

Ameliorative Effect of *Viola odorata* L. Ethyl Acetate Extract against Nephrotoxicity Induced by Chronic Ethanol Exposure in Rats

Fatemeh Shaki^{1,2},
Milad Arab-Nozari³,
Pedram Elahi⁴,
Maryam Ghasemi⁵,
Emran Habibi^{6,7}

¹ Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ PhD Candidate of Toxicology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Student of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences; Sari, Iran

⁵ Associate Professor, Immunogenetics Research center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Traditional and Complementary Medicine Research Center, Addiction Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences; Sari, Iran

(Received November 4, 2018 ; Accepted June 25, 2019)

Abstract

Background and purpose: This study was designed to determine the protective effect of flower and leaf ethyl acetate extract of *Viola odorata* L. against ethanol induced chronic nephrotoxicity in male Wistar rats.

Materials and methods: Ethyl acetate extracts of flower and leaf of *V. odorata* were prepared. Then, Total phenolic and flavonoid contents of extracts were determined. Animals were randomly assigned into following groups: control (normal saline), ethanol (10 mg/kg, IP), ethanol with oral doses (125, 250, and 500 mg/kg) of flower and leaf ethyl acetate extracts and Vit E (positive control). After 28 days, animals were anesthetized, kidneys were removed and level of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation (LPO), protein carbonyl, and antioxidant content (glutathione) were evaluated. In addition, histopathological changes as well as total antioxidant capacity (TAC), BUN and Cr in serum were evaluated.

Results: Ethanol promoted significant increase in ROS, LPO, and P.C levels in kidney while it reduced GSH storage. We found that ethanol treatment led to significant histologic changes and also elevation of BUN and Cr. Furthermore, TAC decreased in the plasma of ethanol-treated rats. Administration of both extracts markedly inhibited renal oxidative stress and reduced BUN and Cr levels in the plasma. Furthermore, plasma TAC and pathological lesions were improved after treatment with both extracts.

Conclusion: *Viola odorata* showed protective effects against ethanol-induced nephrotoxicity, which may be attributed to its antioxidant activity. So, it can be considered effective against oxidative stress induced by chronic ethanol exposure in kidney tissue.

Keywords: ethanol, *Viola odorata*, kidney, oxidative stress, toxicity

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (175): 1-13 (Persian).

* Corresponding Author: Emran Habibi - Traditional and Complementary Medicine Research Center, Addiction Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: zfotoukian@gmail.com)

اثرات مهاری عصاره اتیل استاتی بنفشه معطر در برابر سمیت کلیوی ناشی از مواجهه مزمن با اتانول در موش صحرایی

فاطمه شکی^۱
میلاد عرب نوذری^۳
پدرام الهی^۴
مریم قاسمی^۵
عمران حبیبی^۶

چکیده

سابقه و هدف: هدف این مطالعه بررسی اثرات محافظتی عصاره های گل و برگ گیاه بنفشه معطر در برابر سمیت کلیوی ناشی از مواجهه مزمن با اتانول در موش های صحرایی نر بود.

مواد و روش ها: عصاره اتیل استاتی از گل و برگ بنفشه معطر تهیه و محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی آن تعیین شد. موش های صحرایی به ۹ گروه کنترل، اتانول (۱۰ mg/kg)، داخل صفاقی)، اتانول به همراه دوزهای خوراکی (۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ mg/kg) از عصاره برگ و گل گیاه و کنترل مثبت (ویتامین E) تقسیم شدند و بعد از ۲۸ روز درمان، کلیه ها جدا شد و فاکتورهای استرس اکسیداتیو (شامل گونه های فعال اکسیژن، لیپید پراکسیداسیون، پروتئین کربونیل و گلو تاتیون)، سطوح سرمی نیتروژن اوره خون، کراتینین، ظرفیت تام آنتی اکسیدانی پلاسما و نیز آسیب پاتولوژیک کلیه ارزیابی شد.

یافته ها: اتانول سبب افزایش ذرات فعال اکسیژن، لیپید پراکسیداسیون، پروتئین کربونیل و کاهش گلو تاتیون در کلیه شد و همچنین ضایعات پاتولوژیک در کلیه و افزایش سطوح سرمی نیتروژن اوره خون و کراتینین و نیز کاهش ظرفیت تام آنتی اکسیدانی پلاسما مشاهده شد. تجویز هر دو عصاره های گل و برگ گیاه، استرس اکسیداتیو و اختلالات بیوشیمیایی ناشی از اتانول را در بافت کلیه و سرم موش ها مهار کرد و سبب بهبود ظرفیت تام آنتی اکسیدانی و ضایعات پاتولوژیک شد.

استنتاج: بنفشه معطر اثرات محافظتی قابل توجهی در مقابل سمیت کلیوی ناشی از اتانول نشان داد که احتمالاً به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی آن می باشد. بنابراین این گیاه می تواند به عنوان یک درمان موثر در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از تماس مزمن با اتانول در بافت کلیه در نظر گرفته شود.

واژه های کلیدی: اتانول، بنفشه معطر، کلیه، استرس اکسیداتیو، سمیت

مقدمه

اتانول پر مصرف ترین ماده دارویی مورد سوء استفاده در جهان است. اختلالات ناشی از مصرف الکل به عنوان یک مشکل مهم سلامت عمومی محسوب می شود. بر طبق گزارشات اپیدمیولوژیک، ۵/۹ درصد از

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۲۱۶۴ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تأمین شده است.

E-mail: emrapharm@yahoo.com

مؤلف مسئول: عمران حبیبی - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

۱. مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار، گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشجوی دکتری تخصصی سم شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشجوی دکتری عمومی داروسازی، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. دانشیار، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات ژنتیک ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۶. مرکز تحقیقات طب سنتی و مکمل، پژوهشکده اعتیاد، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۷. استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۸/۲۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۴/۴

کل مرگ‌های سالیانه در اثر مصرف الکل رخ می‌دهد (۱). مطالعات نشان داده است که استفاده طولانی مدت الکل می‌تواند سبب نکروز و تغییرات ساختاری شدیدی در توپول‌های کلیه شود (۲). چندین مکانیسم برای سمیت کلیوی الکل پیشنهاد شده است که در این بین استرس اکسیداتیو، به عنوان یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌ها شناخته شده است (۳). برهم خوردن تعادل میزان اکسیدانت‌ها و دفاع آنتی اکسیدانی بدن استرس اکسیداتیو نام دارد (۴). مطالعات نشان می‌دهد که مصرف اتانول همراه با تولید مقادیر زیادی رادیکال آزاد در بافت‌های بدن است. برای مثال Bulle نشان داد که مصرف مزمن اتانول می‌تواند با واسطه تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد زنجیره استرس اکسیداتیو سبب اختلال و سمیت در بافت کلیه شود (۵). اتانول پس از ورود به گردش خون وارد کبد و سایر اندام‌های متابولیزان شده و در طی وقایع متابولیسم، رادیکال‌های آزاد زیادی را تولید می‌کند. علاوه بر کبد که محل اصلی متابولیسم اتانول است، کلیه نیز به دلیل دارا بودن سیستم متابولیزان در معرض آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از اتانول است (۶). لذا استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدان و تقویت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی بدن می‌تواند از آسیب‌های کلیوی ناشی از مصرف الکل جلوگیری نماید. برای مثال Sönmez و همکارانش مشاهده کردند که ملاتونین و ویتامین C به عنوان دو ترکیب آنتی اکسیدان، توانستند استرس اکسیداتیو و سمیت کلیوی حاصل از اتانول را مهار کنند (۷).

گیاه بنفشه معطر (*Viola odorata L.*) گیاهی از خانواده *Violaceae* و بومی آسیا، اروپا و آفریقا است. از این گیاه به عنوان Sweet viola نیز نام برده می‌شود. برگ‌های گیاه دارای رنگ سبز تیره و به شکل قلب با لبه‌های دندانه دار و گل‌های گیاه نوک تیز و بنفش یا آبی رنگ هستند (۸). در طب سنتی خواص مختلفی از جمله ضد التهاب، آنتی باکتریال و ضد تب، ضد تشنج، ضدیرقان و کاهش دهنده فشارخون از آن گزارش شده است (۹). اخیراً مطالعات مختلفی روی این گیاه انجام

شده و اطلاعاتی مبنی بر خواص آنتی اکسیدانی نیز از این گیاه به دست آمده است (۱۱،۱۰). هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظتی عصاره اتیل استاتی برگ و گل گیاه بنفشه معطر در مقابل سمیت کلیوی ناشی از مواجهه مزمن با اتانول در موش‌های صحرایی نر با رویکرد به خاصیت آنتی اکسیدانی این گیاه بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و عصاره‌گیری گیاه

اندام‌های هوایی گیاه (برگ و گل) از منطقه هزارجریب شهرستان نکا جمع‌آوری شد و پس از شناسایی توسط متخصص سیستماتیک گیاهی (دکتر مسعود آزادبخت) و تهیه نمونه هرباریومی با کد E₁-215-111 در واحد هرباریوم دانشکده داروسازی ساری نگهداری شدند. نمونه‌ها به مدت ۵ روز در سایه نگهداری شدند و سپس با قرارگیری در دستگاه آون با درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ هفته خشک شدند. در ابتدا ۵۰ گرم از اندام‌های گیاه به طور جداگانه پودر شده و به کمک یک حلال غیر قطبی به نام هگزان عملیات عصاره‌گیری اولیه به منظور جداسازی و حذف ترکیبات پیگمانی و چربی از پودرهای آسیاب شده، انجام شد. سپس عصاره هگزانی دور ریخته شد و در ادامه، عملیات عصاره‌گیری از پودرهای گل و برگ گیاه به طور مجزا و به روش خیساندن چندباره (Maceration) به وسیله ۵۰۰ میلی‌لیتر از حلال اتیل استات (۳ بار تکرار) در دمای اتاق انجام شد. عصاره‌های به دست آمده توسط دستگاه چرخان تحت شرایط خلا در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد و پس از آن توسط دستگاه فریز درایر به پودر کاملاً خشک تبدیل و در ظرف در بسته و درون یخچال نگهداری شدند.

تعیین محتوای تام فنل و فلاونوئید گیاه بنفشه معطر

محتوی تام فنلیک بر اساس میلی گرم گالیک اسید

طراحی مطالعه

موش‌های صحرایی نر با محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم در شرایط استاندارد دمایی و محیطی با دسترسی مناسب به آب و غذا و رعایت سیکل ۱۲ ساعته روشنایی و تاریکی نگهداری شدند. تمام مراحل آزمایشات با توجه به دستورالعمل‌های ثبت شده در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد (کد اخلاق: IR.MAZUMS.REC.95.2164). حیوانات به‌طور تصادفی به ۹ گروه شش تایی به شرح زیر تقسیم‌بندی شدند: گروه اول (کنترل) نرمال سالین و گروه دوم اتانول با دوز ۱۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. به گروه‌های سوم تا پنجم علاوه بر اتانول داخل صفاقی با دوز ۱۰ mg/kg، به ترتیب ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ mg/kg از عصاره گل گیاه بنفشه معطر به صورت خوراکی داده شد. گروه‌های ششم تا هشتم نیز اتانول ۱۰ mg/kg داخل صفاقی به همراه ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ mg/kg از عصاره برگ گیاه بنفشه معطر به صورت خوراکی دریافت کردند. به گروه نهم نیز ۱۰ mg/kg اتانول به همراه ۸۰ mg/kg ویتامین E (به عنوان کنترل مثبت) به صورت خوراکی داده شد. این پروتوکل به مدت ۲۸ روز متوالی ادامه یافت و پس از آن حیوان‌ها بیهوش و بافت کلیه آن‌ها جدا شد. بعد از هموژناسیون بافت‌ها، فاکتورهای پروتئین کربونیل، مالون دی آلدئید، گلو تاتیون و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ارزیابی شد. همچنین بررسی پاتولوژیک بافت کلیه نیز جهت ارزیابی میزان آسیب بافتی انجام شد. نمونه‌های خون نیز جهت اندازه‌گیری میزان کراتینین (Cr) و نیتروژن اوره خون (BUN) و نیز ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم از قلب موش‌های صحرایی جمع‌آوری شد.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین

محتوی پروتئین در بافت کلیه با روش برادفورد تعیین شد. از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد. نمونه‌های همورنه با کوماسی بلو ترکیب

به ازای هر گرم از عصاره خشک گیاه و به کمک روش اسپکتروفوتومتری و همراه با معرف فولین سیو کالتیو تعیین شد. ابتدا ۱ میلی لیتر از محلول عصاره با غلظت ۱ mg/ml را با ۵ میلی لیتر معرف ۱۰ برابر رقیق شده معرف فولین سیو کالتیو ترکیب نموده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌نماییم. سپس ۴ میلی لیتر از محلول ۷۵ mg/ml بی کربنات سدیم به آن افزوده و این بار به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه می‌کنیم. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد (۱۲). همچنین محتوای تام فلاونوئیدی با کمک روش اسپکتروفوتومتری و به وسیله آلومینیوم کلرید تعیین شد. از استاندارد کوئرستین با غلظت‌های مختلف (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ µg/ml) به منظور رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. به نیم میلی لیتر از عصاره با غلظت ۱ mg/ml، به ترتیب ۱/۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۰/۱ میلی لیتر محلول آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد و ۰/۱ پتاسیم استات ۱ مولار و در نهایت ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر می‌افزاییم و بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ nm قرائت شد. محتوای فلاونوئیدی بر اساس میلی گرم کوئرستین به ازای هر گرم عصاره خشک گیاه بیان شد (۱۲). ارزیابی فعالیت جاروب کنندگی رادیکال DPPH توسط عصاره‌های ایتیل استاتی برگ و گل گیاه بنفشه معطر از رادیکال DPPH (۱۰۱- دی فیل ۲ پیکریل هیدرازیل) جهت ارزیابی فعالیت جاروب کنندگی عصاره‌های گیاه استفاده شد. در ابتدا غلظت‌های مختلفی از عصاره‌ها در محلول متانولی DPPH (با غلظت ۱۰۰ µM) رقیق شدند و پس از نگهداری به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، میزان جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر ثبت شد. فرایند فوق ۳ بار تکرار شد. در این روش از ویتامین C و نیز بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA) به عنوان استاندارد استفاده شد. در نهایت غلظتی از نمونه‌ها که برای جاروب کردن ۵۰ درصد رادیکال‌های DPPH مورد نیاز بود، به عنوان IC₅₀ گزارش شد (۱۳).

شد و پس از گذشت ۱۰ دقیقه جذب آن‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس میزان پروتئین‌های نمونه‌ها به میزان ۱ میلی گرم پروتئین در هر میلی لیتر برای سایر آزمایشات تنظیم شد (۱۴).

اندازه‌گیری میزان ذرات فعال اکسیژن با فلوریمتری

اندازه‌گیری سطوح ROS با استفاده از معرف دی کلرو فلورسئین دی استات (DCFH-DA) انجام شد. به طور خلاصه معرف مذکور با غلظت نهایی $10 \mu\text{M}$ به نمونه‌ها افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. میزان رادیکال‌های آزاد تولید شده با کمک دستگاه فلوریمتر Shimadzu RF5000U در طول موج تحریکی 485nm و نشری 520nm اندازه‌گیری شد (۱۵).

اندازه‌گیری میزان لیپید پراکسیداسیون

اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدهید (MDA) به عنوان مارکر لیپید پراکسیداسیون توسط روش تیوباربتوریک اسید انجام شد. بدین ترتیب که 0.25 ml سولفوریک اسید 0.05 مولار به 0.2 ml از نمونه‌ها افزوده شد، سپس 0.3 ml تیوباربتوریک اسید 2 درصد به مجموعه فوق اضافه شد و همه میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری گرم انکوبه شد. سپس تیوب‌ها در ظرف یخ قرار داده و سرد شدند. در مرحله بعد 0.4 ml n-بوتانول به هر کدام از میکروتیوب‌ها افزودیم. سپس عملیات سانتریفیوژ در 3500 rpm و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و میزان MDA تشکیل شده در هر یک از میکروتیوب‌ها به وسیله قرائت جذب سوپرناتانت‌ها در طول موج 532nm توسط دستگاه الایزا (Tecan, Rainbow Thermo, and Austria) اندازه‌گیری شد (۱۶).

اندازه‌گیری پروتئین کربونیل

تعیین مقدار پروتئین کربونیل به روش اسپکتروفوتومتری انجام شد. به طور خلاصه 200 میکرولیتر از بافت

هموژن شده کلیه را داخل $500 \mu\text{L}$ از تری کلرواستیک اسید (TCA) 20 درصد وزنی حجمی ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4 درجه قرار دادیم تا استخراج صورت گیرد. سپس رسوب حاصله را با 500 میکرولیتر از دی نیترو فیل هیدرازین (DNPH) 0.2 درصد و 500 میکرولیتر از 2 HCL نرمال برای گروه کنترل مواجه کردیم. سپس نمونه‌ها را به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده و هر ۵ دقیقه ورتکس نمودیم. در مرحله بعد با افزودن 55 میکرولیتر از TCA 20 درصد پروتئین‌ها رسوب کردند. میکروتیوب‌ها پس از سانتریفیوژ، ۳ بار با $1000 \mu\text{L}$ از مخلوط اتانول-اتیل استات شستشو داده شدند. در نهایت محتویات میکروتیوب‌ها را در 200 میکرولیتر محلول ۶ مولار گوانیدین هیدروکلراید حل کرده و میزان پروتئین کربونیل‌ها را با قرائت جذب آن‌ها در طول موج 365 nm محاسبه نمودیم (۱۷).

اندازه‌گیری محتوای گلوکاتایون

محتوای گلوکاتایون به کمک معرف دی تیونیترو بنزوئیک اسید (DTNB) اندازه‌گیری شد. شدت رنگ تولید شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV1601 PC, ShimaDzu, Japan) در طول موج 412nm ارزیابی و میزان گلوکاتایون بر حسب نانومولار گزارش شد (۱۸).

ارزیابی ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در سرم

بدین منظور مقدار $200 \mu\text{L}$ از نمونه‌های سرم با 3 ml از واکنشگر TPTZ (تری فیل تری آزین) مخلوط و ورتکس شد. سپس نمونه‌ها و بلانک در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد و میزان جذب آن‌ها با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتری UV در طول موج 593 nm قرائت شد. از غلظت‌های مختلف FeSO_4 به عنوان استاندارد استفاده شد و نتایج بر اساس میکرومولار Fe^{2+} در هر لیتر محلول گزارش شد (۱۹).

اندازه گیری میزان BUN و Cr در خون موش های صحرایی
میزان BUN و Cr خون با کمک کیت تجاری
شرکت پارس آزمون اندازه گیری شد.

بررسی هیستوپاتولوژیک بافت کلیه

نمونه های بافت کلیه در فرمالین ۱۰ درصد فیکس
شده، در الکل دهیدره شد و در پارافین قرار گرفت و
پس از رنگ آمیزی توسط رنگ همتاکسین و اتوزین،
اسلایدها با کمک میکروسکپ نوری رویت شدند.

آنالیز آماری

نتایج بر حسب میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش
شده و همه آنالیزهای آماری توسط نرم افزار آماری
SPSS مدل ۱۴ انجام شد. از تست های آماری آنوای
یکطرفه با پست تست Tukey استفاده شد حدود معنی داری
 $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

محتوای تام فنل و فلاونوئید و میزان فعالیت
جاروب کنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط
عصاره های ایتیل استاتی گل و برگ گیاه بنفشه معطر
محتوای تام فنلیک عصاره ایتیل استاتی برگ و گل
بنفشه معطر به ترتیب 56.4 ± 0.9 و 83.8 ± 6.8
میلی گرم معادل گالیک اسید در یک گرم عصاره
خشک برگ و گل گیاه و محتوای تام فلاونوئیدی
عصاره های برگ و گل گیاه نیز به ترتیب 41.8 ± 2.1 و
 63.5 ± 3.9 میلی گرم معادل کوثرستین در یک گرم
عصاره خشک برگ و گل گیاه تعیین شد. همچنین
نتایج میزان IC_{50} عصاره ها جهت ارزیابی خاصیت
جاروب کنندگی رادیکال DPPH در جدول شماره ۱
گزارش شد.

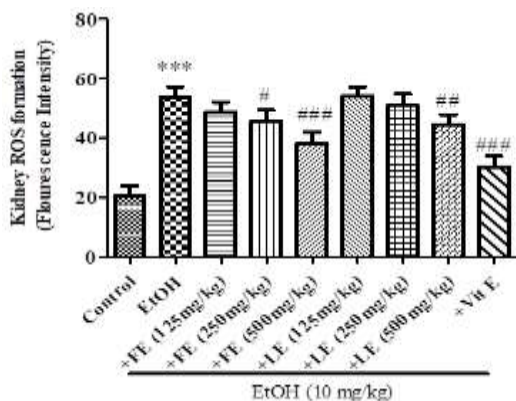
اثر عصاره های ایتیل استاتی گل و برگ بنفشه معطر بر
تشکیل گونه های فعال اکسیژن در کلیه موش صحرایی
تولید ROS یکی از نشانه های استرس اکسیداتیو

محسوب می شود. طبق نتایج نمودار شماره ۱ تزریق
اتانول سبب القای گونه های فعال اکسیژن در کلیه
موش های صحرایی شد. هر دو عصاره برگ و گل گیاه
بنفشه معطر میزان تشکیل گونه های فعال اکسیژن را در
مقایسه با گروه دریافت کننده اتانول به طور قابل
توجهی مهار کرد ($P < 0.05$).

جدول شماره ۱: ارزیابی فعالیت جاروب کنندگی رادیکال آزاد
DPPH توسط عصاره های ایتیل استاتی برگ و گل بنفشه معطر

عصاره ها و استانداردها	IC_{50} ($\mu g/ml$)
عصاره برگ بنفشه معطر	273.4 ± 5.8
عصاره گل بنفشه معطر	231.4 ± 7.2
C ویتامین	5.04 ± 0.02
بوتیل هیدروکسی آنیزول	53.82 ± 3.2

میزان مهار کنندگی ۵۰ درصد از رادیکال های آزاد (IC_{50}) به صورت
 $Mean \pm SD$ گزارش شده است. ویتامین C و بوتیل هیدروکسی آنیزول به
عنوان استاندارد هستند.



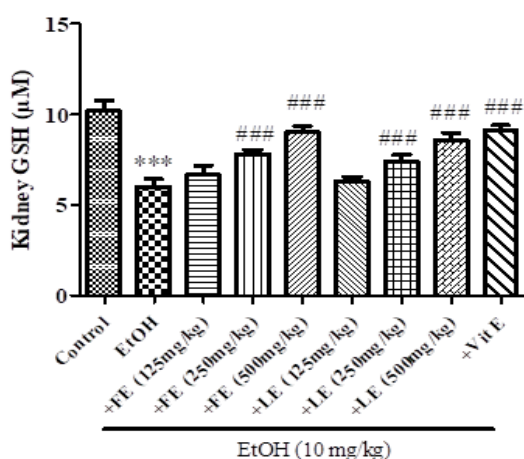
نمودار شماره ۱: تاثیر عصاره های ایتیل استاتی گل (FE) و برگ (LE)
گیاه بنفشه معطر بر میزان ROS تولید شده توسط اتانول (EtOH) در
بافت کلیه. نتایج به صورت $Mean \pm SD$ گزارش شده است.
***: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل است ($P < 0.001$).
#: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه اتانول است ($P < 0.05$).
##: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه اتانول است ($P < 0.01$).
###: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه اتانول است ($P < 0.001$).
ویتامین ای (Vit E): به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

اثر عصاره های ایتیل استاتی گل و برگ بنفشه معطر بر

پراکسیداسیون لیپیدی در کلیه موش صحرایی
میزان پراکسیداسیون لیپیدی با بررسی میزان تولید
مالون دی آلدئید (MDA) که یکی از محصولات نهایی

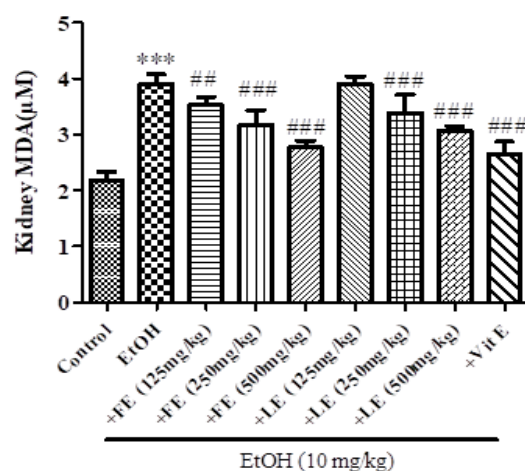
اثر عصاره های اتیل استاتی گل و برگ بنفشه معطر بر غلظت گلوکوتایون در کلیه موش صحرایی گلوکوتایون به عنوان مهم ترین سد دفاعی آنتی اکسیدانی بدن، نقش قابل ملاحظه ای در برابر آسیب های اکسیداتیو وارده به بافت ها دارد. نتایج نشان داد که اتانول سبب تخلیه سطوح گلوکوتایون در بافت کلیه موش های صحرایی شده است. از سویی دیگر تجویز عصاره های برگ و گل بنفشه معطر توانست به طور معنی داری از کاهش گلوکوتایون در این بافت ممانعت کند (نمودار شماره ۴).

اثر عصاره های اتیل استاتی گل و برگ بنفشه معطر بر ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در سرم موش صحرایی داده های نمودار شماره ۵ نشان داد که ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در سرم موش های دریافت کننده اتانول در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت. در حالی که هر دو عصاره بنفشه معطر به طور معنی داری سبب افزایش در ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرمی موش ها شد ($P < 0.05$).



نمودار شماره ۳: تاثیر عصاره های اتیل استاتی گل (FE) و برگ (LE) گیاه بنفشه معطر بر اکسیداسیون گلوکوتایون ناشی از اتانول (EtOH) در بافت کلیه. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شده است. ***: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل است ($P < 0.001$). ###: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه اتانول است ($P < 0.001$). ویتامین ای (Vit E): به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

فرایند اکسیداسیون لیپیدها محسوب می شود، صورت گرفت. همان طور که در نمودار شماره ۲ مشاهده می شود، میزان MDA در بافت کلیه موش های دریافت کننده اتانول به طور معنی داری افزایش یافت. نتایج نشان داد که در گروه های دریافت کننده عصاره های گل و برگ بنفشه معطر نسبت به گروه دریافت کننده اتانول، میزان تولید MDA به طور معنی داری ($P < 0.05$) کاهش یافت.



نمودار شماره ۲: تاثیر عصاره های اتیل استاتی گل (FE) و برگ (LE) گیاه بنفشه معطر بر میزان لیپید پراکسیداسیون القا شده توسط اتانول (EtOH) در بافت کلیه. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شده است. ***: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل است ($P < 0.001$). ###: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه اتانول است ($P < 0.001$). ###: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه اتانول است ($P < 0.001$). ویتامین ای (Vit E): به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

اثر عصاره های اتیل استاتی گل و برگ بنفشه معطر بر پروتئین کربونیل در کلیه موش صحرایی طبق نمودار شماره ۳ میزان پروتئین کربونیل عنوان مارکر مهم آسیب اکسیداتیو پروتئین ها به طور قابل توجهی ($P < 0.001$) پس از تجویز اتانول افزایش یافت. در حالی که تجویز همزمان عصاره های برگ و گل گیاه بنفشه معطر به همراه اتانول سبب کاهش معنی داری در تولید میزان پروتئین کربونیل در بافت کلیه موش های صحرایی شد ($P < 0.05$).

اثر عصاره های ایتیل استاتی گل و برگ بنفشه معطر بر میزان اوره و کراتینین در خون موش صحرایی افزایش میزان BUN و Cr در سرم به عنوان دو نشانه مهم آسیب کلیوی، پس از تزریق اتانول به طور قابل ملاحظه ای نسبت به گروه کنترل افزایش یافت (جدول شماره ۲). در مقابل، عصاره های گل و برگ بنفشه معطر سبب کاهش معنی داری در میزان BUN و Cr نسبت به گروه دریافت کننده اتانول شد ($P < 0.05$).

جدول شماره ۲: تاثیر عصاره های برگ و گل بنفشه معطر بر میزان BUN و Cr تولید شده توسط اتانول در سرم

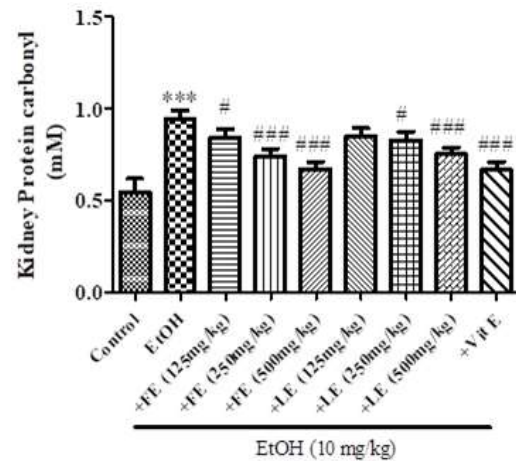
گروه ها	کراتینین (mg/dl)	نیروزن اوره خون (mg/dl)
انحراف معیار $\pm$ میانگین	انحراف معیار $\pm$ میانگین	
کنترل	0.7 ± 0.066	21 ± 2.7
اتانول	$1.47 \pm 0.3^{###}$	$60 \pm 2.5^{***}$
اتانول + عصاره گل (125mg/kg)	$1.28 \pm 0.076^{##}$	$45 \pm 2^{###}$
اتانول + عصاره گل (250mg/kg)	$1.126 \pm 0.03^{###}$	$41 \pm 2.1^{###}$
اتانول + عصاره گل (500mg/kg)	$1.03 \pm 0.04^{###}$	$35 \pm 2^{###}$
اتانول + عصاره برگ (125mg/kg)	1.36 ± 0.045	51 ± 1.9
اتانول + عصاره برگ (250mg/kg)	$1.17 \pm 0.03^{###}$	$45 \pm 2^{###}$
اتانول + عصاره برگ (500mg/kg)	$1.07 \pm 0.04^{###}$	$40 \pm 1.4^{###}$
ویتامین ای	$0.78 \pm 0.02^{###}$	$30 \pm 2.2^{###}$

***: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل است ($P < 0.001$).

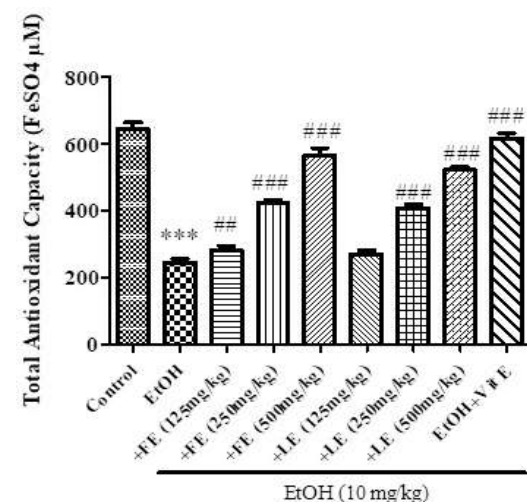
#: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه اتانول است ($P < 0.01$).

###: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه اتانول است ($P < 0.001$).

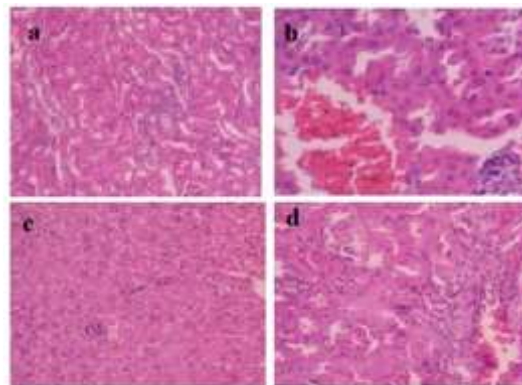
اثر عصاره های ایتیل استاتی گل و برگ بنفشه معطر بر شاخص های هیستوپاتولوژیک بافت کلیه موش صحرایی طبق مشاهدات تصویر شماره ۱، ارزیابی میکروسکوپی بافت کلیه بیانگر مورفولوژی طبیعی و آرایش منظم سلول های کلیوی در گروه کنترل بود. در گروه دریافت کننده اتانول، اتساع و دژنراسیون توبولی، آتروفی اپیتلیوم و نیز نکروز در سلول های کلیوی مشاهده شد. پس از تجویز عصاره های برگ و گل بنفشه معطر، آسیب های پاتولوژیک مذکور به طور قابل توجهی بهبود یافت و تنها دژنراسیون و ادم خفیفی در توبول ها مشاهده شد.



نمودار شماره ۴: تاثیر عصاره های ایتیل استاتی گل (FE) و برگ (LE) گیاه بنفشه معطر بر میزان پروتئین کربونیل تولید شده توسط اتانول (EtOH) در بافت کلیه. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شده است. ***: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل است ($P < 0.001$). #: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه اتانول است ($P < 0.05$). ###: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه اتانول است ($P < 0.001$). ویتامین ای (Vit E): به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.



نمودار شماره ۵: تاثیر عصاره های ایتیل استاتی گل (FE) و برگ (LE) گیاه بنفشه معطر بر میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در پلاسما. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شده است. ***: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل است ($P < 0.001$). #: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه اتانول است ($P < 0.01$). ###: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه اتانول است ($P < 0.001$). ویتامین ای (Vit E): به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.



تصویر شماره ۱: ارزیابی هیستوپاتولوژیک اثر عصاره های اتیل استاتی برگ و گل بنفشه معطر بر آسیب کلیوی القا شده توسط اتانول (a) گروه کنترل، (b) گروه دریافت کننده اتانول، (c) گروه دریافت کننده اتانول به همراه عصاره برگ بنفشه معطر (500mg/kg)، (d) گروه دریافت کننده اتانول به همراه عصاره گل بنفشه معطر (500mg/kg). رنگ آمیزی با رنگ همتاکسیلین-اوزین صورت گرفته است. تصاویر با بزرگنمایی ۴۰X تهیه شده است. فلش آبی رنگ نشان دهنده اتساع کپسول بومن است. فلش سیاه رنگ بیانگر آتروفی گلومرولار است

بحث

مصرف حاد و مزمن الکل می تواند استرس اکسیداتیو را در بافت های مختلف از جمله کبد، کلیه، پانکراس و سیستم عصبی القا کند (۲۰). اتانول در طی متابولیسم ابتدا توسط آنزیم الکل دهیدروژناز به استالدهید تبدیل شده و در مرحله بعد در اثر فعالیت آلدهید دهیدروژناز به استات تجزیه می شود. آنزیم گزانتین اکسیدورددوکتاز که مهم ترین منبع تولید رادیکال سوپراکسید در بدن است در طی این فرایند تولید می شود. علاوه بر این، اتانول می تواند توسط سیتوکروم P₄₅₀ به استالدهید تبدیل شده که در این بین، گونه های فعال اکسیژن زیادی تولید می شود (۲۱، ۲۲). اگرچه کبد به عنوان محل اصلی متابولیسم مواد مختلف شناخته می شود اما مطالعات نشان داده است که کلیه نیز به دلیل دارا بودن مقادیر قابل توجهی آنزیم های متابولیزان، نقش مهمی در متابولیسم زئوبیوتیک ها در بدن دارد (۷). طبق گزارشات، استرس اکسیداتیو و سمیت ناشی از رادیکال های آزاد اولین و مهم ترین مکانیسم

سمیت اتانول در بافت کلیه است (۲۳). در مطالعه ما اثر تجویز مزمن اتانول بر روی مارکرهای اصلی استرس اکسیداتیو از جمله ROS، لیپید پراکسیداسیون، پروتئین کربونیل و نیز سطح گلوکاتایون در بافت کلیه و همچنین ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در سرم بررسی شد. به طور کلی داده های مطالعه ما نشان داد که اتانول می تواند سبب القای استرس اکسیداتیو در بافت کلیه موش های صحرایی شود. همچنین آسیب پاتولوژی و افزایش سرمی BUN و Cr تأیید کننده ارتباط بین استرس اکسیداتیو و آسیب کلیوی می باشد. محققان قبلی نیز آسیب اکسیداتیو ناشی از اتانول را گزارش کرده بودند برای مثال Hebbani و همکارانش نشان دادند که تجویز خوراکی اتانول سبب سطوح MDA و کاهش دو آنزیم آنتی اکسیدانی مهم بدن (گلوکاتایون و سوپراکسید دیسموتاز) در کلیه موش های صحرایی شد. بنابراین می توان استنباط کرد که استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدان، می تواند در جلوگیری از آسیب های اکسیداتیو الکل موثر باشد (۲۴). امروزه استفاده از گیاهان دارویی در پیشگیری و درمان بیماری ها و اختلالات مختلف، از اهمیت بالایی برخوردار است. همان طور که در مطالعات قبلی نشان داده شده است، گیاهانی که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می باشند، می توانند سمیت ناشی از اتانول را کاهش دهند. برای مثال تجویز زنجبیل توانست ذخایر گلوکاتایون را در بافت کلیه موش های مواجه شده با اتانول احیا کرده و همچنین لیپید پراکسیداسیون را در این بافت کاهش دهد (۲۵).

بنفشه معطر (*Viola odorata. L*) گیاهی است که اخیراً به دلیل خواص آنتی اکسیدانی گزارش شده از آن، مورد توجه محققین قرار گرفته است. این گیاه دارای خواص درمانی متعددی از جمله خواص ضد تب، آنتی باکتریال، ضد دردی، ضد سرفه و برونشیت، ملین، آرام بخش می باشد (۸). اخیراً گزارشاتی مبنی بر اثرات ضد التهاب و ضد تومور نیز از این گیاه حاصل شده است (۲۶). آنالیزهای مختلف در باره اجزای موثره بنفشه

معطر نشان داد که عصاره گیاه بنفشه معطر حاوی درصد بالایی از ترکیبات فنولی و فلاونویدی است. اندام‌های هوایی این گیاه حاوی ترکیبات موثره مختلفی از جمله گلیکوزید، ساپونین، تانن، متیل سالیسیلات می‌باشد. همچنین گل و برگ و نیز ساقه و دانه‌های گیاه حاوی آلکالوئیدهای سیکلو تاید (از جمله ویولین) می‌باشد (۲۶۸). علاوه بر این، اثرات محافظتی آنتی‌اکسیدانی این گیاه در شرایط پاتولوژیکی که استرس اکسیداتیو در آن نقش دارد نیز مشاهده شده است (۲۷، ۱۹). برای مثال گزارش شده است که بنفشه معطر می‌تواند استرس اکسیداتیو ناشی از تتراکلرید کربن را در بافت‌های کلیه و کبد موش‌های صحرایی مهار کند که این اثرات به حضور ترکیبات فنولی و فلاونویدی این گیاه نسبت داده شده است (۲۷). مطالعات فراوانی اثرات محافظتی و آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلیک و فلاونویدی را در مقابل آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد بیان کرده‌اند (۲۹، ۲۸). لذا گیاهانی که دارای این ترکیبات موثره در ساختار خود هستند دارای پتانسیل بالقوه مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌باشند.

پراکسیداسیون لیپیدی به عنوان یکی از مارکرهای برجسته استرس اکسیداتیو محسوب می‌شود. یکی از محصولات قابل شناسایی فرایند اکسیداسیون اسیدهای چرب، مالون دی آلدئید (MDA) است. از سویی دیگر، بافت کلیه به دلیل دارا بودن مقادیر زیادی اسید چرب غیر اشباع در ساختار غشای خود، بسیار مستعد به اکسیداسیون توسط رادیکال‌های آزاد است (۳۰). مطالعه ما نشان داد که تجویز عصاره‌های برگ و گل بنفشه معطر توانست پراکسیداسیون لیپیدی ایجاد شده توسط اتانول در بافت کلیه را مهار کند. علاوه بر این، رادیکال‌های آزاد می‌توانند با واکنش مستقیم با آنتی اکسیدان‌های اندوژن، سبب تسریع در فرایندهای اکسیداتیو شوند. یکی از آنتی اکسیدان‌هایی که نقش مهمی در فرایندهای سم زدایی رادیکال‌های آزاد در

بدن دارد، گلو تاتیون است (۵). در مطالعه ما استفاده از عصاره‌های برگ و گل بنفشه معطر توانست از تخلیه ذخایر گلو تاتیون توسط اتانول در بافت کلیه ممانعت کند.

یکی دیگر از اجزای سلولی که تحت تاثیر آسیب‌های اکسیداتیو قرار می‌گیرند، پروتئین‌ها هستند. رادیکال‌های آزاد قادرند با حمله به پروتئین‌ها آن‌ها را اکسید نموده و ساختار طبیعی آن‌ها را تخریب نمایند. این فرایند منجر به تولید ترکیباتی به نام پروتئین کربونیل می‌شود که به طور متداول به عنوان یکی از مارکرهای مهم ارزیابی آسیب‌های اکسیداتیو وارده به پروتئین‌ها مورد مطالعه قرار می‌گیرد (۳۱). در مطالعه ما، میزان تولید پروتئین کربونیل به دنبال تزریق اتانول افزایش یافت که البته عصاره‌های برگ و گل بنفشه معطر سبب کاهش چشمگیری در این مارکر شد و توانست اکسیداسیون پروتئین‌ها توسط اتانول را مهار کند.

ارزیابی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی یک روش مناسب جهت بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات مختلف در سرم است (۳۲). اساس این روش، بر پایه توانایی یک ترکیب آنتی‌اکسیدان در احیای کمپلکس $TPTZ-Fe^{3+}$ به کمپلکس آبی رنگ $TPTZ-Fe^{2+}$ بنا نهاده شده است (۳۳). در واقع ترکیبات آنتی اکسیدان سبب افزایش ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در سرم می‌شوند. در این مطالعه به کارگیری هر دو عصاره منجر به افزایش این فاکتور در نمونه‌های سرم شد.

افزایش در سطوح پلاسمایی BUN و Cr یکی دیگر از نشانه‌های اختلال عملکرد کلیه در مواجهه با ترکیبات و مواد شیمیایی مختلف محسوب می‌شود (۳۴). محققان قبلی نشان دادند که مواجهه با اتانول می‌تواند سبب افزایش سرمی این دو مارکر و القای سمیت کلیوی شود (۵). تجویز عصاره‌های برگ و گل بنفشه معطر توانست سبب کاهش BUN و Cr در سرم و آسیب کلیوی ناشی از اتانول شود. به منظور بررسی بیش‌تر آسیب بافتی ناشی از اتانول، ارزیابی پاتولوژیک نیز در بافت کلیه صورت گرفت. سمیت هیستوپاتولوژیک

ایجاد شده توسط اتانول در بافت کلیه در مطالعات گذشته به خوبی نشان داده شده است (۷). در مطالعه ما تجویز عصاره برگ و گل بنفشه معطر منجر به بهبود ضایعات پاتولوژیک ایجاد شده توسط اتانول شامل اتساع و دژنراسیون توبولی، آتروفی اپی تلیوم، نکروز سلول‌های کلیوی در بافت کلیه شد. این مشاهدات نیز می‌تواند گواه اثرات مفید این گیاه در تخفیف سمیت کلیوی ناشی از اتانول محسوب شود.

عصاره گل گیاه بنفشه معطر در مقایسه با عصاره برگ این گیاه اثرات آنتی‌اکسیدانی بیش تری از خود نشان داده است. همان‌طور که در بخش نتایج ذکر شد، محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی در قسمت گل گیاه بیش تر از برگ آن است. لذا اثرات بارزتر مشاهده شده از گل بنفشه معطر را می‌توان به محتوای بالاتر این ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی نسبت داد. در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تولید بیش

از حد رادیکال‌های آزاد را می‌توان مهم‌ترین مکانیسم سمیت کلیوی ناشی از مصرف مزمن اتانول دانست. طبق نتایج مطالعه ما تجویز صاره‌های اتیل استاتی برگ و گل بنفشه معطر توانست به طور معنی‌داری استرس اکسیداتیو را در بافت کلیه موش‌های صحرایی مهار نماید. با توجه به نتایج به دست آمده، اثرات محافظتی مشاهده شده را می‌توان به خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه مرتبط دانست. لذا می‌توان از این گیاه پس از بهره‌برداری و طی کردن مراحل آزمایشات بالینی به عنوان یک درمان مکمل در مواجهه با آسیب‌های بافتی ناشی از مواجهه مزمن با اتانول استفاده نمود.

سیاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دکترای عمومی داروسازی مربوط به آقای پدرام الهی بوده و منابع مالی آن توسط دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

References

1. Varga ZV, Matyas C, Paloczi J, Pacher P. Alcohol misuse and kidney injury: epidemiological evidence and potential mechanisms. *Alcohol Res* 2017; 38(2): 283-288.
2. BASU S, DAS M, SEN A, DATTA G. Protective role of crude extract of *amorphophallus campanulatus* against ethanol-induced oxidative renal damage. *Asian J Pharm Clin Res* 2018; 11(1): 240-250.
3. Uchio R, Higashi Y, Kohama Y, Kawasaki K, Hirao T, Muroyama K, et al. A hot water extract of turmeric (*Curcuma longa*) suppresses acute ethanol-induced liver injury in mice by inhibiting hepatic oxidative stress and inflammatory cytokine production. *J Nutr Sci* 2017; 12(6): e3.
4. Vahidirad M, Arab-Nozari M, Mohammadi H, Shaki F. Protective Effect of Edaravone against Nephrotoxicity and Neurotoxicity of Acute Exposure to Diazinon. *Drug Chem Toxicol. J Mazandaran Univ Med Sci* 2018; 28(165): 175-182 (Persian).
5. Bulle S, Reddy VD, Hebbani AV, Padmavathi P, Challa C, Puvvada PK, et al. Nephro-protective action of *P. santalinus* against alcohol-induced biochemical alterations and oxidative damage in rats. *Biomed Pharmacother* 2016; 84: 740-746.
6. Adaramoye OA, Aluko A. Methanolic extract of *Cnidioscolus aconitifolius* attenuates renal dysfunction induced by chronic ethanol administration in Wistar rats. *Alcohol* 2010; 46(1): 4-9.
7. Sönmez MF, Narin F, Akkuş D, Türkmen AB. Melatonin and vitamin C ameliorate alcohol-induced oxidative stress and eNOS expression in rat kidney. *Ren Fail* 2012; 34(4): 480-486.

8. Mittal P, Gupta V, Goswami M, Thakur N, Bansal P. Phytochemical and pharmacological potential of *viola odorata*. *Int J Pharmacog (IJP)* 2015; 2(5): 215-220.
9. Qadir MI, Ali M, Saleem M, Hanif M. Hepatoprotective activity of aqueous methanolic extract of *Viola odorata* against paracetamol-induced liver injury in mice. *Bangladesh J Pharm* 2014; 9(2): 198-202.
10. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Bahramian F, Bekhradnia AR. Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. var. *angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C. speciosum*. *Pak J Pharm Sci* 2010; 23(1): 29-34.
11. Stojković D, Glamočlija J, Ćirić A, Šiljegović J, Nikolić M, Soković M. Free radical scavenging activity of *Viola odorata* water extracts. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 2011; 17(3): 285-290.
12. Tofighi Z, Mohamadi H, Shokrzadeh M, Ghahremani MH, Noori S, Habibi E. Cytotoxic Effect of Hydro-Alcoholic Extract of *Crocus caspius* on Breast Cancer Cell Lines. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2017; 27(151): 32-40 (Persian).
13. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22(3): 277-281.
14. Vahidirad M, Arab-Nozari M, Mohammadi H, Zamani E, Shaki F. Protective effect of captopril against diazinon induced nephrotoxicity and neurotoxicity via inhibition of ROS-NO pathway. *Drug Chem Toxicol* 2018; 41(3): 287-293.
15. Gao X, Zheng CY, Yang L, Tang XC, Zhang HY. Huperzine A protects isolated rat brain mitochondria against β -amyloid peptide. *Free Radic Biol Med* 2009; 46(11): 1454-1462.
16. Zhang F, Xu Z, Gao J, Xu B, Deng Y. In vitro effect of manganese chloride exposure on energy metabolism and oxidative damage of mitochondria isolated from rat brain. *Environ Toxicol Pharmacol* 2008; 26(2): 232-236.
17. Aebi H. [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 105: Elsevier; 1984. p. 121-126.
18. Pourahmad J, Eskandari MR, Alavian G, Shaki F. Lysosomal membrane leakiness and metabolic biomethylation play key roles in methyl tertiary butyl ether-induced toxicity and detoxification. *Toxicol Environ Chem* 2012; 94(2): 281-293.
19. Habibi E, Arab-Nozari M, Elahi P, Ghasemi M, Shaki F. Modulatory effects of *Viola odorata* flower and leaf extracts upon oxidative stress related damage in an experimental model of ethanol-induced hepatotoxicity. *Appl Physiol Nutr Metab* 2019; 44(5): 521-527.
20. Zhou T, Zhang YJ, Xu DP, Wang F, Zhou Y, Zheng J, et al. Protective effects of lemon juice on alcohol-induced liver injury in mice. *BioMed Res Int* 2017; 2017.
21. Wang JH, Batey RG, George J. Role of ethanol in the regulation of hepatic stellate cell function. *World J Gastroenterol* 2006; 12(43): 6926-6932.
22. Cohen JI, Nagy LE. Pathogenesis of alcoholic liver disease: interactions between parenchymal and non-parenchymal cells. *J Dig Dis* 2011; 12(1): 3-9.
23. Ojeda ML, Barrero MJ, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Oxidative effects of chronic ethanol consumption on the functions of heart and kidney: folic acid supplementation. *Alcohol Alcohol* 2012; 47(4): 404-412.
24. Hebbani AV, Reddy VD, Varadacharyulu NC. Protective Effect of aqueous bark extract

- of Terminalia Arjuna against Alcohol-Induced Hepato and Nephrotoxicity in Rats. *Inter J Phytomed* 2015; 7(2): 142-153.
25. Ramudu SK, Korivi M, Kesireddy N, Chen CY, Kuo CH, Kesireddy SR. Ginger feeding protects against renal oxidative damage caused by alcohol consumption in rats. *J Ren Nutr* 2011; 21(3): 263-270.
 26. Feyzabadi Z, Ghorbani F, Vazani Y, Zarshenas MM. A critical review on phytochemistry, pharmacology of *Viola odorata* L. and related multipotential products in traditional Persian medicine. *Phytother Res* 2017; 31(11): 1669-1675.
 27. Elhassaneen Y, Sabry S, Musalum T, El-Eskafy A, El-Fatah AA. Effect of sweet violet (*Viola odorata* L.) blossoms powder on liver and kidney functions as well as serum lipid peroxidation of rats treated with carbon tetrachloride. *J Am Sci* 2013; 9(5): 88-95.
 28. Agrawal AD. Pharmacological activities of flavonoids: a review. *Int J Pharmaceut Sci Nanotech* 2011; 4(2): 1394-1398.
 29. Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *J Functional Foods* 2015; 18: 820-897.
 30. Rodrigo R, Rivera G. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(3): 409-422.
 31. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Botany* 2012; 2012.
 32. Sagiroglu T, Kanter M, Yagci MA, Sezer A, Erboga M. Protective effect of curcumin on cyclosporin A-induced endothelial dysfunction, antioxidant capacity, and oxidative damage. *Toxicol Ind Health* 2014; 30(4): 316-327.
 33. Sowndhararajan K, Kang SC. Protective effect of ethyl acetate fraction of *Acacia ferruginea* DC. against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 2013; 148(1): 175-181.
 34. Abdelrahman RS. Protective effect of apocynin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2018; 37(1): 27-37.