

بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی میوه زالک و داروی آتورواستاتین بر روی بافت کبد موشهای صحرایی ماده مبتلا به هیپرکلسترولمی

سکینه فلاحتی^۱، فرح فرخی^{۲*}، غلامرضا نجفی^۳، علی شالیزار جلالی^۴

مقاله پژوهشی

مقدمه: افزایش کلسترول پلاسما به واسطه القاء تنش اکسیداتیو موجب آسیب‌های کبدی می‌گردد. بررسی‌های متعددی پیرامون اثر گیاه زالک بر کاهش لیپیدها و آترواسکلروز انجام گرفته است. هدف مطالعه حاضر ارزیابی آثار عصاره هیدروالکلی میوه زالک و آتورواستاتین بر تغییرات پروفایل لیپیدی سرم و تنش اکسیداتیو ناشی از هیپرکلسترولمی در بافت کبد موش‌های صحرایی ماده بود. **روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ۴۲ موش صحرایی ماده به ۷ گروه شامل شاهد، هیپرکلسترولمی ناشی از رژیم غذایی غنی از کلسترول، هیپرکلسترولمی + عصاره زالک (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه، خوراکی)، هیپرکلسترولمی + عصاره زالک (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه، خوراکی)، هیپرکلسترولمی + آتورواستاتین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه، خوراکی)، عصاره زالک (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه، خوراکی) و آتورواستاتین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه، خوراکی) تقسیم شدند. پس از ۳۰ روز، نمونه‌های خونی و بافت کبد جهت ارزیابی‌های بیوشیمیایی و بافت‌شناسی جمع‌آوری شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و توکی در نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ ارزیابی شدند.

نتایج: هیپرکلسترولمی به طور معنی‌داری سبب افزایش سطوح چربی سرم، آنزیم‌های کبدی و مالون‌دی‌آلدئید در بافت کبد و کاهش میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانت تام و آنزیم کاتالاز کبدی در مقایسه با گروه شاهد گردید. هم‌چنین، هیپرکلسترولمی موجب افزایش معنی‌دار قطر هپاتوسیت‌ها و هسته آن‌ها و بروز التهاب و نکروز سلولی در بافت کبد گردید. تجویز عصاره زالک و آتورواستاتین به طور معنی‌داری این فراسنجه‌ها را نسبت به گروه هیپرکلسترولمی بهبود بخشید.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد عصاره میوه زالک مقابل آسیب‌های کبدی در موش‌های صحرایی ماده هیپرکلسترولمیک نقش محافظتی دارد.

واژه‌های کلیدی: آتورواستاتین، زالک، هیپرکلسترولمی، کبد، موش‌های صحرایی

ارجاع: فلاحتی سکینه، فرح فرخی، نجفی غلامرضا، شالیزار جلالی علی. بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی میوه زالک و داروی آتورواستاتین بر روی بافت کبد موشهای صحرایی ماده مبتلا به هیپرکلسترولمی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۱): ۴۰-۵۴.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بافت و جنین‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ایران

۲- دانشیار، دکترای علوم زیستی، دانشگاه ارومیه، ایران

۳- دانشیار دکترای علوم تشریح، دانشگاه ارومیه، ایران

۴- استادیار، دکترای بافت‌شناسی، دانشگاه ارومیه، ایران

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۴۳۴۶۰۷۱۵، پست الکترونیکی: F.farokhi@urmia.ac.ir، کد پستی: ۵۷۱۳۹-۱۷۴۹۳

موجب مهار مسیر ال- مولانات می‌شوند مهار این مسیر منجر به اختلال در تولید کلسترول می‌گردد. در این شرایط به منظور جبران کاهش ساخت کلسترول، سلول‌های کبدی میزان بیان گیرنده‌های LDL را در سطح خود افزایش می‌دهند که موجب افزایش برداشت LDL و کاهش سطح خونی آن می‌گردد. اگرچه استفاده از داروهای شیمیایی مانند آتورواستاتین می‌تواند باعث کاهش سطح کلسترول سرمی و بهبود عملکرد دستگاه قلبی عروقی شود، ولی این داروها یکسری اثرات جانبی ناخواسته شامل میوپاتی، اختلالات گوارشی و پوستی، افزایش غلظت آنزیم‌های کبدی، بیخوابی، تحریک و خارش پوستی را دارد. میوپاتی ممکن است به اختلالات کلیوی ختم گردد (۶،۷). به همین خاطر محققان در پی تلاش برای استفاده از موثرترین روش برای کاهش کلسترول خون با کمترین اثر جانبی هستند. یکی از راهکارهای جدید بررسی ترکیبات درمانی با منابع گیاهی می‌باشد که نسبت به داروهای شیمیایی از عوارض جانبی کمتری برخوردارند. تحقیقات گسترده‌ای در سرتاسر جهان بر روی گیاهان مختلف در جریان است. عصاره‌های گیاهی نسبتاً اثرات درمانی بالاتر و عوارض جانبی کمتری داشته و نیز اقتصادی تر هستند (۸). تمایل مردم جهان به مصرف گیاهان دارویی در سال‌های اخیر بسیار چشمگیر بوده، همچنان که استفاده از گیاهان دارویی برای کاهش غلظت کلسترول و تری‌گلیسرید بسیار معمول شده است. گیاهان دارویی شامل ترکیباتی همانند فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، تانین‌ها و پلی‌فنل‌ها هستند. گزارش شده که ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدی خواص آنتی‌اکسیدانسی، ضدسرطانی، ضد میکروبی و ضد التهابی داشته و برای سیستم قلبی عروقی مفید می‌باشند (۹). زالزالک گیاهی است برگریز از خانواده رزاسه Rosaceae که بومی نواحی مدیترانه، شمال آفریقا، اروپا و آسیای مرکزی می‌باشد. این گیاه بالغ بر ۲۰۰ گونه گیاهی دارد که اغلب گونه‌های آن خارهایی برجسته، طویل، مستقیم و تیز با طولی بین یک تا پنج اینچ دارند (۱۰). میوه زالزالک به عنوان یک میوه جنگلی و دارویی گسترش زیادی در سراسر ایران به

امروزه بیماری‌های قلبی عروقی یکی از شایع‌ترین و خطرناک‌ترین بیماری‌ها در کشورهای توسعه یافته می‌باشد. بر طبق گزارشات متعدد بیش از ۴۰٪ مرگ و میر در ایران ناشی از بیماری‌های قلبی عروقی است (۱). کلسترول بالای خون نقش بسیار مهمی در بیماری‌های قلبی بر عهده دارد و زمینه را برای ایسکمی قلبی، انفارکتوس و آترواسکلروز فراهم می‌سازد (۲). آترواسکلروز یکی از علل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان می‌باشد. بالا رفتن غلظت کلسترول خون، به خصوص Low Density Lipoprotein (LDL) به عنوان عامل اولیه خطر برای بیماری آترواسکلروز و عملکرد غیر طبیعی اندوتلیوم رگ‌ها محسوب می‌شود. هیپرکلسترولمی همچنین منجر به حمله قلبی و سکته مغزی می‌گردد (۳). مطالعات پیشین نشان می‌دهد که افزایش کلسترول و LDL خون سبب اختلال در عملکرد کبد و ایجاد آسیب‌های کبدی می‌گردد. کبد چرب دارای یک ارتباط نزدیک با هیپرکلسترولمی و سطح High Density Lipoprotein (HDL) پایین خون می‌باشد، به نوبه خود یک کبد چرب، سبب افزایش تولید LDL شده که این افزایش خود عاملی برای بیماری‌های قلبی عروقی است (۴). ساخت داروهای کاهنده لیپید یک رویکرد مناسب برای کاهش سطح چربی خون می‌باشد. در طی دو دهه گذشته به دنبال استفاده گسترده از داروهای پایین آورنده کلسترول، کاهش قابل توجه در میزان مرگ و میر و اختلالات قلبی عروقی پدید آمده است. در این بین نقش ترکیبات استاتینی نسبت به سایر عوامل کاهنده کلسترول موثر به نظر می‌رسد. یکی از پر مصرف‌ترین استاتین‌ها آتورواستاتین می‌باشد. آتورواستاتین برای اولین بار در سال ۱۹۸۵ ساخته شد و مصرف آن به سرعت مورد توجه قرار گرفت (۵). آنزیم ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلووتاریل کوآنزیم آ ردوکتاز (HMG_COA reductase) مهمترین آنزیم در سنتز کلسترول محسوب می‌گردد. استاتین‌ها در غلظت‌های کم به صورت یک مهار کننده رقابتی به آنزیم HMG_COA reductase متصل شده و جایگزین سوبسترای طبیعی آن می‌گردند. بدین ترتیب استاتین‌ها

روش بررسی

تهیه عصاره: میوه‌های زالزالک از حومه شهرستان ارومیه تهیه گردید و با تایید آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه به شماره هرباریومی ۲۷۰۸۷۴، دانه‌هایشان خارج گردیده و گوشت میوه‌ها در دستگاه انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت تا خشک گردند. میوه‌ها بعد از خشک شدن با دستگاه آسیاب برقی به صورت پودر درآورده شد. مقدار ۱۰۰ گرم از پودر را داخل ارلن ریخته و روی آن حلال اتانولی ۸۰٪ اضافه گردید. با قرار دادن یک آهن‌ربا در داخل مخلوط به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه بر روی لرزاننده قرارداد شد. سرعت دستگاه به نحوی تنظیم گردید که آهن ربا درون محلول به راحتی حرکت کند و مخلوط را هم بزند. به منظور جلوگیری از تبخیر حلال دهانه ارلن با پارافیلیم مسدود گردید؛ مخلوط پس از ۷۲ ساعت با استفاده از کاغذ واتمن صاف گردید. این مراحل ۳ بار تکرار گردید تا از حل شدن تمام ترکیبات میوه گیاه در حلال مورد نظر اطمینان حاصل گردد. چون محلول صاف شده دارای حلال اتانولی بود، لذا با استفاده از دستگاه انکوباتور در دمای ۴۷ درجه حلال تبخیر گردید. عصاره باقی مانده به شکل توده نارنجی رنگ نیمه جامد، درون ظروف شیشه‌ای ریخته شد، اطراف آن توسط کاغذ آلومینیومی پوشانده شد و تا زمان استفاده در یخچال و به دور از نور نگهداری گردید (۲۱).

مواد: داروها و مواد شیمیایی به کار رفته در این مطالعه شامل: پودر کلسترول ۱۰۰ گرمی (Merck، آلمان)، یک بسته قرص اتورواستاتین ۱۰ میلی گرم (خوارزمی، ایران) سه بسته ۶۰ میلی گرمی روغن بادام شیرین. کیت‌های تشخیص کمی کلسترول، تری‌گلیسرید، لیپوپروتئین با چگالی پایین (LDL)، لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL)، اسپاراتات آمینوترانسفراز (ASAT)، آلانین آمینوترانسفراز (ALAT) (شرکت پارس آزمون).

حیوانات آزمایشگاهی: در این مطالعه تعداد ۴۲ سرموش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار با وزن ۱۷۰-۱۸۰ گرم از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده علوم

خصوص در مناطق شمال و غرب دارد (۱۱). مطالعات فتوشیمیایی حضور فلاونوئیدهای روتین از جمله هیپروزید و اسید کلروژنیک را در این گیاه مشخص کرده است که نشان دهنده پتانسیل موجود در آن‌ها برای تولید دارو می‌باشد (۱۲). اغلب فعالیت‌های دارویی زالزالک به پلی‌فنل‌ها، فلاونوئیدها و پروآنتوسیانیدین‌های اولیگومریک موجود در آن نسبت داده می‌شود. میوه زالزالک سرشار از ویتامین C، آنتوسیانین و فلاونوئیدها و فنول‌ها می‌باشد. کوئرستین ایزوکوئرستین ویتکسین، هایپروزید اپی کاتچین و اسید کلروژنیک فلاونوئیدهای فعال اصلی موجود در عصاره‌های گیاه زالزالک را تشکیل می‌دهند (۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که فلاونوئیدها دارای خواص بیولوژیکی متعددی از جمله ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانتی می‌باشند (۱۴). بررسی‌ها نشان داده است که عصاره‌های این گیاه موجب افزایش توان انقباضی میوکارد (۱۵)، افزایش جریان خون کرونری، به کارگیری بهتر اکسیژن توسط کاردیومیوسیت‌ها، کاهش بروز آریتمی‌های قلبی که به واسطه از سرگیری جریان خون ایجاد می‌گردند، کاهش فشار خون و درمان نارسایی احتقانی قلب می‌گردند (۱۶). مطالعات دیگری نیز در همین راستا از نقش حفاظتی عصاره‌های این گیاه در برابر آسیب‌های میوکاردی که به واسطه ایسکمی عروق کرونر و از سرگیری جریان خون به وجود می‌آیند، در مدل‌های حیوانی حکایت دارند (۱۷). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که گونه‌های متعددی از زالزالک دارای خواص کاهندگی چربی خون در حیوانات آزمایشگاهی می‌باشند (۱۸)، همچنین نقش محافظتی پروآنتوسیانیدین‌ها در مهار استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت مورد تأیید قرار گرفته است (۱۹). علاوه بر ویژگی‌های دارویی فوق، گزارشاتی نیز پیرامون اثرات ضدویروسی گیاه زالزالک مطالعه شده است (۲۰). در این مطالعه حاضر به بررسی اثرات مقایسه‌ای عصاره میوه زالزالک و داروی اتورواستاتین بر روی بر روی پروفایل چربی سرم، پراکسیداسیون لیپیدی و تغییرات بافتی کبد در موش‌های صحرایی ماده مبتلا به هیپرکلسترولمی انجام پذیرفته است.

آلانین آمینوترانسفراز (ALAT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (ASAT) طبق دستورالعمل کارخانه سازنده کیت تعیین مقدار شد. در روش اندازه‌گیری کلسترول و تری‌گلیسرید ۱۰ میکرولیتر از نمونه را با ۱۰۰۰ میکرولیتر از معرف و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر را با ۱۰۰۰ میکرولیتر از معرف به عنوان بلانک مخلوط نموده و سپس ۲۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه نموده و حداکثر طی ۶۰ دقیقه جذب نوری نمونه‌ها در برابر بلانک در طول موج ۵۴۶ نانومتر اندازه‌گیری گردید. در ارزیابی HDL و LDL ۱۰ میکرولیتر از نمونه را با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول شماره ۱ معرف مخلوط نموده سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه کرده و جذب نوری اولیه نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید. سپس ۲۵۰ میکرولیتر محلول شماره ۲ معرف اضافه گردید و پس از مخلوط نمودن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه نموده و جذب نوری ثانویه نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید. برای ارزیابی ALT و AST ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه را با ۱۰۰۰ میکرولیتر از معرف شماره ۱ مخلوط نموده و سپس معرف شماره ۲ به میزان ۲۵۰ میکرولیتر اضافه گردید. پس از مخلوط کردن ۲۵۰ میکرولیتر معرف شماره ۲ مقدار جذب نوری را در طول موج ۳۴۰ نانومتر بعد از ۱ دقیقه قرائت نموده و بلافاصله کورنومتر را به کار انداخته و دقیقاً پس از ۱، ۲، ۳ دقیقه اختلاف جذب نوری از دقیقه قبل تعیین گردید.

ارزیابی‌های بیوشیمیایی در بافت کبد

اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید: سطح مالون دی‌آلدئید (MDA) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی اندازه‌گیری می‌شود. طبق دستورالعمل ۰/۲ گرم نمونه بافتی را وزن کرده و ۱۰٪ وزن حجمی در آن بافر فسفات ریخته، سپس در هاون کوبانده شد (هموژن بافتی). هموژن تهیه شده، به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ۱۵۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و به لوله آزمایش منتقل گردید. سپس ۳۰۰ میکرولیتر تری کلریک اسید ۱۰٪ به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به

دانشگاه ارومیه تهیه گردید. حیوانات پیش از آغاز مطالعه به مدت یک هفته به شرایط محیطی عادت داده شدند و در دمای استاندارد با درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۰٪ (۲۲)، سیکل روشنایی ۱۲ ساعته با دسترسی آزاد به آب و غذای فشرده شده مخصوص حیوانات آزمایشگاهی در طول مطالعه نگهداری شدند.

رژیم غذایی غنی از کلسترول: جهت القاء هیپرکلسترولمی، موش‌ها رژیم غذایی غنی از کلسترول شامل غذای مخصوص جوندگان، کلسترول (۲٪) و روغن بادام دریافت کردند (۲۳).

پروتکل مطالعه: در این مطالعه تجربی، ۴۲ موش صحرایی ماده به صورت تصادفی به ۷ گروه مساوی شامل گروه کنترل، گروه هیپرکلسترولمی ناشی از رژیم غذایی غنی از کلسترول، گروه هیپرکلسترولمی + عصاره زالزالک (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به صورت خوراکی)، گروه هیپرکلسترولمی + عصاره زالزالک (۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به صورت خوراکی)، گروه هیپرکلسترولمی + آتورواستاتین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به صورت خوراکی)، گروه هیپرکلسترولمی + عصاره زالزالک (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به صورت خوراکی) و گروه دریافت‌کننده آتورواستاتین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به صورت خوراکی) تقسیم شدند. این گروه‌ها به مدت ۳۰ روز تیمار گردیدند (۲۴). در پایان آزمایشات تمامی حیوانات موجود در ۷ گروه ذکر شده ۲۴ ساعت پس از آخرین تیمار بیهوش شدند و کالبد گشایی روی آن‌ها انجام شد. نمونه‌های خونی مستقیماً از قلب جمع‌آوری گردید. برای تهیه سرم نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ در سانتریفیوژ قرار داده شد و سرم سریعاً جدا و در دمای ۸۰- درجه برای سنجش فراسنجه‌های بیوشیمیایی نگهداری شد. بعد از خون‌گیری بخشی از بافت کبد را جدا کرده و جهت بررسی‌های بافت‌شناسی در محلول ۱۰٪ فرمالین بافری قرار داده شد. بخش دیگر کبد جهت سنجش تنش اکسیداتیو به دمای ۷۰- درجه انتقال داده شد.

ارزیابی‌های بیوشیمیایی سرم: در نمونه‌های خونی جمع‌آوری شده سطح کلسترول، تری‌گلیسرید، HDL، LDL،

فعالیت کاتالاز است. محلول بافر فسفات تهیه گردید و pH روی ۶/۸ تنظیم گردید. جهت تهیه محلول آب اکسیژنه ۱/۱۵ میلی لیتر آب اکسیژنه در یک بالن ۱۰۰ ریخته شد و بافر فسفات تهیه شده به حجم رسانده شد. برای سنجش ۰/۲ گرم کبد محتوی ۲ میلی لیتر محلول بافر فسفات اضافه گردید، در محیط یخ کوبیده شد و به مدت ۴ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعدی ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی سانتریفیوژ شده ۲/۸ میلی لیتر بافر فسفات اضافه شد و پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آب اکسیژنه در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه بررسی گردید. در پایان مقادیر بر حسب U/gr tissue بیان شد (۲۷).

تهیه مقاطع بافتی: نمونه‌های بافتی به مدت ۷۲ ساعت در محلول فرمالین_سرم بافری قرار داده شدند. مراحل پاساژ بافتی، تهیه بلوک‌های پارافینی و تهیه برش‌های ۵ میکرونی انجام شد و به روش هماتوکسیلین-اِئوزین رنگ‌آمیزی صورت گرفت. جهت مطالعه قطر هپاتوسیت‌ها، قطر هسته هپاتوسیت‌ها با استفاده از عدسی مدرج و با میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر ارزیابی صورت گرفت.

ارزیابی آماری: داده‌های آماری این مطالعه با استفاده از نسخه ۱۹ نرم افزار SPSS مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند. جهت مقایسه بین گروه‌ها آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن تست توکی مورد استفاده قرار گرفت و مقدار $p < ۰/۰۵$ و $p < ۰/۰۰۱$ برای تعیین سطح معنی‌داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد. تمامی موارد اخلاقی مربوط به کار با حیوانات آزمایشگاهی در جریان انجام این مطالعه بر اساس دستورالعمل‌ها و حمایت دانشکده علوم صورت پذیرفت.

نتایج

نتایج ارزیابی بیوشیمیایی پروفایل لیپیدی سرم: نمودار شماره ۱ نتایج ارزیابی‌های بیوشیمیایی میزان لیپیدهای سرمی را نشان می‌دهد. در گروه هیپرکلسترولمی سطح کلسترول، تری گلیسرید و LDL نسبت به گروه کنترل به

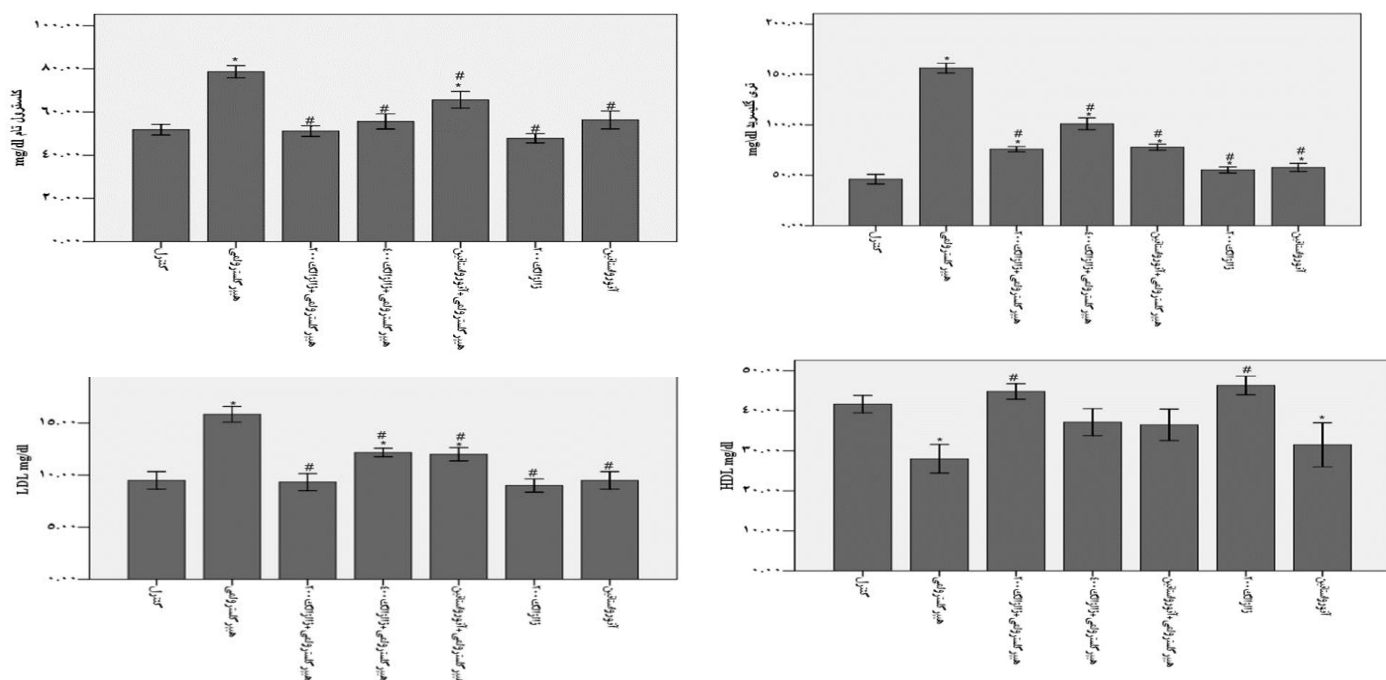
لوله آزمایش منتقل و با ۳۰۰ میکرولیتر از تیوباریتوریک اسید ۶۷٪ در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد برای ۲۵ دقیقه انکوبه شد. ۵ دقیقه پس از خنک شدن محلول، رنگ صورتی ناشی از واکنش مالون دی آلدئید با تیوباریتوریک اسید ظاهر و با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر در مقابل بلانک ارزیابی گردید (۲۵).

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانت تام به روش FRAP (ferric reducing-antioxidant power) در بافت کبد: ارزیابی روش FRAP براساس توانایی در احیای یون Fe^{+3} به Fe^{+2} و در حضور ماده‌ای به نام TPTZ (tripyridyltriazine) که به عنوان معرف می‌باشد، استوار است. برای آماده کردن TPTZ از ۳ نوع محلول ۱، ۲ و ۳ به ترتیب با نسبت ۱:۱:۱۰ استفاده می‌شود. محلول ۱: مقدار ۰/۰۷۸۰۲ گرم TPTZ را به ۴۰ میلی مول از هیدروکلریک اسید اضافه شد. محلول ۲: مقدار ۰/۱۳۵۱۳ گرم از فریک کلرید هگزاهیدرات با آب دیونیزه به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. محلول ۳: مقدار ۰/۲۷۲۱۶ گرم از استات سدیم تری هیدرات را برداشته در یک بالن ۱۰۰ میلی لیتری ریخته با آب دیونیزه به حجم بالن رسید. PH با استفاده از هیدروکلریک اسید روی ۳/۶ تنظیم شد. بافر TPTZ تازه آماده شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. ۳۰ میکرولیتر از نمونه هموزن شده را با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول فراب مخلوط کرده و حجم آن با آب مقطر به ۱ میلی لیتر رسید و بعد از ۱۰ دقیقه انکوبه کردن نمونه با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. بلانک را نیز مانند نمونه‌ها تهیه کرده فقط به جای بافت هموزن شده آب مقطر اضافه گردید. سپس جذب نوری نمونه‌ها و بلانک را در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت شد و با استفاده از فرمول (جذب نوری بلانک/جذب نوری نمونه) ظرفیت آنتی اکسیدانی تام نمونه‌ها محاسبه شد (۲۶).

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز: فعالیت کاتالاز بر اساس توانایی آن در تجزیه H_2O_2 به روش Aebi تعیین گردید. تجزیه H_2O_2 با کاهش جذب در طیف ۲۴۰ نانومتر قابل بررسی است. تفاوت در جذب در واحد زمان معادل مقدار

گروه کنترل افزایش معنی‌دار داشت ($p < 0/05$)، سطح HDL تغییر معنی‌داری نداشت. همچنین نسبت به گروه هیپرکلسترولمی سطح کلسترول، تری‌گلیسرید و LDL کاهش معنی‌دار داشت ($p < 0/001$)، سطح HDL تغییر معنی‌داری نداشت. در گروه عصاره زالزالک ۲۰۰ سطح تری‌گلیسرید نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار یافته است ($p < 0/05$) که این افزایش در سطح کلسترول، LDL و HDL نسبت به گروه هیپرکلسترولمی بود. همچنین نسبت به گروه هیپرکلسترولمی سطح کلسترول، تری‌گلیسرید و LDL کاهش معنی‌دار ($p < 0/001$) و سطح HDL افزایش معنی‌دار داشته است ($p < 0/001$). در گروه آتورواستاتین سطح تری‌گلیسرید نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار داشت ($p < 0/05$)، سطح HDL کاهش معنی‌دار داشت ($p < 0/05$). این تغییرات در کلسترول و LDL معنی‌دار نبود همچنین نسبت به گروه هیپرکلسترولمی سطح کلسترول، تری‌گلیسرید و LDL کاهش معنی‌دار ($p < 0/001$) ولی سطح HDL تغییر معنی‌داری نداشت. (نمودار ۱)

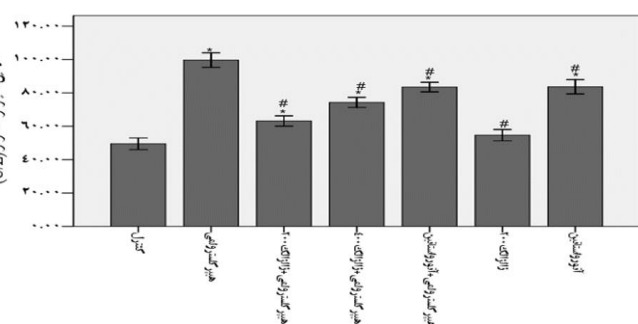
صورت معنی‌داری افزایش یافته است ($p < 0/05$)، سطح HDL به صورت معنی‌داری کاهش یافته است ($p < 0/05$). در گروه هیپرکلسترولمی + عصاره زالزالک ۲۰۰ سطح تری‌گلیسرید نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار یافته است ($p < 0/05$) که این افزایش در سطح کلسترول، LDL و HDL نسبت به گروه کنترل غیر معنی‌دار بود. هم‌چنین نسبت به گروه هیپرکلسترولمی سطح کلسترول، تری‌گلیسرید و LDL کاهش معنی‌دار داشته ($p < 0/001$) و در سطح HDL نسبت به گروه هیپرکلسترولمی افزایش معنی‌دار مشاهده گردید ($p < 0/001$). در گروه هیپرکلسترولمی + عصاره زالزالک ۴۰۰ سطح تری‌گلیسرید و LDL نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار داشت ($p < 0/05$)، در سطح HDL و کلسترول تغییر معنی‌داری مشاهده نگردید. همچنین نسبت به گروه هیپرکلسترولمی سطح کلسترول، تری‌گلیسرید و LDL کاهش معنی‌دار داشته است ($p < 0/001$) ولی سطح HDL تغییر معنی‌داری نداشت. در گروه هیپرکلسترولمی + آتورواستاتین سطح کلسترول، تری‌گلیسرید و LDL نسبت به



نمودار ۱: میانگین تغییرات حاصل از فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. داده‌ها به صورت $mean \pm SEM$ نشان داده شده است. * $p < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل # $p < 0/001$ در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی ناشی از رژیم غذایی غنی از کلسترول

نتایج ارزیابی فعالیت آنزیمهای کبدی: نمودار ۲ نتایج مربوط به میزان آنزیمهای شاخص آسیب کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) را در گروههای مختلف نشان می‌دهد. سطوح سرمی این آنزیمها در گروه هیپرکلسترولمی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$). در گروه‌های هیپرکلسترولمی + عصاره زالزالک ۲۰۰، هیپرکلسترولمی + عصاره زالزالک ۴۰۰ و هیپرکلسترولمی + اتورواستاتین سطح این آنزیمها در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار داشت

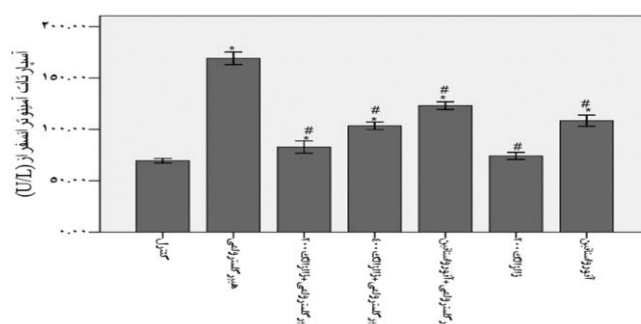
و در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی کاهش معنی دار دیده شد ($p < 0.001$). در گروه عصاره زالزالک ۲۰۰ سطح این آنزیمها نسبت به گروه کنترل افزایش غیر معنی‌دار و نسبت به گروه هیپرکلسترولمی کاهش معنی‌دار مشاهده گردید ($p < 0.001$).



نمودار ۲: میانگین تغییرات آنزیمهای کبدی در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده است. * $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل # $p < 0.001$ در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی ناشی از رژیم غذایی. غنی از کلسترول

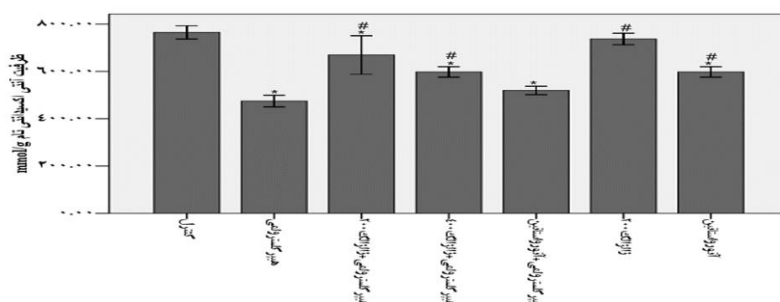
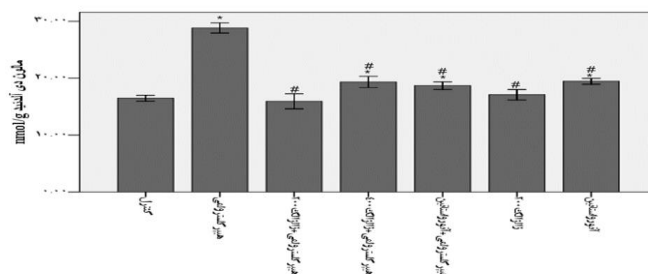
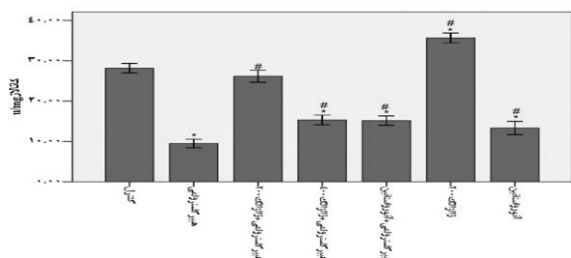
نتایج ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانتی بافت کبد: در نمودار ۳ میزان مالون دی آلدئید، آنزیم کاتالاز و ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام اکسیدانتی تام بافت کبد نشان داده شده است. در گروه هیپرکلسترولمی سطح مالون دی آلدئید نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافته ($p < 0.05$) و سطوح کبدی کاتالاز و ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($p < 0.05$). در گروه هیپرکلسترولمی + عصاره زالزالک ۲۰۰ میزان مالون دی آلدئید و کاتالاز نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری نداشت، ولی میزان ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام نسبت به گروه کاهش معنی‌دار داشت ($p < 0.05$)، هم چنین نسبت به گروه هیپرکلسترولمی در میزان مالون دی آلدئید کاهش معنی‌دار ($p < 0.001$) و در میزان کاتالاز و ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام مشاهده گردید ($p < 0.001$)، اما تغییر معنی‌داری در مقدار ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام مشاهده نگردید. در گروه عصاره زالزالک ۲۰۰ مقدار مالون دی آلدئید و ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری نداشت، ولی میزان کاتالاز افزایش

میزان مالون دی آلدئید نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) و در میزان کاتالاز و ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) مشاهده گردید ($p < 0.001$).



معنی دار مقدار کاتالاز و ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام مشاهده گردید ($p < 0.001$). (نمودار ۳)

معنی دار داشت ($p < 0.05$) و نسبت به گروه هیپرکلسترولمی کاهش معنی دار مقدار مالون دی آلدئید ($p < 0.001$) و افزایش



نمودار ۳: میانگین تغییرات مالون دی آلدئید، آنزیم کاتالاز و ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام بافت کبد در گروه های مختلف مورد مطالعه. داده ها به صورت $mean \pm SEM$ نشان داده شده است * $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل # $p < 0.001$ در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی ناشی از رژیم غذایی

هیپرکلسترولمی+عصاره زالزالک ۴۰۰، عصاره زالزالک ۲۰۰ و گروه آتورواستاتین کاهش معنی دار قطر هپاتوسیت ها و قطر هسته هپاتوسیت ها در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی شد ($p < 0.001$). در حالی که، گروه هیپرکلسترولمی+آتورواستاتین تغییر معنی داری در این فراسنجه ها ایجاد نشد. (جدول ۱)

نتایج ارزیابی های هیستومورفومتریک بافت کبد: در جدول ۱ اندازه قطر هپاتوسیت ها و هسته آن ها نشان داده شده است. در گروه هیپرکلسترولمی قطر هپاتوسیت ها و قطر هسته آن ها در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافته است ($p < 0.05$) در گروه های هیپرکلسترولمی+عصاره زالزالک ۲۰۰،

جدول ۱: میانگین تغییرات اندازه قطر هپاتوسیت ها و اندازه قطر هسته هپاتوسیت ها در گروه های مختلف مورد مطالعه.

گروه ها	قطر هپاتوسیت ها (میکرومتر)	قطر هسته هپاتوسیت ها (میکرومتر)
کنترل	$0.67 \pm 0.14 / 0.2$	$0.43 \pm 0.05 / 0.1$
هیپرکلسترولمی	$1.02 \pm 1.18 / 0.52^*$	$0.63 \pm 0.09 / 0.2$
هیپرکلسترولمی+زالزالک ۲۰۰	$1.41 \pm 1.14 / 0.82^{\#}$	$0.41 \pm 0.06 / 0.15^{\#}$
هیپرکلسترولمی+زالزالک ۴۰۰	$0.54 \pm 1.15 / 0.88^{\#}$	$0.45 \pm 0.06 / 0.16^{\#}$
هیپرکلسترول+آتورواستاتین	$0.39 \pm 1.16 / 0.15$	$0.51 \pm 0.06 / 0.16$
زالزالک ۲۰۰	$0.59 \pm 1.14 / 0.22^{\#}$	$0.23 \pm 0.06 / 0.12^{\#}$
آتورواستاتین	$1.30 \pm 1.15 / 0.78^{\#}$	$0.45 \pm 0.06 / 0.12^{\#}$

داده ها به صورت $mean \pm SEM$ نشان داده شده است. * $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل # $p < 0.001$ در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی ناشی از رژیم غذایی غنی از کلسترول

هیپرکلسترولمی+ عصاره زالزالک ۲۰۰، هیپرکلسترولمی+ عصاره زالزالک ۴۰۰ و هیپرکلسترولمی+ اتورواستاتین هپاتوسیتها در اطراف ورید مرکزی تا حدودی ساختار طبیعی داشتند، ولی همچنان التهاب در اطراف ورید مرکزی در گروه هیپرکلسترولمی+ اتورواستاتین مشاهده گردید و در گروه اتورواستاتین نیز در فضای بینابینی التهاب مشاهده گردید. (شکل ۱)

یافته‌های هیستوپاتولوژیک: در گروه کنترل و گروه عصاره زالزالک ساختار لوبولی، فضای بینابینی، فضای پورتال، وریدچه مرکزی و سلول‌های کبدی کاملاً طبیعی بودند. در گروه هیپرکلسترولمی استئاتوز آشکار همراه با قرارگرفتن قطرات چربی کوچک و بزرگ در هپاتوسیتها و سلول‌های کبدی غیر طبیعی با هسته پیکنوزه مشاهده گردید. همچنین، التهاب در فضای بینابینی و فضای پورتال نیز دیده شد. در گروه‌های



شکل ۴ : اثرات عصاره زالزالک و اتورواستاتین بر روی هیستوپاتولوژی بافت کبد. ۱- در گروه کنترل هپاتوسیتها و ساختار بافت کبد طبیعی می‌باشد. ۲- گروه هیپرکلسترولمی تشکیل قطرات چربی بزرگ و کوچک درون سیتوپلاسم هپاتوسیتها مشخص می‌باشد و التهاب در اطراف ورید مرکزی دیده می‌شود. ۳- گروه هیپرکلسترولمی+عصاره زالزالک ۲۰۰ بافت کبد طبیعی بوده و تغییر پاتولوژیک خاصی در آن مشاهده نگردید. ۴- گروه هیپرکلسترولمی+ زالزالک ۴۰۰ قطرات چربی به طور منتشر و جزئی در بافت کبد مشاهده گردید. ۵- گروه هیپرکلسترولمی + اتورواستاتین التهاب در اطراف ورید مشاهده گردید. ۶- گروه عصاره زالزالک ۲۰۰ تغییر پاتولوژیک خاصی مشاهده نشد. ۷- گروه اتورواستاتین التهاب در فضای بینابینی مشاهده شد. (هماتوکسیلین-اوزین و بزرگنمایی ۴۰۰x).

یافته است. در این مطالعه اثرات آنتی اکسیدانتی و کاهندگی چربی با استفاده از عصاره زالزالک و اتورواستاتین در موش‌های صحرایی مبتلا به هیپرکلسترولمی مورد ارزیابی قرار گرفت. در گروه هیپرکلسترولمی موش‌های صحرایی ماده غلظت بالاتری از TC، LDL و TG را نسبت به گروه کنترل داشتند که حاکی از موفقیت‌آمیز بودن مدل هیپرکلسترولمی بود. کلسترول از جمله مواد اساسی در ساختار غشای سلولی و همچنین ماده اولیه برای سنتز اسیدهای صفراوی، هورمون‌های استروئیدی و ویتامین D می‌باشد. با این حال افزایش غلظت کلسترول سرم خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی و اختلالات کبدی را

بحث

مطالعات بالینی و تجربی نشان می‌دهد که رژیم غذایی غنی از کلسترول نقش اساسی در بیماری‌های قلبی عروقی و متابولیسم غیر طبیعی لیپیدها در کبد دارد. کبد نقش اساسی در متابولیسم چربی در بدن بر عهده دارد. متابولیسم کلسترول به طور عمده در کبد تنظیم می‌شود و استئاتوز کبد حاکی از تجمع بیش از حد چربی در هپاتوسیتها به دلیل عدم تعادل در تشکیل و تجزیه چربی‌ها می‌باشد (۲۸). در طول دو دهه اخیر استفاده از محصولات طبیعی با ویژگی‌های کاهندگی چربی خون برای جلوگیری از توسعه بیماری‌های قلبی عروقی و مشکلات کبدی اهمیت دو چندان

(۳۲،۳۳). در مطالعه حاضر میزان HDL در گروه‌های تیمار شده با زالزالک نسبت به گروه هیپرکلسترولمی افزایش یافته است. کاهش سطح بالای کلسترول خون با کاهش شاخص‌های سرمی کبد و کاهش تنش اکسیداتیو همراه می‌باشد. سنجش فعالیت سرمی آنزیم‌های کبدی شاخص مناسبی جهت ارزیابی میزان آسیب وارد شده به بافت کبدی می‌باشد، آسیب هپاتوسیت‌ها سبب نشت این آنزیم‌ها به جریان خون شده و سبب افزایش مقادیر سرمی آن‌ها می‌شود (۳۵،۳۴). اختلالات ساختاری و عملکردی غشا هپاتوسیت‌ها در نتیجه هجوم گونه‌های فعال اکسیژن که در نتیجه افزایش مقدار کلسترول و تولید رادیکال‌های آزاد به تبع آن رخ می‌دهد سبب نشت آنزیم‌های کبدی به جریان خون در گروه هیپرکلسترولمی می‌شود. در این مطالعه افزایش فعالیت سرمی آنزیم‌های ALT و AST در سرم موش‌های صحرایی تغذیه شده با رژیم غذایی غنی از کلسترول مشاهده شد که نشان دهنده بروز آسیب در سلول‌های کبدی می‌باشد اثرات پیشگرانه عصاره زالزالک به طور قابل ملاحظه‌ای از افزایش سطوح سرمی آنزیم‌های فوق در اثر تغذیه با رژیم غذایی غنی از کلسترول جلوگیری کرد که در مقایسه با داروی آتورواستاتین نیز تاثیر بیشتری داشت. انباشت تری‌گلیسرید با ایجاد تنش اکسیداتیو در کبد در ارتباط است، MDA محصول پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد و به عنوان شاخص سطح رادیکال‌های آزاد در نظر گرفته می‌شود. مطالعه‌ها نشان می‌دهند که زالزالک دارای خواص جمع‌کنندگی رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند سوپراکسید، محافظت سلول در برابر آسیب‌های شیمیایی شامل سموم محیطی، کاهش دادن پراکسیداسیون لیپیدی در نواحی بافتی‌های مختلف و محافظت بافتی، مانند کبد در برابر انواع استرس‌های شیمیایی است که علت اصلی آن وجود سطح بالا از مواد آنتی‌اکسیدانتی مانند فلاونوئیدها در این گیاه است (۳۶). می‌توان پیشنهاد کرد که متعاقب تایید مطالعات بالینی ترکیبات عصاره هیدروالکلی میوه زالزالک به عنوان یک محصول طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانتی بالا و دارای نقش محافظت کبدی در موارد مشکلات قلبی‌عروقی، آترواسکلروز و بیماری کبد چرب از طریق صنایع

افزایش می‌دهد (۲۹). در این مطالعه عصاره زالزالک توانست سطح چربی خون را تنظیم کند و سبب مهار قابل توجه بالا رفتن سطح لیپیدهای سر می‌گردد که در مقایسه با آتورواستاتین نیز این تاثیر بیشتر بود. این کاهش کلسترول می‌تواند ناشی از مهار HMG-COA ردوکتاز با افزایش دفع اسیدهای چربی باشد. مطالعات مولکولی انجام گرفته در این زمینه بیان می‌دارد که بیوسنتز کلسترول و تبدیل متابولیک آن به اسیدهای صفراوی دو قاعده مهم هستند. HMG_COA Areductase آنزیم مهم در بیوسنتز کلسترول می‌باشد و داروی آتورواستاتین مهار کننده این آنزیم است. در حالی که cholesterol7 α -hydroxylase (CYP7A1) مسئول تنظیم متابولیک تبدیل کلسترول به اسید صفا می‌باشد. هنگامی که مقدار کلسترول خون بالا می‌رود، میزان بیان ژن CYP7A1 کاهش می‌یابد (۳۰). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که عصاره زالزالک همانند ایزوفلاوان سویا باعث افزایش بیان ژن CYP7A1 می‌شود و در نتیجه سبب افزایش تولید اسید صفا و به دنبال آن کاهش کلسترول در کبد و بدن می‌گردد (۳۱). در بررسی‌های پیشین گزارش شده است که کاهش TG با کاهش خطرات قلبی‌عروقی همراه است و نتایج نشان می‌دهد که ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره زالزالک می‌تواند سبب کاهش TG شود که ممکن است از طریق کاهش جذب آن و یا افزایش دفع تری‌گلیسرید از طریق مدفوع باشد. عمده‌ترین عامل برای خطرات قلبی‌عروقی افزایش LDL پلاسما می‌باشد هنگامی که LDL خون بالا می‌رود در دیواره رگ‌ها انباشته و سبب ایجاد پلاک‌های آترواسکلروزی می‌شود. در این مطالعه میزان LDL در گروه هیپرکلسترولمی به طور معنی‌دار بالا رفت، ولی عصاره زالزالک سبب کاهش معنی‌دار آن گردید و با مطالعات صورت گرفته هم‌خوانی دارد. در نتیجه به نظر می‌رسد می‌توان این ترکیب را به عنوان عامل کاهنده LDL در درمان‌های قلبی‌عروقی مد نظر قرار داد. عامل دیگری که سبب پیشرفت آترواسکلروز می‌شود کاهش HDL است HDL تسهیل کننده مسیر انتقال کلسترول از سایر قسمت‌های بدن به کبد می‌باشد. و افزایش HDL سبب کاهش آترواسکلروز می‌شود

HDL سرمی شود و همچنین سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی ALT و AST در موش‌های صحرایی ماده مبتلا هیپرکلسترولمی شود. به علاوه، این ترکیب میزان MDA کبدی را کاهش داده و سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانته کاتالاز می‌شود. عصاره زالزالک اثرات پیشگیرانه از وقوع استئاتوز و التهاب کبدی در موش‌های صحرایی ماده تغذیه شده با رژیم غذایی غنی از کلسترول دارد و باعث بهبود ساختار بافتی کبد و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و تنش اکسیداتیو در کبد می‌شود.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی با کد ۲۴۰-۲ مصوب شورای پژوهشی دانشگاه ارومیه می‌باشد که بدین وسیله از مساعدت‌های صورت پذیرفته قدردانی می‌گردد.
تعارض در منافع: وجود ندارد

داروسازی مورد استفاده قرار گیرد. با این وجود، آشکار شدن دقیق کارایی درمانی عصاره هیدروالکلی میوه زالزالک جهت ارتقاء مطلوب روند درمان بیماری‌های کبدی مستلزم پی‌ریزی مطالعات تجربی وسیع‌تر و نیز کارآزمایی‌های بالینی می‌باشد. رژیم غذایی غنی از کلسترول همچنین می‌تواند سبب القای تغییر عملکرد غده هیپوفیز گردد به عبارت دیگر تغییر عملکرد غده هیپوفیز منجر به تغییر LH و FSH گردیده و در نتیجه سبب تغییرات بزرگ در چرخه جنسی می‌گردد (۴۵). با توجه به استفاده از موش‌های صحرایی ماده، تشریح باید در چرخه جنسی یکسان و مشخص صورت گیرد و سنجش میزان هورمون‌های استروژن و پروژسترون لحاظ گردد

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره میوه زالزالک دارای اثرات هیپوکلسترولمیک بوده و می‌تواند به طور قابل توجهی سبب کاهش TC، TG و LDL سرم و افزایش میزان

References:

- Ghazanfari Z, Alizadeh SM, Azizzadeh Furozi M, Ramazani M. *Prevalence of coronary artery diseases risk factors in Kerman*. Iran J Crit Care Nurs 2010; 3(1): 29-32. [Persian]
- Zou Y, Lu Y, Wei D. *hypcholesterolemic Effects of a Flavonoid-Rich Extract of Hypericum perforatum L. in Rats Fed a Cholesterol-Rich Diet*. J Agric Food Chem 2005; 53(7): 2462-66.
- Garjani A, Fathiazad F, Zakheri A, Allaf Akbari N, Azarmie Y, Fakhrjoo A, et al. *The effect of total extract of Securigera securidaca L.seeds on serum lipid profiles, antioxidant status, and vascular function in hypercholesterolemic rats*. J Ethnopharm 2009; 126(3): 525-32.
- Benlhabib E, Baker JI, Keyler DE, Singh AK. *Effects of purified puerarin on voluntary alcohol intake and alcohol withdrawal symptoms in P rats receiving free access to water and alcohol*. J Med Food 2004; 7:180-6.
- Zhao SP, Wu ZH, Hong SC, Ye HJ, Wu J. *Effect of atorvastatin on SR-BI expression and HDL-induced cholesterol efflux in adipocytes of hypercholesterolemic rabbits*. Clin Chim Acta 2006; 365(1-2):119-124.
- Rang HP, Dale MM, Ritter J M, Moore P K. *Pharmacology*. Churchill livingstone publish Ltd London 2003; 390-92.
- Doosthoseini E, Hassanpour-ezatti M, Navidi H, Abachi T. *A fuzzy expert system for prescribing atorvastatin optimum dose*. Koomesh 2011; 13(1):43-9. [Persian]

- 8- Ng YP, Or TC, Ip NY. *Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease*. Neurochemistry international 2015; 89: 260-70.
- 9- Rezaei-Golmisheh A, Malekinejad H, Asri-Rezaei S, Farshid AA, Akbari P. *Hawthorn ethanolic extracts with triterpenoids and flavonoids exert hepatoprotective effects and suppress the hypercholesterolemia-induced oxidative stress in rats*. Iran J Basic Med Sci 2015; 18(7): 691-99.
- 10- Rigelsky JM, Sweet DV. *Hawthorn; Pharmacology and Therapeutic Uses*. Am J Health System Pharmacy 2002; 59(5): 417-22.
- 11- Jalili A, Jamzad Z. A preliminary survey of endemic, rare and endangered plants species in Iran. *Research institute of forests and Rangelands*. Tehran, Iran: Red data book of Iran; 1999. [Persian]
- 12- Harborne J, Williams A. *Advances in flavonoid research since*. Phytochemistry 2000; 55(6): 481-504.
- 13- Yao M, Ritchie HE, Brown-Woodman PD. *A reproductive screening test of hawthorn*. J Ethnopharm 2008; 118: 127-32.
- 14- Middleton E, Kandaswami CH, Theoharides TC. *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*. Pharmacological Reviews 2000; 52(4): 673-751.
- 15- Schwinger RH, Pietsch M, Frank K, Brixius K. *Crataegus special extract WS 1442 increases force of contraction in human myocardium cAMP independently*. J Cardiovascular Pharma 2000; 35(5): 700-7.
- 16- Hosseinimehr SJ, Azadbakht M, Abadi AJ. *Protective effect of hawthorn extract against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mouse bone marrow cells*. Environ Toxicol Pharmacol 2008; 25(1): 51-6. [Persian]
- 17- Veveris M, Koch E, Chatterjee SS. *Crataegus special extract WS(R) 1442 improves cardiac function and reduces infarct size in a rat model of prolonged coronary ischemia and reperfusion*. Life Sci 2004; 74(15): 1945-55.
- 18- Khalil R, Abuharfeil N, Shabsoug B. *The Effect of Crataegus Aronica Aqueous Extract in Rabbits Fed with High Cholesterol Diet*. Eur J Scientific Res 2008; 22(3): 352-60. [Persian]
- 19- Lee YA, Kim YJ, Cho EJ, Yokosuka T. *Ameliorative effects of proanthocyanidin on oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats*. J Agricultural Food Chemistry 2007; 55 (23): 9395- 400.
- 20- Shahat AA, Cos P, De Bruyne T. *Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from Crataegus sinaica*. Planta Med 2002; 68(6): 539-41.
- 21- Fathi Azad F, Allaf Akbari N, Zakheri A, Andalib S, Maleki Dizaji N, Ghareh Bagheri A, et al. *Hypolipidemic and antioxidant effects of Securigera securidaca L. seed in high fat fed rats*. Pharmaceutical.Sci 2010; 15(4): 293- 301. [Persian].
- 22- Matos Sh-L, Paula H, Pedrosa M, dos Santos R, Oliveira E, Júnior D, et al. *Dietary Models for Inducing Hypercholesterolemia in Rats* 2005; 48(2): 203-9.

- 23- Al-Hallaq E, Kasabri V, Abdalla Sh S, Bustanji YK, Afifi F. *Anti-Obesity and Antihyperglycemic Effects of Crataegus aronia Extracts: In Vitro and in Vivo Evaluations*. Food and Nutrition Sci 2013; 4(9): 972-83
- 24- Rezazadeh-Reyhani Z, Razi M, Malekinejad H, Sadrkhanlou R. *Cytotoxic effect of nanosilver particles on testicular tissue: Evidence for biochemical stress and Hsp70-2 protein expression*. Environ Toxicol Pharmacol 2015; 40(2): 626-38. [Persian]
- 25- Jalali AS, Hasanzadeh S, Malekinejad H. *Crataegus monogyna aqueous extract ameliorates cyclophosphamide-induced toxicity in rat testis: stereological evidences*. Acta Med Iran 2012; 50(1): 1-8.
- 26- Aebi H. *Catalase Invitro*. Method in Enzymology 1984; 105:121-6.
- 27- Abbas AM, Sakr HF. *Simvastatin and vitamin E effects on cardiac and hepatic oxidative stress in rats fed on high fat diet*. J Physiol Biochem 2013; 69(4): 737-50.
- 28- Libby P, Aikawa M, Schönbeck U. *Cholesterol and atherosclerosis*. Biochim Biophys Acta 2000; 1529: 299-309.
- 29- Kwok Ch Y, Li Ch, Cheng HL, Ng YF, Chan TY, Kwan YW, et al. *Cholesterol lowering and vascular protective effects of ethanolic extract of dried fruit of Crataegus pinnatifida, hawthorn (Shan Zha), in diet-induced hypercholesterolaemic rat model*. J functional foods 2013; 5(3): 1326-1331.
- 30- Appt SE, Chen H, Goode AK, Hoyer PB, Clarkson TB, Adams MR. *Franke, Jay R. Kaplan. The Effect of Diet and Cardiovascular Risk of Ovarian Aging in Cynomolgus Monkeys*. Menopause 2010; 17(4): 741-8.
- 31- Kuo DH, Yeh CH, Shieh PC, Cheng KC, Chen FA, Cheng JT. *Effect of shanzha, a Chinese herbal product, on obesity and dyslipidemia in hamsters receiving high-fat diet*. J Ethnopharmacol 2009; 124: 544-50.
- 32- Zhang Z., Ho W.K. *Hawthorn fruit is hypolipidemic in rabbits fed a high cholesterol diet*. J Nutr 2002; 132: 5-10.
- 33- Wang JQ, Li J, Zou YH, Cheng WM, Lu Ch, Zhang L, et al. *Preventive effects of total flavonoids of Litsea coreana leve on hepatic steatosis in rats fed with high fat diet*. J Ethnopharmacol 2009; 121(1): 54-60.
- 34- Jaya Ch, Anuradha CV. *Cissus quadrangularis stem alleviates insulin resistance, oxidative injury and fatty liver disease in rats fed high fat plus fructose diet*. Food Chem Toxicol 2010; 48(8-9): 2021-29.
- 35- Akila M, Devaraj H. *Synergistic effect of tincture of Crataegus and Mangifera indica L. extract on hyperlipidemic and antioxidant status in atherogenic rats*. Vascul Pharmacol 2008; 49(4-6): 173-7.
- 36- Yokozawa T, Ishida A, Cho EJ, Nakagawa T. *The effects of Coptidio Rhizoma extract on a hypercholesterolemic animal model*. Phytomedicine 2003; 10: 17-22.
- 37- Marie J, Stuart MB, Jonathan M, Gerrard MD, James G, White MD. *Effect of cholesterol on*

- production of thromboxane B2 by platelets in vitro.* N Eng Med 1980; 302:6-10.
- 38- Yazdanparast R, Bahramikia S, Ardestani A. *Nasturtium officinale reduces oxidative stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolaemic rats.* Chem Bio Interact 2008; 172(3): 176-84.
- 39- Collin P, Chapados N, Dufresne E, Corriveau P, Imbeault P, Lavoie JM. *Time course of changes in in vitro lipolysis of intra-abdominal fat depots in relation to high-fat diet-induced hepatic steatosis in rats.* Br J Nutr 2006; 96(2): 268-75.
- 40- Yoo JH, Liu Y, Kim HS. *Hawthorn Fruit Extract Elevates Expression of Nrf2/HO-1 and Improves Lipid Profiles in Ovariectomized Rats.* Nutrients 2016; 8(5): 283.
- 41- Kumar S, Pandey AK. *Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview.* The Scientific World J 2013: 1-16.
- 42- Anila L, Vijayalakshmi NR. *Antioxidant action of flavonoids from Mangifera Indica and Emblica Officinalis in hypercholesterolemic rats.* Food Chem 2003; 83(4): 569-74.
- 43- Wang H, Zhang Z, Guo Y, Sun P, Lv X, Zuo Y. *Hawthorn fruit increases the antioxidant capacity and reduces lipid peroxidation in senescence-accelerated mice.* Eur Food Res Technol 2011; 232(5): 743-51.
- 44- Kwok CY, Wong CNY, Yau MYC, Yu PHF, AU ALS, Poon CHC, et al. *Consumption of dried fruit of Crataegus pinnatifida (hawthorn) suppresses high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia in rats.* J Funct Foods 2010; 2(3): 179-86.

Study of the Effects of *Crataegus aronia* fruit hydro-alcoholic extract and atorvastatin on hepatic tissue in hypercholesterolemia female rats

Sakineh Falahati¹, Farah Farokhi^{*2}, Gholamreza Najafi³, Ali Shalizar Jalali⁴

Original Article

Introduction: Increased plasma cholesterol causes hepatic damages through oxidative stress (OS) induction. There are many investigations about hawthorn effects on lipid reduction and atherosclerosis. The goal of current study was to determine the effects of hydro-alcoholic extract of *Crataegus aronia* fruit (HECA) and atorvastatin (AVS) on hypercholesterolemia-induced alterations in serum lipid profile and OS in hepatic tissue of female rats.

Methods: In this experimental study, 42 female rats were assigned into 7 groups including control, diet-induced hypercholesterolemia (DIH), DIH + HECA (200 mg/kg/day; Per Oral (PO)), DIH + HECA (400 mg/kg/day; PO), DIH + AVS (10 mg/kg/day; PO), HECA (200 mg/kg/day; PO) and AVS (10 mg/kg/day; PO). After 30 days, blood and hepatic tissue samples were collected for biochemical and histological analyses. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's statistical tests using SPSS software.

Results: Hypercholesterolemia resulted in significant increases in levels of serum lipids, hepatic enzymes and malondialdehyde in hepatic tissue as well as reductions in total antioxidant capacity and catalase level in liver compared to control group. Moreover, DIH led to significant increases in diameters of hepatocytes and their nuclei along with inflammation and cellular necrosis in hepatic tissue. Administration of HECA and AVS significantly restored above-mentioned parameters compared to DIH group.

Conclusion: These findings suggest that HECA can play a protective role against hepatic damages in hypercholesterolemic female rats. According to the results of this study, the prevalence of obesity is not high in female students (3 %), but it is necessary to pay particular attention to information on obesity and girls' sports in universities, so that the prevalence of this disease is not increased.

Keywords: Atorvastatin, *Crataegus aronia*, Hypercholesterolemia, Liver, Rats

Citation: Falahati S, Farokhi F, Najafi Gh, Shalizar Jalali A. Study of the Effects of *Crataegus aronia* fruit hydro-alcoholic extract and atorvastatin on hepatic tissue in hypercholesterolemic female rats J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2018; 26(1): 40-54.

¹Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

²Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

³Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

⁴Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

*Corresponding author: Tel: 09143460715 email: F.farokhi@urmia.ac.ir.