مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۱۰، دی ۱۳۹۶
صفحه: ۷۶۹-۷۵۹

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No. 10, Jan 2018
Pages: 759-769

بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی یونجه (*Medicago sativa*) بر آسیب کبدی ناشی از نیکوتین در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار

جواد بهشتی پور[۱]، مهدیه رئیس‌زاده*[۲]، رژین جمالی[۳]، سجاد سیستانی[۴]

چکیده

مقدمه: نیکوتین به عنوان مهم‌ترین جزء سیگار می‌تواند سبب آسیب کبدی شود. این مطالعه با هدف بررسی اثربخشی عصاره هیدروالکلی یونجه جهت کنترل آسیب کبدی ناشی از نیکوتین در موش‌های صحرایی نر انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۲۴سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به ۴ گروه مساوی تقسیم شدند: گروه کنترل (بدون تیمار)، گروه آزمایشT1 (نیکوتین)، گروه آزمایش T2 (نیکوتین + عصاره هیدروالکلی یونجه با دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه آزمایش T3 (نیکوتین + عصاره هیدروالکلی یونجه با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم). عصاره هیدروالکلی یونجه به شکل خوراکی و نیکوتین به صورت تزریق زیرپوستی با دوز ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۵ روز تجویز شد. در پایان دوره مقدار مصرف غذا، وزن بدن و کبد حیوانات اندازه‌گیری شد. نمونه خون از هر موش برای ارزیابی آلانین‌آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) اخذ گردید. . نتایج به دست آمده به با نرم افزار SPSS ورژن ۲۴ به صورت میانگین و انحراف استاندارد در آمده و با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج: وزن بدن حیوانات در گروه T1 در مقایسه با گروه کنترل دچار کاهش معنی‌داری شد(P=۰/۰۴۶). بین گروه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری در میزان مصرف غذا مشاهده نگردید(P=۰/۰۵۴). وزن کبد در گروه‌های آزمایش T1 و T2 کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشت(P=۰/۰۴۴). به طور معنی‌داری سطح سرمی آنزیم‌های ALT و AST در گروه آزمایش T1 در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت(P<۰/۰۵). همچنین در گروه‌های تیمار با عصاره هیدروالکلی یونجه (T2 و T3) غلظت سرمی بیومارکرهای ALT و AST در مقایسه با گروه T1 کاهش معنی‌داری داشت(P< ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های این تحقیق، عصاره هیدروالکلی یونجه با اثرات آنتی‌اکسیدانی خود می‌تواند سبب حفاظت کبد در برابر نیکوتین شود.

واژه‌های کلیدی: عصاره هیدروالکلی یونجه، نیکوتین، کبد، استرس اکسیداتیو

۱،۳- دانشجوی دکتری حرفه ای دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
۲- استادیار فارماکولوژی، گروه علوم پایه، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
۴- دکتری عمومی دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۳۴۷۴۴۵۷، پست الکترونیکی: vet_mr@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۲۰

مقدمه

امروزه سیگارکشیدن یکی از علت‌های اصلی مرگ و میر در سراسر جهان محسوب می‌شود، به طوری که سازمان بهداشت جهانی (WHO) تخمین‌زده است میزان مرگ و میر سالیانه آن از ۵/۴ میلیون نفر در سال ۲۰۰۵ به ۸/۳ میلیون نفر در سال ۲۰۳۰ میلادی خواهد رسید که این رقم در طی قرن ۲۱ بیش از یک میلیارد نفر برآورد می‌شود (۲،۱).

نیکوتین با فرمول شیمیایی $C_{10}H_{14}N_2$ به عنوان مهم‌ترین جز سیگار مطرح است که خطر ابتلا به بیماری‌های کبدی، قلبی-عروقی، اختلالات ریوی، سرطان، ناباروری و سایر بیماری‌ها را افزایش می‌دهد (۴،۳). این ماده به راحتی از طریق پوست و ریه جذب و سپس توسط کبد، ریه‌ها و کلیه متابولیزه می‌شود (۵). بیش از ۸۰ درصد از نیکوتین جذب‌شده، در کبد متابولیسم و به ۶ متابولیت اصلی تبدیل می‌گردد که از این بین، کوتینین مهم-ترین متابولیت حاصل است (۷،۶). نیکوتین از سه طریق باعث آسیب کبدی می‌گردد: اثرات مستقیم یا غیرمستقیم سمی، ایمونولوژیکی و انکوژنیکی (۸).

از طرف دیگر Helen و همکاران در سال ۲۰۰۰ به اثرات ایجاد رادیکال‌های آزاد ایجاد شده طی متابولیسم نیکوتین اشاره کردند. آنان این مسئله را سبب افزایش القای استرس اکسیداتیو و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدها دانستند (۹).

یکی از بافت‌های تحت آسیب فرایندهای استرس اکسیداتیو کبد است و از معمول‌ترین راه‌های غربالگری کبد و بررسی آسیب وارده به آن، سنجش بیومارکرهای کبدی به خصوص دو آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) می‌باشد (۱۰). غلظت هر دو آنزیم در کبد زیاد بوده و در اثر آسیب کبدی وارد خون می‌شوند. اما نکته حائز اهمیت این است که AST بیشتر در قلب و عضلات اسکلتی واقع گردیده که همین مسئله موجب شده است که جهت ارزیابی آسیب کبدی، ALT در مقایسه با AST اختصاصی‌تر باشد (۱۱،۱۰). ALT منحصراً در سیتوپلاسم سلولی است در حالی که AST هم در سیتوپلاسم (۲۰٪ از فعالیت) و هم در میتوکندری (۸۰٪ از فعالیت) قرار گرفته است. از آنجا که متابولیسم نیکوتین در کبد سبب ایجاد رادیکال‌های آزاد و آسیب کبدی خواهد شد، اندازه‌گیری غلظت این دو آنزیم می‌تواند درک درستی از پاسخ کبدی نسبت به آسیب نیکوتین را درپی داشته باشد (۱۲).

گیاه یونجه (*Medicago sativa*) دارای ترکیبات نظیر فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، فیتواستروژن‌ها، کومارین‌ها، آنزیم‌های گوارشی، تری‌ترپن‌ها، ساپونین‌ها و فیتواسترول‌هاست (۱۳). به نحوی که این گیاه با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی مانند فیتواستروژن‌ها، فلاوونوئیدها و ویتامین‌های E و C احتمالا می‌تواند سبب کنترل اثرات عوامل اکسیدان شود (۱۴).

با در نظرگرفتن آمارهای نگران‌کننده سازمان بهداشت جهانی در خصوص گسترش استفاده از سیگار به عنوان یک معضل جهانی از یک سو و از سوی دیگر اصلاح تغذیه و استفاده از ترکیبات طبیعی آنتی‌اکسیدان، هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی یونجه در آسیب کبدی ناشی از نیکوتین در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار بود.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع تجربی- مداخله‌ای بود که در بهار سال ۱۳۹۶ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج انجام پذیرفت. این تحقیق منطبق با ضوابط بین‌المللی تحقیقات پزشکی در ارتباط با حیوانات که توسط شورای سازمان‌های بین‌المللی علوم پزشکی (CIOMS) صادرشده بود، طراحی گردید (۱۵).

برای تهیه عصاره هیدروالکلی یونجه، ابتدا گیاه تازه یونجه از مرکز تحقیقات کشاورزی سنندج تهیه شد، سپس این گیاه به مدت ۷۲ ساعت درجای خنک و به دور از نور قرار گرفته و خشک گردید، در ادامه یونجه خشک‌شده آسیاب و به صورت پودر درآمد. ۱۵۰ گرم از پودر یونجه را با اتانول ۷۵ درصد به حجم یک لیتر رسانده و پس از ۴۸ ساعت غوطه‌ورسازی، با کاغذ صافی واتمن صاف نمودیم. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در rpm ۲۵۰۰ سانتریفیوژ و کاملاً جرم‌گیری شد. عصاره به دست آمده، بوسیله روتاری متصل به پمپ خلا (RV8V-C ساخت شرکت IKA آلمان) تغلیظ و خشک گردید. در نهایت با استفاده از آب

مقطر استریل غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره هیدروالکلی یونجه تهیه شد (۱۶، ۱۷).

در این مطالعه از نمک نیکوتین هیدروژن تارتارات، با وزن مولکولی ۴۶۲/۴۱ گرم بر مول و خلوص بیش از ۹۸ درصد، تهیه شده از شرکت سیگما- آلدریچ (Lot No=029H046) استفاده گردید. محلول ۰/۱ درصد از این ماده توسط آب مقطر استریل تهیه و جهت تزریق زیرپوستی مورد استفاده قرار گرفت (۹).

به منظور انجام این پژوهش از ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (محدوده وزنی ۲۶۰-۲۱۰ گرم و دامنه سنی ۸-۶ هفته) خریداری‌شده از انستیتو پاستور ایران استفاده شد. حیوانات در تمام طول مطالعه در قفس‌های استاندارد و تحت شرایط محیطی کنترل‌شده (دمای ۲ ± ۲۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) در حیوان‌خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد واحد سنندج نگهداری شدند. تمام موش‌ها در طی آزمایش به آب سالم و غذای مخصوص جوندگان (ساخت شرکت دام پارس تهران) به صورت آزادانه دسترسی داشتند. ۱۰ روز بعد از سازگاری حیوانات با شرایط محیطی مطالعه آغاز گردید.

در این آزمایش نگهداری، مراقبت و استفاده از حیوانات براساس دستورالعمل‌های بین‌المللی بود (۱۸) و مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کردستان با کد ۲۰۲۷ قرار گرفت.

موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار به صورت تصادفی به ۴ گروه جداگانه ۶ تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

گروه کنترل (C): ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر را به شکل خوراکی به مدت ۲۵ روز دریافت کردند، گروه آزمایش T1: نیکوتین ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به صورت تزریق زیرپوستی و آب مقطر را خوراکی در طی ۲۵ روز دریافت کردند، گروه آزمایشT2: نیکوتین ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم توسط تزریق زیرپوستی + عصاره هیدروالکلی یونجه به صورت خوراکی با دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۵ روز داده شد،گروه آزمایش T3: نیکوتین ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تزریق زیرپوستی به علاوه عصاره هیدروالکلی یونجه با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم به شکل خوراکی به موش‌ها در طی ۲۵ روز تجویز شد. طول دوره آزمایش برای تمامی موش‌ها ۲۵ روز بود (۱۶).

در ابتدا و انتهای دوره آزمایش، وزن بدن حیوانات توسط ترازوی دیجیتال (Precisa xb620C) اندازه‌گیری شد. یک روز قبل از اتمام آزمایش (در روز بیست و پنجم)، جهت اندازه‌گیری میزان غذای مصرفی، کلیه حیوانات به مدت ۲۴ ساعت در شرایطی که به غذای پودری دسترسی آزادانه داشتند، داخل قفس‌های متابولیک قرارگرفتند و به این ترتیب مقدار غذای مصرفی آن‌ها با دقت اندازه‌گیری گردید.

ارزیابی‌های بیوشیمیایی و توزین کبد

پس از گذشت ۲۵ روز از شروع آزمایش (در روز بیست و ششم)، موش‌های صحرایی به مدت ۱۲ ساعت ناشتا نگه‌داشته شدند و سپس توسط اتر بیهوش شده و از قلب آن‌ها خونگیری صورت گرفت. نمونه‌های خون اخذشده پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری در دمای آزمایشگاه در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و به این طریق سرم آن‌ها تفکیک گردید. در نهایت غلظت سرمی دو آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) توسط دستگاه اتوآنالایزر مدل Hitachi 911 ساخت ژاپن و کیت‌های شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری شد.

پس از اخذ نمونه خون و مرگ موش‌ها، حفره شکم باز و کبد از سایر ارگان‌ها جدا گردید و در نهایت هم پس از جداسازی چربی و سایر قسمت‌های اضافی، کبد هر موش به وسیله ترازوی دیجیتال (Precisa xb620C) و با دقت ۰/۱ گرم توزین شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از مطالعه با نرم افزار SPSS ورژن ۲۴ به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شدند. به منظور مقایسه میانگین‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست تعقیبی توکی (Tukey's test) استفاده شد. تمام بررسی‌های آماری داده‌ها به وسیله نرم‌افزار SPSS 21 انجام و $P<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. با توجه به تقسیم‌بندی تصادفی موش‌ها در گروههای مختلف، ابتدا با استفاده از آزمون Kolmogrov-Smirnov توزیع نرمال داده‌ها و

آماره آزمون Leven (P>۰/۰۵) پیش فرض برابری واریانس قبل از انجام آنالیز واریانس یک طرفه تایید شد.

نتایج

تغییرات وزن بدن حیوانات

اندازه‌گیری وزن بدن تمامی حیوانات در پایان دوره آزمایش نشان داد که بیشترین وزن بدن به گروه کنترل و کمترین آن به گروه T1 مربوط بود. وزن بدن موش‌ها در گروه T1 نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری را نشان داد (P=۰/۰۴۶). وزن بدن موش‌های گروه کنترل نسبت به روز اول مطالعه افزایش، در حالی که وزن بدن سایر گروه‌ها کاهش یافته بود.(P=۰/۰۴۱) این کاهش وزن در گروه T1 تقریباً ۹/۳ درصد از میانگین وزن اولیه موش‌ها بود (جدول ۱).

جدول ۱: وزن بدن حیوانات در گروه‌های مورد مطالعه

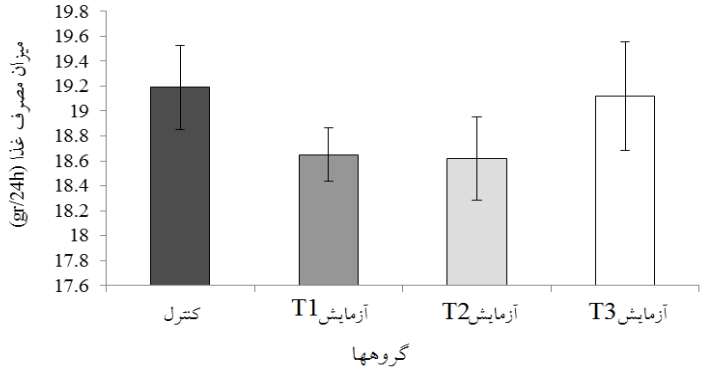
گروه‌ها	وزن موش‌ها (برحسب گرم)	
	روز اول	روز آخر
کنترل	۲۳۸/۳۳±۲/۶۹[a]	۲۵۵/۵±۸/۳۸[a]
آزمایش T1	۲۴۲±۶/۱۱[a]	۲۱۹/۵±۵/۴۲[b]
آزمایش T2	۲۳۸/۳۳±۷/۳۷[a]	۲۲۶/۶۶±۷/۲۳[a]
آزمایشT3	۲۳۴±۴/۷۵[a]	۲۳۳/۵±۵/۱۵[a]

داده‌ها به صورت میانگین±خطای استاندارد (Mean±SEM) ارائه شده‌اند.

حروف نامتشابه به صورت ستونی نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار (P<0.05) است.

بررسی میزان مصرف غذا

بین گروه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری در میزان مصرف غذا مشاهده نگردید (P=۰/۰۵۴). مقدار مصرف غذا در گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی یونجه با دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (گروه T2) با متوسط ۱۸/۵۸ گرم از سایر گروه‌ها کمتر بود، در حالی که موش‌های گروه کنترل با متوسط ۱۹/۱۹ گرم در طول شبانه روز بیشترین میزان مصرف غذا را داشتند. موش-های گروه آزمایش T3 با متوسط ۱۹/۱۴ گرم نسبت به گروه‌های T1 و T2 غذای بیشتری را مصرف کردند اگر چه این میزان نسبت به گروه کنترل کمتر بود (نمودار ۱).

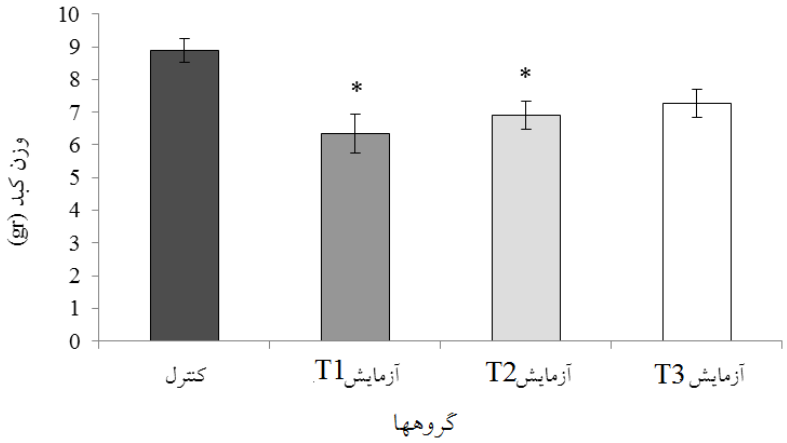


نمودار ۱: میزان مصرف غذای موش‌های صحرایی در گروه‌های مورد مطالعه.

هر ستون نشان‌دهنده میانگین±خطای استاندارد (Mean±SEM) است.

ارزیابی وزن کبد

بررسی وزن کبد موش‌ها نشان داد که گروه کنترل با متوسط ۸/۹۱ گرم بیشترین و گروه T1 با متوسط وزن ۶/۴۲ گرم کمترین میزان وزن کبد را به خود اختصاص داده‌اند. گروه‌های T1 و T2 در وزن کبد کاهش معنی‌داری (P=۰/۰۴۴) را در مقایسه با گروه کنترل داشتند. در گروهی که عصاره هیدروالکلی یونجه را با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم دریافت کرده بودند، وزن کبد آن‌ها با متوسط ۷/۱۱ گرم نسبت به گروه‌های T1 و T2 بیشتر، ولی نسبت به گروه کنترل کمتر بود. اما این اختلاف‌ها در سطح ۰/۰۵معنی‌دار نبود(P=۰/۰۵۸) (نمودار ۲).

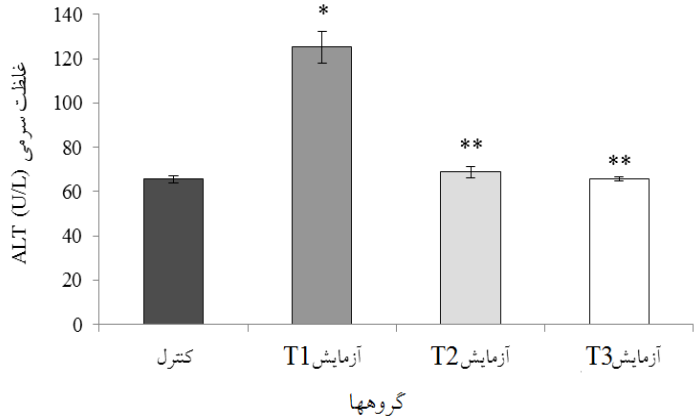


نمودار ۲: وزن کبد موش‌های صحرایی در گروه‌های مورد مطالعه.

هر ستون نشان‌دهنده میانگین±خطای استاندارد (Mean±SEM) است. * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) گروه‌های T1 و T2 با گروه کنترل است.

سطوح سرمی ALT و AST

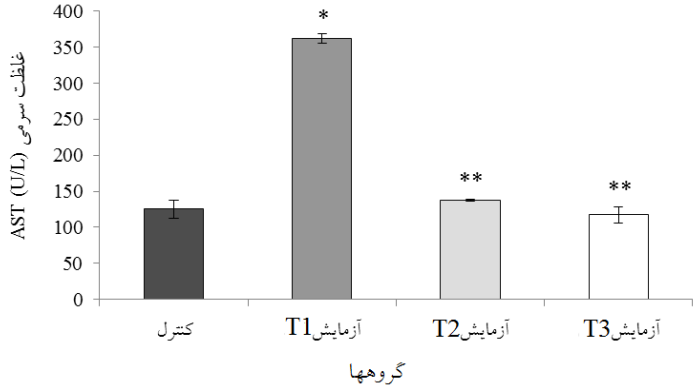
آنالیز بیوشیمیایی سرم موش‌های صحرایی نشان داد که غلظت سرمی آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در گروه T1 با متوسط ۱۲۷/۲۳ U/L نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت (P=۰/۰۳۷). غلظت متوسط سرمی آنزیم ALT در موش‌های صحرایی گروه‌های T2 و T3 که عصاره هیدروالکلی یونجه را دریافت کرده بودند به ترتیب ۶۲/۱۲ و ۶۰/۰۱، نسبت به موش‌های گروه T1 که عصاره را دریافت نکرده بودند، کاهش معنی‌داری را نشان داد (P=۰/۰۳۸). سطح سرمی ALT در گروه‌های T2 و T3 نزدیک به میانگین گروه کنترل با متوسط ۶۲/۷۵ U/L بود (نمودار ۳).



نمودار ۳: میزان غلظت سرمی آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (**ALT**) در گروه‌های مورد مطالعه.

هر ستون نشان‌دهنده میانگین±خطای استاندارد (Mean±SEM) است. * نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) غلظت سرمی ALT گروه T1 درمقایسه با گروه کنترل است.
** نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) غلظت سرمی ALT گروه‌های T2 و T3 درمقایسه با گروه T1 است.

بررسی غلظت سرمی آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) نشان داد که سطح سرمی این آنزیم در گروه دریافت‌کننده نیکوتین صرف (T1) نسبت به گروه کنترل افزایش تقریباً ۲ برابری و معنی‌داری (P<۰/۰۵) پیدا کرده است. غلظت سرمی AST در گروه‌های T2 و T3 دچار کاهش معنی‌داری (P=۰/۳۹) در مقایسه با گروه T1 شده بود. سطح سرمی آنزیم AST در گروه T3 با متوسط ۱۰/۰۳ U/L که عصاره هیدروالکلی یونجه را با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم دریافت کرده بود از گروه کنترل با متوسط ۱۲۵/۳۴ U/L نیز کمتر بود (نمودار ۴).



نمودار ۴: میزان غلظت سرمی آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (**AST**) در گروه‌های مورد مطالعه.

هر ستون نشان‌دهنده میانگین±خطای استاندارد (Mean±SEM) است. * نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار ($P<0.05$) غلظت سرمی AST گروه T1 در مقایسه با گروه کنترل است. ** نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار ($P<0.05$) غلظت سرمی AST گروه‌های T2 و T3 درمقایسه با گروه T1 است.

بحث

در این پژوهش، تجویز نیکوتین به موش‌های صحرایی گروه T1 باعث افزایش قابل ملاحظه و معنی‌داری در غلظت سرمی آنزیم‌های ALT و AST در مقایسه با گروه کنترل گردید. این مسئله در ارتباط با وزن بدن و وزن کبد سبب کاهش معنی‌دار در گروه T1 نسبت به کنترل شد که این مسئله با توجه به کاهش مصرف و دریافت غذا در گروه T1 قابل توجیه بود. آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد سبب تخریب ماکرومولکول‌ها مانند چربی‌ها، پروتئین‌ها، نوکلئیک اسید و کربوهیدرات‌ها و در نتیجه اثرات سایتوتوکسیک می‌شود (۱۹). از آنجایی که کبد به عنوان یکی از مهم‌ترین ارگان‌های بدن در متابولیسم داروها و سم زدایی بوده می‌تواند اثرات رادیکال‌های آزاد را به صورت پراکسیداسیون لیپیدها در هپاتوسیت‌ها و در نتیجه افزایش غلظت آنزیم‌های کبدی در خون نشان دهد (۲۰،۲۱).

نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های سایر پژوهشگران مطابقت داشت (۲۲،۲۳). به نظر می‌رسد که این افزایش سطوح سرمی به این علت باشد که نیکوتین با تخریب غشای سلول‌های کبدی باعث آزادسازی آنزیم‌های سیتوپلاسمیک و میتوکندریایی شده که در نهایت افزایش غلظت سرمی این آنزیم‌ها را سبب می‌شود (۲۴).

مکانیسم مسمومیت نیکوتین به طور دقیق شناخته شده نیست. در مطالعات گذشته سبب کاهش گلوتاتیون و سوپراکسید دیسموتاز دانسته اند. به نحوی که سبب پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب به DNA سلول می‌شود. این عمل با توجه به رادیکال‌های آزاد و گونه‌های ROS اتفاق می‌افتد (۲۵). Neogy و همکاران اعلام کردند، نیکوتین با افزایش رادیکال‌های آزاد کاهش سطح آنتی‌اکسیدان بدن می‌تواند سبب القای استرس اکسیداتیو شود. این مسئله با توجه به پتانسیل‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره یونجه در دوز ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به میزان ارزشمندی قابل کنترل شد (۲۶).

یونجه (*Medicago sativa*) یکی از گیاهانی است که به علت داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی، جهت ساخت داروهای جدید کاربرد پیدا کرده است (۱۳). بیش از ۲۰ درصد وزن یونجه پروتئین می‌باشد. همچنین منبع خوبی برای اسیدآمینه آرژنین، آسپارتیک اسید، فنیل آلانین، سیستئین است ویتامین‌های A، B1، B3، B6، B12، C، D، E ، K، بیوتین، فولیک اسید و پانتوتنیک می‌باشد (۲۷،۲۸). در مطالعه حاضر، تجویز عصاره هیدروالکلی یونجه با دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب گردید، سطوح سرمی آنزیم‌های ALT و AST که در اثر تجویز نیکوتین و القای آسیب کبدی افزایش یافته بودند، کاهش یافته و به سطحی مشابه با سطح گروه کنترل برسند. احتمالاً این کنترل آسیب کبدی به آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی موجود در یونجه نظیر ویتامین C، ویتامین E و

فلاوونوئیدها و ترکیبات فنلی نسبت داده می‌شود (۱۳). در بررسی که Amraie و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی موش‌های دیابتی انجام دادند، مشاهده کردند که عصاره آبی یونجه سبب کنترل آسیب کبدی ناشی از دیابت و سطح آنزیم‌های ALT و AST می‌شود (۲۹). در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۱۲ توسط Al-Dosari انجام شد، گیاه یونجه سبب کنترل پارامترهای بیوشیمیایی کبدی به‌خصوص آنزیم‌های ALT و AST در مسمومیت تجربی با تتراکلرید کربن گردید (۳۰). در مطالعه ی خسروی و همکاران سال ۱۳۹۵ اثربخشی عصاره آبی یونجه در کنترل قند و چربی خون در موش‌های صحرایی دیابتی را با توجه به اینکه دیابت یکی از علل استرس اکسیداتیو نیز می‌باشد، تایید نمودند (۳۱). در مطالعه ی ثمری و همکاران به اثرات آنتی‌اکسیدانی، فلاوونوئیدی و ویتامینC در عصاره هیدروالکلی یونجه بر بهبود زخم دستگاه گوارش ناشی از استیک اسید اشاره شد (۱۶).

یافته‌های این تحقیق مبنی بر اینکه گیاه یونجه در کنترل آسیب کبدی ناشی از نیکوتین موثر است، با نتایج تحقیقات فوق مطابقت داشت.

اندازه‌گیری وزن کبد در این مطالعه نشان داد که تجویز نیکوتین سبب کاهش وزن کبد شده است که از این لحاظ با نتایج بررسی Willis و همکاران در سال ۲۰۱۴ همخوانی داشت (۳۲). در تایید یافته‌های مربوط به اندازه‌گیری وزن بدن، Jensen و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که وزن بدن موش‌های صحرایی در اثر تجویز نیکوتین کاهش می‌یابد (۳۳). در مطالعه ما، مقدار مصرف غذا در اثر تجویز نیکوتین کاهش یافت اما دچار اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشد که با نتایج Rupprecht و همکاران در سال ۲۰۱۶ همخوانی داشت (۳۴). تجویز دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی یونجه سبب افزایش نسبی وزن بدن، کبد و همچنین مقدار مصرف غذا شده بود که این افزایش می‌تواند ناشی از کنترل آسیب اکسیداتیو کبدی باشد که نیکوتین مسبب آن است، چرا که کبد مرکز متابولیسم بدن بوده و بهبود کارایی آن سبب جذب بهتر مواد مغذی و در نهایت افزایش وزن بدن می‌گردد (۳۵).

نتیجه‌گیری

یافته‌های به دست آمده از پژوهش نشان داد که عصاره هیدروالکلی یونجه می‌تواند از آسیب کبدی ناشی از نیکوتین در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار جلوگیری کند. این مسئله احتمالا به اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی یونجه می‌تواند نسبت داده شود.

توصیه می‌شود به منظور تکمیل نتایج و شناخت بهتر اثربخشی گیاه یونجه در پاسخ به التهاب و آسیب کبدی ناشی از نیکوتین، سطح سایتوکاین‌های ضد التهابی (نظیر اینترلوکین ۱۰) و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی همچون گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در بافت کبد مورد ارزیابی قرارگیرد. همچنین پیشنهاد می‌گردد تغییرات بافتی کبد از منظر میکروسکوپیک بررسی شود.

سپاسگزاری

از خانم ماهرخ شفیعی کارشناس محترم آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد سنندج به سبب همکاری در انجام این پروژه تحقیقاتی تشکر و قدردانی می‌شود.

این مقاله مستخرج از کار تحقیقاتی انجام شده ای است که توسط حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج انجام شد.

References:

1- Jatoi I, Oppeltz RF. ***Tobacco and the Escalating Global Cancer Burden***. J Oncology 2011: 8 pages.

2- ***World Health Organization Report on the Global Tobacco Epidemic, Implementing smoke-free environments.*** Switzerland: WHO Press; 2009: 70-71.

3- Sinha-Hikim I, Friedman TC, Falz M, Chalfant V, Hasan MK, Espinoza-Derout J, et al. ***Nicotine plus a high-fat diet triggers cardiomyocyte apoptosis***. Cell and Tissue Research 2017; 368(1): 159-170.

4- Dai JB, Wang ZX, Qiao ZD. ***The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility***. Asian J Andrology 2015; 17(6): 954-960.

5- England LJ, Bunnell RE, Pechacek TF, Tong VT, McAfee TA. ***Nicotine and the Developing Human: A Neglected Element in the Electronic Cigarette Debate.*** American J Preventive Medicine 2015; 49(2): 286-293.

6- Sanner T, Grimsrud TK, Nicotine: ***Carcinogenicity and Effects on Response to Cancer Treatment - A Review***. Frontiers in Oncology 2015; 5: 196.

7- Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P 3rd. ***Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers.*** Handbook of Experimental Pharmacology 2009; 192: 29-60.

8- Jalili C, Tabatabaei H, Kakaberiei S, Roshankhah S, Salahshoor MR. ***Protective Role of Crocin Against Nicotine-induced Damages on Male Mice Liver.*** Inter J Preventive Med 2015; 6: 92.

9- Helen A, Krishnakumar K, Vijayammal PL, Augusti KT. ***Antioxidant effect of onion oil (Allium cepa. Linn) on the damages induced by nicotine in rats as compared to alpha-tocopherol.*** Toxicology Letters 2000; 116(1-2): 61-8.

10- Panteghini M. ***Aspartate aminotransferase isoenzymes.*** Clinical Biochemistry 1990; 23(4): 311-319.

11- Gowda S, Desai PB, Hull VV, Math AA, Vernekar SN, Kulkarni SS. ***A review on laboratory liver function tests.*** The Pan African Med J 2009; 3: 17.

12- Giannini EG, Testa R, Savarino V. ***Liver enzyme alteration: a guide for clinicians.*** Canadian MedAssociation J 2005; 172(3): 367-379.

13- Mirzaei A, Delaviz H, Mirzaei M, Tolooei M. ***The Effects of Medicago Sativa and Allium Porrum on Iron Overload in Rats.*** Global J Health Sci 2015; 7(7): 137-142. [Persion]

14- Nazir A, Zia-Ur R, Nafees A, Shujait A, Maghbool A and Ijaz A.. ***Effects of Medicago sativa on some serum biochemical metabolites in rats. Int. J. Agric. Biol. 2013; 15: 297–300***

15- CfIOoM. ***International guiding principles for biomedical research involving animals.*** USA: Council for International Organizations of Med Sci; 1985.

16- Samari M, Rahnema M, Nasiri SH, Shahnawaz A. ***The effects of hydro-alcoholic extract of aerial parts of alfalfa on acetic acid-induced gastric ulcer in animal models.*** J Animal Physiology and Develop 2014; 7(2): 59-71. [Persian]

17- Amraie E, Khosravi Farsani M, Sadeghi L, Naim Khan T, Yousefi Babadi V, Adavi Z. ***The effects of aqueous extract of alfalfa on blood glucose and lipids in alloxan-induced diabetic rats***. nterv Med Appl Sci 2015; 7(3): 124–128.

18- Albus U. ***Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.*** 8nd ed. USA: The National Academies Press; 2011: 11-40.

19- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia SH, Nikfar SH, Rezaiee A. ***Pestisides and oxidative stress: A review.*** Med Sci Monitor 2004; 10(6): 141-7. [Persion]

20- Grant DM. ***Detoxification pathways in the liver.*** J Inherited Metabolic Disease 1991; 14(4): 421-30.

21- Bruhn PJ, Osterballe L, Hillingso J, Svendsen LB, Helgstrand F. ***Posttraumatic levels of liver enzymes can reduce the need for CT in children: a retrospective cohort study.*** Scandinavian J Trauma, Resuscitation and Emergency Med 2016; 24(1): 104.

22- Kim HJ, Park KK, Chung WY, Lee SK, Kim KR. ***Protective Effect of White-fleshed Peach (Prunus persica (L.) Batsch) on Chronic Nicotine-induced Toxicity.*** J Cancer Prevention 2017; 22(1): 22-32.

23- Ahmadi R, Eshghjoo S. ***The Effect Of Cigarette And Waterpipe Smoke On Serum Level Of Alanine Aminotransferase And Aspartate Aminotransferase In Male Rats***. Payavard Salamat 2014; 8(2): 169-175. [Persian]

24- Contreras-Zentella ML, Hernandez-Munoz R. ***Is Liver Enzyme Release Really Associated with Cell Necrosis Induced by Oxidant Stress?***. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2016(2016): 12 .

25- Gaweł E, Grzelak M. ***The Effect of a Protein-Xanthophyll Concentrate from Alfalfa (Phytobiotic) on Animal Production - A Current Review.*** Annals of Animal Sci 2012; 12(3): 281-9.

26- Neogy S, Das S, Mahapatra SK, Mandal N, Roy S. ***Amelioratory effect of Andrographis paniculata nees on liver, kidney, heart, lungs and spleen during nicotine induced oxidative stress.*** J Environ Toxicol Pharmacol 2008; 25 (3): 321-8

27- Kovacic P, C ooksy A. ***I minium m etabolite m echanism f or n icotine toxicity and addiction: oxidative stress and electron transfer***. J Med Hypotheses 2005; 64 (1): 104-111

28- Zargari A. ***Therapeutic Plants.*** 1st. Tehran: Tehran Uni Press; 1996. pp. 642–646.

29- Hong YH, Chao WW, Chen ML, Lin BF. ***Ethyl acetate extracts of alfalfa (Medicago sativa L.) sprouts inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo***. J Biomed Sci 2009; 16(1): 64. [Persion]

30- Amraie E, Farsani MK, Sadeghi L, Khan TN, Babadi VY, Adavi Z. ***The effects of aqueous extract of alfalfa on blood glucose and lipids in alloxan-induced diabetic rats.*** Interventional Med & Applied Sci 2015; 7(3): 124-8.

31- Al-Dosari MS. ***In vitro and in vivo antioxidant activity of alfalfa (Medicago sativa L.) on carbon tetrachloride intoxicated rats***. The American J Chinese Med 2012; 40(4): 779-93.

32- Farsani MK, Amraie E, Kavian P, Keshvari M. ***Effects of aqueous extract of alfalfa on hyperglycemia and dyslipidemia in alloxan-induced diabetic Wistar rats. Interv Med Appl Sci.*** 2016;8(3):103-108.

33- Willis DN, Popovech MA, Gany F, Hoffman C, Blum JL, Zelikoff JT. ***Toxicity of gutkha, a smokeless tobacco product gone global: is there more to the toxicity than nicotine***?. International J Environmental Res and Public Health 2014 Jan; 11(1): 919-933.

34- Jensen K, Afroze S, Ueno Y, Rahal K, Frenzel A, Sterling M, et al. ***Chronic nicotine exposure stimulates biliary growth and fibrosis in normal rats.*** Digestive and Liver Disease 2013; 45(9): 754-61.

35- Rupprecht LE, Smith TT, Donny EC, Sved AF. ***Self-Administered Nicotine Suppresses Body Weight Gain Independent of Food Intake in Male Rats.*** Nicotine & Tobacco Res 2016; 18(9): 1869-76.

36- Rui L. ***Energy metabolism in the liver.*** Comprehensive Physiology 2014; 4(1): 177-197.

The study of the effect of *Medicago sativa* hydroalcoholic extract on nicotine-induced liver damage in male Wistar rats

Javad Beheshtipour [1], Mahdieh Raeeszadeh [*2], Rojin Jamali [3], Sajjad Sistani [4]

[1,3] Student of Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

[2] Assistant Proffesor of Pharmacology, Department of Basic Sciences, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

[4] Doctor of veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

Received: 8 Aug 2017 **Accepted:** 12 Oct 2017

Abstract

Introduction: Nicotine, as the most important component of cigarette, can cause liver damage. The aim of this study was to investigate the effect of the hydroalcoholic extract of alfalfa on controlling nicotine-induced liver damage in male Wistar rats.

Methods: In this experimental study, 24 male Wistar rats were randomly divided into 4 equal groups: control group (without treatment), T1 (nicotine), T2 (nicotine + alfalfa extract of 250 mg / kg) and T3 (nicotine + alfalfa extract of 500 mg / kg). Hydroalcoholic extract of alfalfa oraly and nicotine were injected subcutaneously at a dose of 0.2 mg / kg for 25 days. At the end of the course, food intake, body weight and liver were measured. Blood samples from each rat were obtained for the evaluation of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). Data were presented as mean and standard error of mean with SPSS 24 software and were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's post hoc test. The significant level was considered $P < 0.05$.

Results: The body weight of animals in the T1 group was significantly decreased in comparison to that of the control group ($P=0.046$). There was no significant difference in food intake between the groups ($P=0.054$). The liver weight in the T1 and T2 groups decreased significantly compared to the control group ($P=0.044$). Significant serum levels of ALT and AST enzymes increased in the T1 test group compared to the control group ($P<0.05$). In addition, in the treatment groups with alfalfa (T2 and T3) hydroalcoholic extract, serum concentrations of ALT and AST biomarkers were significantly decreased compared to the T1 group ($P<0.05$).

Conclusion: Based on the findings of this study, alfalfa hydroalcoholic extract with antioxidant effect can show the hepatoprotective effects against nicotine.

Keywords: Hydroalcoholic extract of Alfalfa, Nicotine, Liver, Oxidative Stress

This paper should be cited as:

Beheshtipour J, Raeeszadeh M, Jamali R, Sistani S. **The study of the effect of *Medicago sativa* hydroalcoholic extract on nicotine-induced liver damage in male Wistar rats.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2018; 25(10): 759-69.

***Corresponding author: Tel: 09123474457, email: vet_mr@yahoo.com**