله‌ی چند میلی متری توسط نخ بسته شده و حد فاصل بین دو گره قطع گردید. سپس جدار شکم در دو لایه‌ی فاسیا و پوست به ترتیب توسط نخ جذبی Plain و نخ غیر جذبی Silk بخیه شد.^(۲۸). برای ایجاد آسیب داخل کبدی، حیوانات ۱۶ ساعت قبل از ایجاد آسیب بدون غذا نگه داشته شدند و آب آزادانه در اختیار آن‌ها قرار گرفت. از استامینوفن با تک دوز 500 mg/kg به صورت داخل صفاقی استفاده شد.^(۲۸). تجویز دارو و تهیه نمونه: در گروه‌های کلستاز خارج کبدی، هفت روز بعد از بستن مجرای صفوراوی و به مدت شش روز (27)، داروی شیلایجیت با دوزهای 150 mg/kg و 250 mg/kg به صورت گاواز به حیوانات داده شد. در گروه‌های آسیب داخل کبدی، ۲ ساعت بعد از تجویز استامینوفن که ایجاد آسیب کبدی می‌کند، شیلایجیت به صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد.

در پایان دوره‌های درمانی، حیوانات مورد مطالعه با کتامین (50 mg/kg) و زایلazین (10 mg/kg) بیوهش شده و نمونه‌ی کبدی جهت سنجش میزان سیتوکین‌ها در دمای -70 درجه سانتی گراد فریز شد.^(۲۹، ۲۸).

نزد آلبینو N-Mari با وزن $300-250$ گرم استفاده شد. حیوانات از حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی کرمان خریداری و در شرایط طبیعی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و رژیم غذایی استاندارد در دمای 25 درجه سانتی گراد حیوانخانه نگهداری شدند. این پژوهش با مجوز شماره ۱۴۳IR.kmu.REC.1395. کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شد.

گروه‌های مورد مطالعه

ابتدا حیوانات به دو دسته A و B که هر دسته خود شامل ۵ گروه بود، تقسیم شدند ($n=8$).

A- آسیب داخل کبدی:

۱. گروه کترل-شم: (C-Sh) حیواناتی که $0/5$ میلی لیتر حلال استامینوفن (آب مقطر) دریافت کردند.
۲. گروه استامینوفن (A): حیواناتی که تک دوز 500 mg/kg استامینوفن به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.^(۲۶).

۳. گروه دوز کم شیلایجیت (L): حیواناتی که دو ساعت بعد از تجویز استامینوفن، تحت درمان با دوز 150 mg/kg شیلایجیت قرار گرفتند.

۴. گروه دوز زیاد شیلایجیت (H): حیواناتی که دو ساعت بعد از تجویز استامینوفن، تحت درمان با دوز 250 mg/kg شیلایجیت قرار گرفتند.

۵. گروه حلال (Veh): حیواناتی که دو ساعت بعد از تجویز استامینوفن، $0/5$ میلی لیتر حلال شیلایجیت (آب مقطر) دریافت کردند.

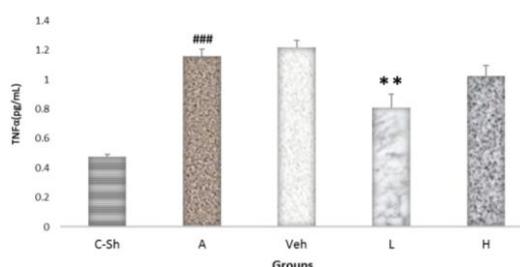
B- کلستازیس خارج کبدی:

۱. گروه شم: (C-Sh) حیوانات سالمی که همه عملیات آماده‌سازی برای انسداد مجرای صفوراوی (BDL) در آن‌ها انجام شد ولی مجرای صفوراوی آن‌ها مسدود نشد.
۲. گروه BDL: حیواناتی که تحت انسداد مجرای صفوراوی (BDL) قرار گرفتند ولی دارو دریافت نکردند.

گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و سپس آزمون Tukey آنالیز گردیدند. نتایج نهایی به صورت Mean \pm SEM گزارش و P<0.05 به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر شیلاجیت بر سطح سایتوکین‌های IL-1 β , TNF α , IL-6 و IL-10 در گروه‌های کلستازیس داخل کبدی: نمودار شماره ۱ نشان می‌دهد که TNF α در گروه استامینوفن (A=1.160 \pm 0.462) نسبت به گروه کنترل شم (C-Sh=0.4750 \pm 0.0162) افزایش معنی دار (p<0.001) و در گروه دوز کم شیلاجیت (L=0.8079 \pm 0.092) نسبت به گروه استامینوفن (A=1.160 \pm 0.462) کاهش معنی دار نشان می‌دهند (p<0.05). در گروه دوز زیاد شیلاجیت (H=1.0244 \pm 0.070) نسبت به گروه استامینوفن (A=1.160 \pm 0.462) کاهش یافته که این کاهش معنی دار نبود. هم‌چنین در گروه Veh شیلاجیت (Veh=1.2179 \pm 0.047) با گروه استامینوفن (A=1.160 \pm 0.462) اختلاف معنی دار مشاهده نگردید.



نمودار شماره ۱: اثر دوزهای مختلف شیلاجیت بر TNF α در آسیب داخل کبدی **: P<0.05 در مقابل گروه درمان شده با دوز کم شیلاجیت (L) با گروه A. ***: P<0.001 در مقابل گروه Veh. A: استامینوفن، L: دوز کم شیلاجیت، H: دوز زیاد شیلاجیت (250 mg/kg)، Veh: حلال

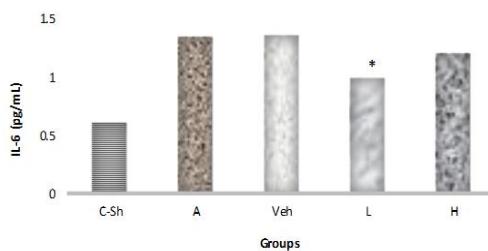
نمودار شماره ۲ نشان می‌دهد که IL-1 β در گروه استامینوفن (A=0.9969 \pm 0.030) نسبت به گروه کنترل شم

تنهیه شیلاجیت شیلاجیت از ساکنان محلی در ساردوئیه جیرفت / کرمان / ایران تهیه شد که توسط همکاران دانشکده داروسازی صحبت آن تایید گردید. تهیه نمونه‌های خالص موکبایی بر اساس حلالت آن در آب که توسط Jung و همکارانش شرح داده شده بود، صورت گرفت (۳۰). ابتدا ۱۰۰ گرم از نمونه‌های خرد شده در ۵۰۰ میلی لیتر آب قرار گرفت و به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق shaker شدند. سپس محلول حاصله توسط صافی (insoluble impurities) صاف شدند. جهت خشک کردن ابتدا محلول در Rotary evaporator تحت کاهش فشار جهت جلوگیری از تغییر ترکیبی آن تخلیص شد و سپس عصاره آبی موکبایی جهت استفاده با غلظت ۲۵۰ میلی گرم / میلی لیتر تهیه گردید.

هموژنیزاسیون جهت اندازه گیری سیتوکین‌ها: به منظور هموژنیزاسیون، ۵۰۰ میلی گرم از هر کبد با ۲ میلی لیتر بافر (pH=7.2) حاوی Tris 50 mmol و کوکتل مهارکننده پروتئاز Roche (آلمان) توسط دستگاه هموژنایزر محلوط شد. محلول هموژنایز شده سپس با سانتریفوژ یخچال دار با دور ۴۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و در نهایت برای اندازه گیری سیتوکین‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

روش اندازه گیری سایتوکین‌ها سطح سایتوکین‌های IL-1 β , IL-6, IL-10 و TNF α نمونه‌های بافی تهیه شده طبق دستورالعمل کیت‌های ELISA مخصوص اندازه گیری سایتوکاین‌ها که از شرکت آلمانی Eastbiopharm خریداری گردید، اندازه گیری شد.

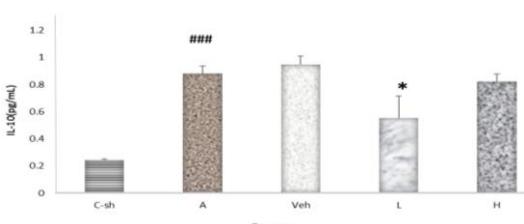
تجزیه و تحلیل آماری برای تجزیه و تحلیل داده‌ها در این مطالعه از نرم‌افزار SPSS نسخه بیست استفاده شد. میانگین داده‌ها در



نمودار شماره ۳: اثر دوزهای مختلف شیلاجیت بر IL-6 در آسیب داخل کبدی
 $P < 0.05$: اختلاف معنی دار گروه درمان شده با دوز کم شیلاجیت (L) با گروه A (با گروه Veh).

$P < 0.001$: اختلاف معنی دار گروه A با گروه C-Sh: گروه کنترل-شم، A: استامینوفن، L: دوز کم شیلاجیت (150 mg/kg)، H: دوز زیاد شیلاجیت (250 mg/kg).

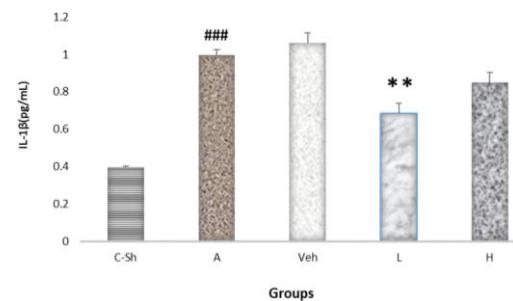
نمودار شماره ۴ نشان می دهد که میزان IL-10 در گروه استامینوفن ($A=0.8808 \pm 0.054$) نسبت به گروه کنترل-شم ($C-Sh=0.2429 \pm 0.006$) افزایش معنی داری نشان می دهد ($p < 0.001$) و میزان این سایتوکاین در گروه دوز کم شیلاجیت ($L=0.5536 \pm 0.161$) و گروه دوز زیاد شیلاجیت ($H=0.8212 \pm 0.055$) نسبت به گروه استامینوفن ($A=0.8808 \pm 0.054$) کاهش یافته که این کاهش در گروه دوز کم معنی دار بود ($p < 0.05$) ولی در گروه دوز زیاد معنی دار نبوده است و نیز بین گروه حلال ($Veh=0.9488 \pm 0.063$) با گروه استامینوفن ($Veh=0.9488 \pm 0.063$) اختلاف معنی دار مشاهده نشد.



نمودار شماره ۴: اثر دوزهای مختلف شیلاجیت بر IL-10 در آسیب داخل کبدی
 $P < 0.05$: اختلاف معنی دار گروه درمان شده با دوز کم شیلاجیت (A) با گروه Veh.

$P < 0.001$: اختلاف معنی دار گروه A با گروه C-Sh: گروه کنترل-شم، A: استامینوفن، L: دوز کم شیلاجیت (150 mg/kg)، H: دوز زیاد شیلاجیت (250 mg/kg).

($p < 0.001$): افزایش معنی دار ($C-Sh=0.3943 \pm 0.008$) و در گروه دوز کم شیلاجیت ($L=0.6848 \pm 0.055$) نسبت به گروه استامینوفن ($A=0.9969 \pm 0.030$) کاهش معنی داری نشان می دهد ($p < 0.001$) و در گروه دوز زیاد شیلاجیت ($H=0.8509 \pm 0.053$) نسبت به گروه استامینوفن ($A=0.9969 \pm 0.030$) کاهش یافته که این کاهش معنی دار نبود. بین گروه حلال ($Veh=1.0615 \pm 0.052$) با گروه استامینوفن ($A=0.9969 \pm 0.030$) اختلاف معنی دار مشاهده نگردید.

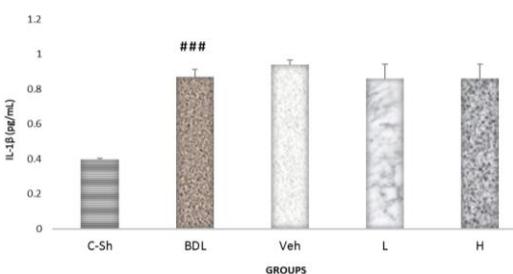


نمودار شماره ۲: اثر دوزهای مختلف شیلاجیت بر IL-1β در آسیب داخل کبدی
 $P < 0.05$: اختلاف معنی دار گروه درمان شده با دوز کم شیلاجیت (L) با گروه A (با گروه Veh).

$P < 0.001$: اختلاف معنی دار گروه A با گروه C-Sh: گروه کنترل-شم، A: استامینوفن، L: دوز کم شیلاجیت (150 mg/kg)، H: دوز زیاد شیلاجیت (250 mg/kg).

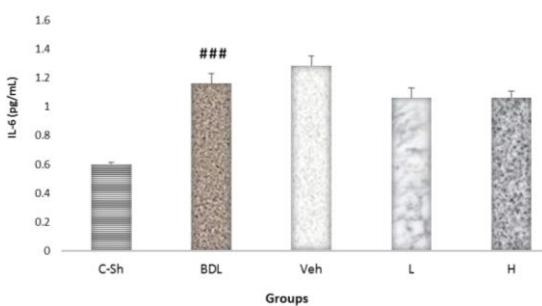
نمودار شماره ۳ نشان می دهد که میزان IL-6 در گروه استامینوفن ($A=1.335 \pm 0.028$) نسبت به گروه کنترل-شم ($C-Sh=0.6086 \pm 0.0147$) افزایش معنی داری نشان می دهد ($p < 0.001$) و میزان این سایتوکاین در گروه دوز کم شیلاجیت ($L=1.0091 \pm 0.114$) و گروه دوز زیاد شیلاجیت ($H=1.2068 \pm 0.051$) نسبت به گروه استامینوفن ($A=1.335 \pm 0.028$) کاهش یافته که این کاهش هم در گروه دوز کم و هم در گروه دوز زیاد معنی دار بود ($p < 0.05$) ولی بین گروه حلال ($Veh=1.3731 \pm 0.036$) با گروه استامینوفن ($A=1.335 \pm 0.028$) اختلاف معنی دار مشاهده نشد.

به گروه کنترل شم (C-Sh=0.6011±0.014) افزایش معنی داری نشان می دهد ($p<0.001$) و در گروه های دوز کم شیلاجیت ($L=1.0606±0.067$) و دوز زیاد شیلاجیت ($H=1.0636±0.045$) نسبت به گروه انسداد مجرای صفوایی (BDL=1.163±0.068) کاهش مشاهده شد ولی این کاهش معنی داری نبود. همچنین بین گروه و یکل Veh با انسداد مجرای صفوایی ($Veh=1.2844±0.067$) اختلاف معنی داری مشاهده شد (BDL=1.163±0.068) نگردید.



نمودار شماره ۶: اثر دوزهای مختلف شیلاجیت بر IL-1 β در کلستازیس خارج کبدی

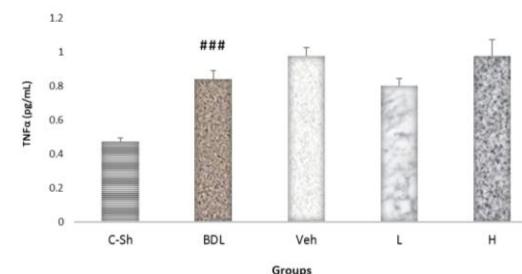
$P<0.001$:*** اختلاف معنی دار گروه BDL با گروه C-Sh، BDL: انسداد مجرای صفوایی، Veh: حلال، C-Sh: دوز کم شیلاجیت (250 mg/kg)، H: دوز زیاد شیلاجیت (150 mg/kg)



نمودار شماره ۷: اثر دوزهای مختلف شیلاجیت بر IL-6 در کلستازیس خارج کبدی

$P<0.001$:*** اختلاف معنی دار گروه BDL با گروه C-Sh، BDL: انسداد مجرای صفوایی، Veh: حلال، C-Sh: دوز کم شیلاجیت (250 mg/kg)، H: دوز زیاد شیلاجیت (150 mg/kg)

اثر شیلاجیت بر سطح سایتوکین های IL-1 β ، TNF α و IL-6 در گروه های کلستازیس خارج کبدی: نمودار شماره ۵ نشان می دهد که TNF α (BDL=0.8396±0.050) گروه انسداد مجرای صفوایی (C-Sh=0.4745±0.019) افزایش معنی داری نشان می دهد ($P<0.001$) ولی در گروه های Veh=0.9747±0.052) و دوز کم شیلاجیت ($L=0.8019±0.043$) و دوز زیاد شیلاجیت ($H=0.974±0.098$) نسبت به گروه انسداد مجرای صفوایی (BDL=0.8396±0.050) اختلاف معنی داری مشاهده نگردید.



نمودار شماره ۵: اثر دوزهای مختلف شیلاجیت بر TNF α در کلستازیس خارج کبدی

$P<0.001$:*** اختلاف معنی دار گروه BDL با گروه C-Sh، BDL: انسداد مجرای صفوایی، Veh: حلال، C-Sh: دوز کم شیلاجیت (250 mg/kg)، H: دوز زیاد شیلاجیت (150 mg/kg)

نمودار شماره ۶ نشان می دهد که IL-1 β در گروه انسداد مجرای صفوایی (BDL=0.8686±0.044) نسبت به گروه کنترل شم (C-Sh=0.3961±0.007) افزایش معنی داری نشان می دهد ($p<0.001$)، ولی در گروه های ویکل (Veh=0.939±0.027) و دوز کم شیلاجیت ($L=0.8614±0.080$) و دوز زیاد شیلاجیت ($H=0.8613±0.080$) نسبت به گروه انسداد مجرای صفوایی (BDL=0.8686±0.044) اختلاف معنی داری مشاهده نگردید.

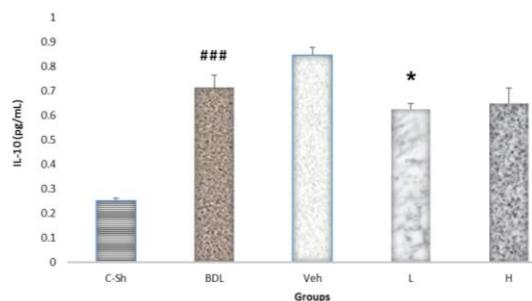
نمودار شماره ۷ نشان می دهد که IL-6 در گروه انسداد مجرای صفوایی (BDL=1.163±0.068) نسبت

ناشی از استامینوفن به دلیل خود استامینوفن نیست، بلکه ناشی از ایجاد متابولیت سمی آن یعنی N-استیل-P-بنزوکینین ایمین می‌باشد که از طریق سیستم سیتوکروم P450 ایجاد می‌شود^(۳۱). به طور طبیعی ذخایر گلوتاتیون کبدی با اتصال به متابولیت‌های توکسیک مانع آسیب سلول کبدی می‌گردد^(۴, ۱). تحقیقات نشان داده است که کاهش ترشح GSH در آسیب‌های کبدی، تحت تاثیر جریان صفوای وابسته به گروه‌های تیول قرار دارد و یا توسط القای سیتوکاین‌های پیش التهابی وساطت می‌شود^(۳۳). هم‌چنین گزارش شده که التهاب نقش مهمی در پیشرفت آسیب‌های کبدی ایفا می‌کند^(۳).

گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن (ROS/NOS) نیز اغلب در مسمومیت کبدی در گیرند. عوامل مسمومیت‌زا با افزایش تولید NOS و ROS، القای آنزیم نیتریک اکساید سنتاز، افزایش Ca^{2+} داخل سلولی و تحرك فعالیت فاگوسیت‌ها می‌توانند ایجاد آسیب کبدی کنند. هم‌چنین نقش گالاکتوز‌آمین که سبب فعالیت رادیکال‌های آزاد می‌شود، در سمیت کبدی شناخته شده است^(۳۳).

واکنش‌های مجاری و واکنش‌های التهابی در فیبروپلازی پورتال و پری پورتال نقش مهمی را در آسیب کبدی ایفا می‌کنند. اپتیلیوم مجاری یک‌سری مواد فعال زیستی از قبیل سیتوکاین‌ها و کموکاین‌ها (TNF α , IL6, IL8, NO) را ترشح می‌کند که نقش بالقوه‌ای در فیبروژنیز دارند^(۳۴). در آسیب‌های کبدی، نفوذ وسیع سلول‌های التهابی به ویژه لکوسیت‌ها (که سیتوکاین‌ها را می‌سازند)، مونوکوپیت‌ها و ماکروفائزها به پارانشیم بافت کبد و مجاری پورتال، صورت می‌گیرد. هم‌چنین، سلول‌های ستاره‌ای کبد که در حالت طبیعی به صورت غیرفعال می‌باشند، به دنبال استرس اکسیداتیو فعال می‌شوند و بعد از تغییر شکل به سلول‌های ایمنی بیان‌کننده α-SMA (آلfa-اکتین عضله صاف)، موجب سنتز و تجمع کلارازن در ماتریکس خارج سلولی می‌گردد^(۳۵). از سوی دیگر، لوکوسیت‌ها به طور بالقوه با تولید بعضی میانجی‌های فیبروزی نظر TGF β 1

نمودار شماره ۸ نشان می‌دهد که IL-10 در گروه انسداد مجرای صفوای (BDL=0.7138±0.050) نسبت به گروه C-Sh=0.2525±0.010 معنی‌داری نشان می‌دهد ($p<0.001$) و در گروه دوز کم شیلایجیت (L=0.6243±0.025) نسبت به گروه انسداد مجرای صفوای (BDL=0.7138±0.050) کاهش معنی‌دار نشان می‌دهد ($p<0.05$). هم‌چنین بین گروه‌های دوز زیاد شیلایجیت (H=0.6488±0.062) و ویکل (Veh=0.8461±0.032) با گروه انسداد مجرای صفوای (BDL=0.7138±0.050) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.



نمودار شماره ۸: اثر دوزهای مختلف شیلایجیت بر IL-10 در کلستازیس خارج کبدی

*: $P<0.001$ اختلاف معنی‌دار گروه BDL با گروه C-Sh
BDL: انسداد مجرای صفوای، Veh: حلال، C-Sh: شم کنترل، L: دوز کم شیلایجیت (150 mg/kg) H: دوز زیاد شیلایجیت (250 mg/kg)

بحث

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که مصرف مقادیر مشخصی از شیلایجیت، سطوح افزایش یافته سیتوکاین‌های IL-6، IL-10، TNF α و IL-1 β ناشی از مصرف دوز زیاد استامینوفن و IL-10 در کولستاز خارج کبدی را کاهش می‌دهد. اما بر سایر این سیتوکاین‌ها در کولستاز خارج کبدی ناشی از بستن مجرای صفوای اثری ندارد.

مسمومیت با مصرف بیش از حد (overdose) استامینوفن یکی از علل آسیب‌های کبدی معرفی شده است^(۳۱). مشخص شده است که مکانیسم آسیب کبدی

مطالعات پیشین نشان داده اند که کوئرستین با خاصیت آنتی اکسیدانی خود با کاهش میزان سایتوکین های التهابی IL-1، IL-6 و IL-8 باعث کاهش عوارض کبدی در سیروز الكلی می گردد. همچنین اثر کاهنده کوئرستین بر TNF- α به عنوان یکی از واسطه های اصلی تخریب کبد گزارش شده است.^(۴۹)

حذف یا کاهش TNF- α در کاستازیس باعث کاهش آسیب های کبدی و فیروز می شود.^(۵۰) در ارتباط با اینترلوکین ۱۰ به عنوان یک سیتوکین ضدالتهابی که با مصرف شیلاجیت بعد از مصرف دوز زیاد استامینوفن و انسداد مجرای صفوایی کاهش یافته است، گزارشاتی وجود دارد که در طی عفونت ها، اینترلوکین ۱۰ فعالیت سلول های NK و ماکروفازها و همچنین هر آنچه را که برای حذف مطلوب پاتوژن لازم است را مهار می کند، اما همچنین در آسیب بافتی نیز شرکت می کند. این سیتوکین می تواند هم مانع حذف پاتوژن و هم سبب اصلاح آسیب اینمی شود.^(۵۱) در گزارش دیگری آمده است که حذف تجربی اینترلوکین ۱۰ و یا مهار سیگنانلینگ آن می تواند کنترل پاتوژن را بهبود ببخشد و شدت بیماری را کاهش دهد.^(۵۲،۵۳) در مطالعه دیگری اشاره شده است که اگر غلظت های بالای اینترلوکین ۱۰ در طی عفونت ها به عنوان یک علت تلقی شود، این فرایند می تواند کلیرانس پاتوژن را مهار کند اما اگر این افزایش غلظت نتیجه ای از توان بالای آسیب باشد، افزایش غلظت آن سبب کاهش التهاب می شود.^(۵۴) همچنین گزارش شده علاوه بر زمان، مقادیر نسبی تولید سیتوکین های پیش التهابی و ضدالتهابی برای بهبودی مناسب آسیب ها مهم می باشد.^(۵۲) لذا با توجه به این موارد، کاهش سایتوکاین ضدالتهابی IL-10، IL-6، IL-1 β همراه با کاهش سایتوکاین های پیش التهابی TNF- α و TNF- β به وسیله شیلاجیت در این مطالعه می تواند عوارض و آسیب های کبد را کاهش دهد.

این مطالعه نشان داد سطوح سایتوکین های التهابی IL-6، IL-1 β و TNF- α در آسیب داخل کبدی در این

(Transforming growth factor-beta 1) بر سلول های ستاره ای کبد اثر گذاشته و موجب افزایش ستر ماتریکس خارج سلولی در بیماری های مختلف کبدی می گردد.^(۳۶) نشان داده شده است که در پاسخ به آسیب کبدی، یک سری واسطه های سمی از جمله فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF- α)، اینتر لوکین ۱ (IL-1) و اکسید نیتریک از ماکروفازها آزاد می شود.^(۳۷) گزارش شده موادی که خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی دارند در آسیب های کبدی نقش حفاظتی ایفا می کنند از جمله فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ Boerhaavia diffusa، که نقش هپاتوپروتکتیو آن در آسیب کبدی ناشی از استامینوفن مشخص شده است.^(۳۷) شیلاجیت دارای اثر ضدالتهابی بسیار قوی (۴۱-۴۹)، آنتی اکسیدانی (۴۲،۴۷) و آرامش بخشی (۴۳)، adaptogenic تعديل کننده سیستم ایمنی و آنتی دیس لیپیدمیک (۴۴،۴۰) می باشد و شیلاجیت می تواند باعث افزایش در میزان فعالیت سوپرا اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) و گلوتاتین پراکسیداز (GPX) در Striatum و قشر فرونتال در موش ها شود.^(۴۱)

در مطالعات گذشته، اثرات ضدالتهابی نیز برای شیلاجیت گزارش شده است.^(۲۱) همچنین گزارش شده که تجویز عصاره شیلاجیت در موش های سوری باعث کاهش التهاب و درد در فاز اول تست فرمالین و همچنین در تست writing می گردد.^(۳۹)

در گزارش دیگری آمده که شیلاجیت می تواند باعث کاهش شدید التهاب ناشی از کاراژنین در موش صحرابی شود.^(۴۰) همچنین تحقیقات گروه نویسنده گان نشان داد که این ماده دارای اثرات آنتی اکسیدان و ضدالتهابی بر آسیب ترومای مغزی است که خود نشان دهنده اثرات آنتی اکسیدان و ضدالتهابی این ماده است.^(۴۵) اسید فولویک موجود در شیلاجیت به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی در مطالعات متعددی موجب کاهش آسیب بافت کبدی در موش های تیمار شده با تراکلرید کربن (۴۶)، دریافت کننده چربی بالا^(۴۷) و متوترو کسات (۴۸) شده است.

عنوان یک ماده هپاتوپروتکتیو احتمالی در آسیب داخل کبدی در برابر مصرف زیاد استامینوفن موثر است.

مدل حیوانی به وسیله درمان با شیلاجیت کاهش معنی داری نشان می دهد، لذا می توان گفت شیلاجیت به

References

- Michael Trauner, Claudia Daniela Fuchs, Emina Halilbasic, Gustav Paumgartner. New Therapeutic Concepts in Bile Acid Transport and Signaling for Management of Cholestasis. *Review| Hepatology* 2017; 65(4): 1393-1404.
- Wagner M, Zollner G, Trauner M. New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *J Hepatol* 2009; 51(3): 565-580.
- Woolbright BL, Antoine DJ, Jenkins RE, Bajt ML, Park BK, Jaeschke H. Plasma biomarkers of liver injury and inflammation demonstrate a lack of apoptosis during obstructive cholestasis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 273(3): 524-531.
- Kim WR, Ludwig J, Lindor KD. Variant forms of cholestatic diseases involving small bile ducts in adults. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(5): 1130-1138.
- Poupon R, Chazouillères O, Poupon RE. Chronic cholestatic diseases. *J Hepatology* 2000; 32(1): 129–140.
- Yang H, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J leukoc Biol* 2013; 93(6): 865-873.
- Paumgartner G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: from pathobiology to pharmacological targets. *World J Gastroenterol* 2006; 12(28): 4445-4451.
- Fickert P, Wagner M, Marschall HU, Fuchsbichler A, Zollner G, Tsybrovskyy O, et al. 24-norUrsodeoxycholic acid is superior to ursodeoxycholic acid in the treatment of sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology* 2006; 130(2): 465-481.
- Parés A, Caballería L, Rodés J. Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 2006; 130(3): 715-720.
- Corpechot C, Abenavoli L, Rabahi N, Chrétien Y, Andréani T, Johanet C, et al. Biochemical response to ursodeoxycholic acid and longterm prognosis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2008; 48(3): 871-877.
- Liu Y, Binz J, Numerick MJ, Dennis S, Luo G, Desai B, et al. Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra-and extrahepatic cholestasis. *J Clin Invest* 2003; 112(11): 1678-1687.
- Trauner M, Wagner M, Fickert P, Zollner G. Molecular regulation of hepatobiliary transport systems: clinical implications for understanding and treating cholestasis. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39(4 Suppl): S111-S124.
- Huang L1, Zhao A, Lew JL, Zhang T, Hrywna Y, Thompson JR, et al. Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *J Biol Chem* 2003; 278(51): 51085-51090.
- Moschetta A, Bookout AL, Mangelsdorf DJ. Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonists in a mouse model. *Nat Med* 2004; 10(12): 1352-1358.

15. Peña-Méndez EM, Havel, J, Patočka J. Humic substances-compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *J Appl Biomed* 2005; 3 :13-24.
16. Ghosal S, Reddy J, Lal V. Shilajit I: chemical constituents. *J Pharm Sci* 976; 65(5): 772-773.
17. Shakir N, Salim N, Bhatty M. Studies on 'Silajit (Asphalt) Part-I. *Pak J Sci Industr Res* 1965; 28-30.
18. Vukskits AV, Hullár I, Bersényi A, Andrásosfszky E, Kulcsár M, Szabó J. Effect of fulvic and humic acids on performance, immune response and thyroid function in rats. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2010; 94(6): 721-728.
19. Pant KB, Singh B, Thakur N. Shilajit: a humic matter panacea for cancer. *Int J Toxicol Pharmacol Res* 2012; 4(2): 17-25.
20. Lown JF, Gill K, Cutler S, Cutler H, Pollock S. Anti-inflammatory humate compositions and methods of use thereof. Google Patents. 2006.
21. Goel RK, Banerjee RS, Acharya SB. Antiulcerogenic and anti inflammatory studies with shilajit. *J Ethnopharmacol* 1990; 29(1): 95-103.
22. Van Rensburg CE, Snyman JR, Mokoele T, Cromarty AD. Brown coal derived humate inhibits contact hypersensitivity; an efficacy, toxicity and teratogenicity study in rats. *Inflammation* 2007; 30(5): 148-152.
23. van Rensburg CE. Naude PJ. Potassium humate inhibits complement activation and the production of inflammatory cytokines in vitro. *Inflammation* 2009; 32(4): 270-276.
24. Burger D, DAYER JM. Cytokines, Acute Phase Proteins, and Hormones. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966(1): 464-473.
25. Ambrosino G, Naso A, Feltracco P, Carraro P, Basso SM, Varotto S, et al. Cytokines and liver failure: modification of TNF-and IL-6 in patients with acute or chronic liver decompensation treated with Molecular Adsorbent Recycling System (MARS). *Acta Biomed* 2003; 74(Suppl 2): 7-9.
26. Lin CC, Hsu YF, Lin TC, Hsu HY. Antioxidant and hepatoprotective effects of punicalagin and punicalin on acetaminophen-induced liver damage in rats. *Phytother Res* 2001; 15(3): 206-212.
27. Bhattacharya SK, Sen AP, Ghosal S. Effects of shilajit on biogenic free radicals. *Phytother Res* 1995; 9(1): 56-59.
28. Olteanu D, Filip A, Mureşan A, Nagy A, Tabaran F, Moldovan R, et al. The effects of chitosan and low dose dexamethasone on extrahepatic cholestasis after bile duct ligation in Wistar rats. *Acta Physiol Hung* 2012; 99(1): 61-73.
29. Yu JY, Ha JY, Kim KM, Jung YS, Jung JC, Oh S. Anti-inflammatory activities of licorice extract and its active compounds, glycyrrhetic acid, liquiritin and liquiritigenin, in BV2 cells and mice liver. *Molecules* 2015; 20(7): 13041-13054.
30. Jung CR, Schepetkin IA, Woo SB, Khlebnikov AI, Kwon BS. Osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells by Mumie extract. *Drug Develop Res* 2002; 57(3): 122-133.
31. Dong H, Haining RL, Thummel KE, Rettie AE, Nelson SD. Involvement of human cytochrome P450 2D6 in the bioactivation of acetaminophen. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(12): 1397-1400.
32. Shoda J1, Kano M, Oda K, Kamiya J, Nimura Y, Suzuki H, et al. The expression levels of plasma membrane transporters in

- the cholestatic liver of patients undergoing biliary drainage and their association with the impairment of biliary secretory function. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(12): 3368-3378.
33. Myagmar BE, Shinno E, Ichiba T, Aniya Y. Antioxidant activity of medicinal herb Rhodococcum vitis-idaea on galactosamine-induced liver injury in rats. *Phytomedicine* 2004; 11(5): 416-423.
34. Thirunavukkarasu C, Watkins SC, Gandhi Cr. Mechanisms of endotoxininduced NO, IL6, and TNF α production in activated rat hepatic stellate cells: Role of p38 MAPK. *Hepatology* 2006; 44(2): 389-398.
35. MS Wu, Liao CW, Du WY, Kao TC, Su KE, Lin YH, et al. Enhanced expression of transforming growth factor- β 1 in inflammatory cells, α -smooth muscle actin in stellate cells, and collagen accumulation in experimental granulomatous hepatitis caused by *Toxocara canis* in mice. *Acta Tropica* 2008; 105(3): 260-268.
36. Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin liver Dis* 2001; 21(3):417-426.
37. Nelson SD. Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen. *Semin liver Dis* 1990; 10(4): 267-278.
38. Golestan Jahromi M, Nabavizadeh F, Vahedian J, Nahrevanian H, Dehpour AR, Zare-Mehrjardi A. Protective effect of ghrelin on acetaminophen-induced liver injury in rat. *Peptides* 2010; 31(11): 2114-2117.
39. Malekzadeh G, Dashti-Rahmatabadi MH, Zanbagh S, Akhavi Mirab-bashii A. Mirab-bashii, Mumijo attenuates chemically induced inflammatory pain in mice. *Altern Ther Health Med* 2015; 21(2): 42-47.
40. Stohs SJ. Safety and efficacy of shilajit (mumie, moomiyo). *Phytother Res* 2014; 28(4): 475-479.
41. Ghosal S. Free radicals, oxidative stress and antioxidant defense. *Phytomedica* 2000; 21(1-2): 1-8.
42. Joukar S1, Najafipour H, Dabiri S, Sheibani M, Sharokhi N. Cardioprotective effect of mumie (shilajit) on experimentally induced myocardial injury. *Cardiovasc Toxicol* 2014; 14(3): 214-221.
43. Jaiswal A, Bhattacharya S. Effects of Shilajit on memory, anxiety and brain monoamines in rats. *Indian J Pharmacol* 1992; 24(1): 12-17.
44. Wright G, Shawcross D, Olde Damink SW, Jalan R. Brain cytokine flux in acute liver failure and its relationship with intracranial hypertension. *Metab Brain Dis* 2007; 22(3-4): 375-388.
45. Khaksari M, Mahmoodi R, Shahrokhi N, Shabani M, Joukar S, Aqapour M. The effects of shilajit on brain edema, intracranial pressure and neurologic outcomes following the traumatic brain injury in rat. *Iran J Basic Med Scie* 2013; 16(7): 858-864 (Persian).
46. Ebaid H, Bashandy SA, Alhazza IM, Rady A, El-Shehry S. Folic acid and melatonin ameliorate carbon tetrachloride-induced hepatic injury, oxidative stress and inflammation in rats. *Nutr Metab* 2013; 10(1): 20.
47. Sarna LK, Wu N, Wang P, Hwang SY, Siow YL, O K. Folic acid supplementation attenuates high fat diet induced hepatic oxidative stress via regulation of NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol* 2012; 90(2): 155-165.
48. Soliman ME. Evaluation of the possible protective role of folic acid on the liver toxicity induced experimentally by methotrexate in adult male albino rats. *Egypt J Histol*. 2009; 32(1): 118-128.

49. Chen X. Protective effects of quercetin on liver injury induced by ethanol. *Pharmacogn Mag* 2010; 6(22): 135-141.
50. Geier A1, Dietrich CG, Trauner M, Gartung C. Extrahepatic cholestasis downregulates Oatp1 by TNF α signalling without affecting Oatp2 and Oatp4 expression and sodiumindependent bile salt uptake in rat liver. *Liver Int* 2007; 27(8): 1056-1065.
51. Couper KN1, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunology*. 2008; 180(9): 5771-5777.
52. Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla GC, Belkaid Y, Kamamaka M, et al. IL-10 from CD4+ CD25- Foxp3- CD127- adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog* 2008; 4(2): e1000004.
53. Hesse M1, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leusink M, et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 172(5): 3157-3166.
54. Groux H1, Cottrez F, Rouleau M, Mauze S, Antonenko S, Hurst S, et al. A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. *J Immunol* 1999; 162(3): 1723-1729.