

اثر حفاظتی عصاره هیدرو الکلی اسفناج بر آزمون های عملکردی و تغییرات بافتی کبد در موش های صحرایی نر بالغ تحت تیمار با فلوکستین

مریم هلالی^۱، مهرداد شریعتی^۲

۱- کارشناس ارشد علوم جانوری، گروه بیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.

۲- دانشیار، گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران. mehrdadshariati@hotmail.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: فلوکستین یک مهارکننده انتخابی بازجذب سرتونین (SSRI) است که به عنوان اولین خط دارویی برای درمان افسردگی و بسیاری از ناهنجاری های عصبی-روانی دیگر استفاده می شود. این دارو باعث اختلال در میزان آنزیم های کبد شده و هم چنین باعث آسیب بافتی می گردد. در این مطالعه، اثر حفاظتی عصاره آبی-الکلی اسفناج بر تغییرات تست های عملکردی و بافت شناسی کبد به دنبال مصرف فلوکستین در موش صحرایی نر بالغ مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۵۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار به ۵ گروه ۱۰ تایی به صورت زیر تقسیم شدند: گروه کنترل بدون هیچ تیمار دارویی، گروه شاهد مثبت تیمار شده با ۱۲۰ mg/kg bw فلوکستین، گروه شاهد منفی تیمار شده با ۲۰۰ mg/kg عصاره آبی-الکلی اسفناج و گروه تجربی ۱ و گروه تجربی ۲ که به ترتیب ۱۰۰ mg/kg و ۲۰۰ mg/kg عصاره آبی-الکلی اسفناج و سپس ۱۲۰ mg/kg bw فلوکستین را به مدت ۲۱ روز دریافت کردند. در پایان دوره آزمایش، از نمونه های خونی آماده شده برای اندازه گیری غلظت سرمی آنزیم های ALT، AST، ALP، GGT و هم چنین توتال بیلی روبین، آلبومین و پروتئین تام استفاده شد. در پایان دوره آزمایش در قسمت شکمی حیوان، کبد را به طور کامل جدا کرده، پس از توزین کبد، آن ها را درون ظرف درب-دار حاوی فرمالین ۱۰٪ قرار داده تا زمانی که نمونه ها تثبیت و آماده مقطع گیری شوند.

یافته ها: در مقایسه با گروه های کنترل و شاهد منفی، گروه دریافت کننده فلوکستین به تنهایی باعث افزایش در غلظت سرمی ALT، AST، ALP، GGT، توتال بیلی روبین و کاهش غلظت سرمی آلبومین و پروتئین تام شد. مصرف عصاره اسفناج به تنهایی تغییر قابل ملاحظه ای بر غلظت سرمی ALT، AST، ALP، GGT، توتال بیلی روبین، آلبومین و پروتئین تام در مقایسه با گروه کنترل نداشت در حالی که گروه های دریافت کننده عصاره، مسمومیت کبدی ناشی از فلوکستین را کاهش داد. در مقایسه با گروه های کنترل و شاهد منفی، گروه دریافت کننده فلوکستین به تنهایی باعث آسیب سلولی در بافت کبد شد. مصرف عصاره اسفناج به تنهایی تغییر قابل ملاحظه ای بر روی بافت کبد در مقایسه با گروه کنترل نداشت در حالی که گروه های دریافت کننده عصاره، مسمومیت کبدی ناشی از فلوکستین را کاهش داد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد عصاره اسفناج اثر حفاظتی در برابر عوارض جانبی فلوکستین بر روی کبد دارد و باعث بهبود عملکرد کبد و رفع آسیب های بافتی کبد می شود.

واژه های کلیدی: اسفناج، فلوکستین، آزمون های عملکردی کبد (LFT)، موش صحرایی.

مقدمه

ضد افسردگی عمل می کند که بعد از تجویز خوراکی از جذب بسیار بالایی برخوردار می باشد. این عامل در کبد متابولیزه می گردد و از طریق ادرار دفع می شود. یک داروی بی خطر است که به خوبی تحمل می شود؛ با این حال، اثرات زیان آوری هنگام مصرف دوزهای بالا

فلوکستین یک مهارکننده انتخابی بازجذب سرتونین (SSRI) است که به عنوان اولین خط دارویی برای درمان افسردگی و بسیاری از ناهنجاری های عصبی-روانی دیگر استفاده می شود. فلوکستین یک داروی SSRI حاوی فلورین است که به عنوان یک عامل

مشاهده گردیده است. این گونه اثرات زیان آور شامل موارد زیر می گردند: مشکلات گوارشی (تهوع، استفراغ و اسهال)، مشکلات دستگاه عصبی (بی خوابی و اضطراب)، نارسایی های جنسی، ناهنجاری های دوقطبی، ناهنجاری های تعادلی، ناهنجاری های متابولیکی (hyponatremia) و نارسایی های اندامی (نارسایی کبدی، نارسایی کلیوی). مطالعات تجربی نشان داده اند که فلوکستین سطوح آنتی اکسیدانتی را کاهش می دهد و سطوح تنش های اکسیدانتی را از طریق بالا بردن سطح آنیون سوپراکسید افزایش می دهد و تنش اکسیداتیو را القا می نماید. در تحقیقات صورت گرفته بر روی این دارو تغییراتی مشاهده شد که از اختلالات کم بافتی در سلول های کبدی تا نفوذ سلول های تک هسته ای، خون ریزی، تحلیل در سلول های چربی و تغییرات آپوپتوزی متغیر بودند (۴۵). کبد دارای نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی می باشد. کبد در اعمال حیاتی متنوعی از جمله متابولیسم، ترشح و ذخیره دخالت دارد. علاوه بر این سم زدایی انواع داروها و آگزوبیوتیک ها در کبد روی می دهد. از این رو بیماری های کبدی از مشکلات جدی سلامتی می باشند. بیماری های کبدی ممکن است به هیپاتیت حاد و مزمن، هپاتوسیس و سیروز طبقه بندی شوند. بیماری های کبدی توسط مواد شیمیایی سمی، مصرف الکل، عفونت ها و اختلالات اتو ایمن ایجاد می شوند (۲۸). تحقیقات نشان داده است آنتی اکسیدان ها و ترکیبات فنولی در گیاهان دارویی می توانند از آثار سمی داروها روی کبد جلوگیری و باعث کاهش آزاد شدن آنزیم های کبدی به داخل خون شوند (۲۵). بدن به ترکیبات آنتی اکسیدان نیاز دارد، زیرا آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که مانع فعالیت رادیکال های آزاد شده و یا سبب حذف آن ها می شوند و سلول های بدن را از اثرات مخرب این ترکیبات مصون نگاه می دارند. در حقیقت آنتی

اکسیدان ها ترکیباتی هستند که برای پیش گیری و یا کند نمودن آسیب های ناشی از واکنش های اکسیداسیون در بدن به کار می روند و به عنوان خنثی کننده رادیکال های آزاد عمل نموده و از این رو باعث پیش گیری از آسیب ناشی از این ترکیبات در بدن می شوند (۲۵). اسفناج (spinach) با نام علمی *Spinacia oleracea* سرشار از مواد مغذی ضروری است. عصاره اسفناج حاوی ترکیبات مهم با فعالیت فارماکولوژیکی است (۲۱). ترکیبات پلی فنولی جدا شده از گیاه اسفناج شامل ارتو-کوماریک اسید، پارا-کوماریک اسید و فرولیک اسید می باشد (۳). فلاونوئیدهای متنوعی از این گیاه جدا شده که شامل آپی ژنین، گلوکورونید، فلاون، یاسیدین، کامپفرول، میریستین، متوکسی فلاون، پاتالینین، کورستین و اسپناستین می باشد (۶). کارتنوئیدهای جدا شده از گیاه شامل لوتئین، بتاکاروتن، ویولاگزانتین و نتوگزانتین می باشند (۱۶). ویتامین های اسفناج شامل غلظت بالایی از ویتامین های A, C, E, K و فولیک اسید و آگزالیک اسید می باشند (۳۳). مواد معدنی جدا شده از گیاه شامل کلسیم، مس، آهن، منگنز، فسفر، پتاسیم و روی می باشند (۲۱). اسفناج غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی از جمله بتاکاروتن و لوتئین است. این دو ترکیب خاصیت آنتی اکسیدانی داشته و ضد سرطان هستند. برگ اسفناج شامل اجزاء فعال متعدد مثل فلاونوئیدها می باشد که از آنتی اکسیدان های قوی بوده و اعمال وسیع فارماکولوژیکی و بیوشیمیایی شامل ضد التهابی، ضد آلرژیک، ضد ویروسی، محافظت از سیستم اعصاب مرکزی، ضد سرطان و ضد پیری دارد (۴). اسفناج در پیشگیری از بیماری های عصبی کاربرد دارد (۵). ترکیبات پلی فنولی یافت شده در اسفناج ممکن است که در بیماری آلزایمر موثر باشد (۲۹). فلاونوئیدهای اسفناج قادرند که افراد را از بیماری آلزایمر بر علیه مسمومیت القا شده توسط استرس

در آورده و جهت تهیه عصاره، از روش پرکولاسیون استفاده شد. ۱۰۰ گرم از پودر حاصل درون ظرف دستگاه پرکولاتور ریخته، سپس به پودر موجود هیدروالکل ۷۰ درصد اضافه به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه نگه داری گردید. بعد از گذشت ۷۲ ساعت، شیر دستگاه پرکولاتور را باز کرده و قطره قطره عصاره را جمع آوری نموده و هم زمان از بالا به وسیله قیف جداکننده قطره قطره محلول هیدروالکل اضافه شد تا زمانی که عصاره به دست آمده دیگر رنگی از گیاه نداشته باشد. آن گاه عصاره به دست آمده را به وسیله دستگاه روتاری در حرارت ۴۰-۵۰ درجه سلسیوس تغلیظ کرده، در ادامه برای آن که عصاره کاملاً خشک گردد، به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه دسیکاتور قرار داده شد (۲۲).

تیمار حیوانات

حیوانات به طور تصادفی به ۵ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل هیچ تیمار دارویی دریافت نکرد. گروه شاهد مثبت ۲۱ روز فقط فلوکستین با دوز mg/kg bw ۱۲۰ به صورت گاوآژ (LD50=452mg/kg) دریافت کردند و گروه شاهد منفی ۲۱ روز فقط عصاره هیدروالکلی اسفناج با دوز mg/kg ۲۰۰ به صورت گاوآژ دریافت کردند و گروه تجربی ۱، ۲۱ روز اول mg/kg ۱۰۰ عصاره هیدروالکلی اسفناج و ۲۱ روز دوم mg/kg bw ۱۲۰ فلوکستین به صورت گاوآژ دریافت کردند و گروه تجربی ۲، ۲۱ روز اول mg/kg ۲۰۰ عصاره هیدروالکلی اسفناج به صورت خوراکی و ۲۱ روز دوم mg/kg bw ۱۲۰ فلوکستین دریافت کردند. دوز موثر اسفناج بر اساس مطالعات مقدماتی و دوز فلوکستین بر اساس مطالعات قبل انتخاب گردید (۱۴، ۲۲). در پایان دوره آزمایش، پس از بیهوشی با اتر و باز کردن قفسه سینه، خون گیری از ناحیه بطنی قلب انجام گرفت. نمونه های خونی به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ

اکسیداتیو و یا پپتیدهای بتا-آمیلوئید حفاظت کنند (۳۰). در مطالعه Jain و همکاران در سال ۲۰۱۲ مشخص گردید که دانه های گیاه اسفناج دارای اثرات تصحیح کننده بر مسمومیت کبدی القا شده توسط تتراکلرید کربن می-باشند (۱۵). در مطالعه دیگر که توسط Maximas و همکاران نیز مشخص گردید که گیاه اسفناج دارای فعالیت حفاظت کنندگی کبدی بر مسمومیت القا شده در موش های صحرایی نژاد ویستار می باشند (۲۳). با توجه به این که تاکنون در مورد اثر حفاظتی کبدی اسفناج بر صدمه کبدی القا شده توسط فلوکستین مطالعاتی انجام نشده است و با توجه به وجود ترکیبات متنوع پلی فنولی و فلاونوئیدی موجود در گیاه با خواص آنتی اکسیداتی، در این تحقیق تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه اسفناج بر آزمون های عملکردی و تغییرات بافتی کبد به دنبال مسمومیت ناشی از فلوکستین در موش صحرایی نر بالغ بررسی شد.

مواد و روش ها

حیوانات آزمایشگاهی

حیوانات مورد استفاده در این تحقیق ۵۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی 20 ± 200 گرم و سن بین ۴-۳ ماه بوده است که از مرکز پرورش حیوانات دانشگاه آزاد شیراز تهیه و در همان محل نگه داری شدند. موش ها در قفس هایی از جنس پلی کربنات نگهداری و خاک اره های موجود در کف قفس هر روز یک بار تعویض و قفس ها هفته ای دو بار با آب و مواد ضد عفونی کننده شسته شدند. در تمام مدت آزمایش موش ها طی دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار داشتند و درجه حرارت اتاق 22 ± 23 درجه سانتی گراد بود.

عصاره گیری

اسفناج در فروردین ۹۶ از شیراز جمع آوری گردید و در شرایط مناسب و دور از آفتاب خشک شد. سپس با استفاده از آسیاب برقی برگ های گیاه به صورت پودر

آبگیری به کمک الکل با غلظت های متفاوت (از کم به زیاد) صورت گرفت. مرحله شفاف سازی با قرار دادن بافت ها در دو ظرف حاوی زایلین و در مرحله جایگزینی بافت ها در سه ظرف حاوی پارافین مذاب (۶۵ درجه سانتی گراد) هر کدام یک ساعت قرار داده شدند. در مرحله قالب گیری از قطعات سالو کهارت استفاده گردید. در مرحله مقطع گیری مقاطع بافتی به ضخامت ۴-۵ میکرون بریده شد و در مرحله رنگ آمیزی از رنگ هماتوکسیلین- ائوزین استفاده شد. تمام مطالعات بافتی زیر نظر پاتولوژیست صورت گرفت (۲).

آنالیز آماری

برای تحلیل داده ها از آزمون های آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و متعاقب آن تست Tukey و Duncan توسط نرم افزار SPSS استفاده شد. مرز استنتاج آماری $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

میانگین میزان آنزیم ALT در گروه شاهد مثبت نسبت به گروه کنترل و شاهد منفی افزایش معنی داری نشان می دهد. میزان سرمی آنزیم ALT در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه شاهد مثبت کاهش معنی داری نشان می دهد. میزان سرمی آنزیم ALT در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه شاهد مثبت کاهش معنی داری نشان می دهد. در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه تجربی ۱ کاهش معنی داری در میزان آنزیم ALT مشاهده شد. میزان این آنزیم در گروه های تجربی و تجربی ۲ نسبت به گروه کنترل و شاهد منفی افزایش معنی داری نشان می دهد ($p < 0/05$). میانگین میزان آنزیم AST در گروه شاهد مثبت نسبت به گروه های کنترل و شاهد منفی افزایش معنی داری نشان داد. میزان سرمی آنزیم AST در گروه تجربی ۱ و گروه تجربی ۲ نسبت به گروه شاهد مثبت کاهش معنی داری نشان می دهد. در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه تجربی ۱ کاهش معنی داری در میزان

شدند تا سرم از لخته جدا شود. پس از جدا سازی سرم، نمونه ها تا زمان انجام سنجش های آنزیمی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد منجمد و نگه داری شدند.

بررسی بیوشیمیایی

اندازه گیری ALT به روش، DGKC، AST، به روش IFCC، ALP از روش P-Nitrophenyl phosphate AMP استفاده گردید که بر اساس آن ALP روی سوپسترای بی رنگ ۴ نیتروفنیل فسفات اثر کرده آن را به ۴ نیتروفنل زرد رنگ تبدیل می نماید. تغییرات جذب نوری با فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز متناسب است.

برای اندازه گیری پروتئین تام از روش biuret reaction end point استفاده گردید که در این آزمایش پروتئین هادر محیط قلیایی با یون های مس و تارتارات تشکیل رنگ لاجوردی را سبب می شوند و شدت رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار توتال پروتئین در نمونه می باشد. برای اندازه گیری آلبومین از روش Bromocresol Green استفاده گردید که در این آزمایش آلبومین با برم کرزول یک کمپلکس رنگی ایجاد می کند. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار آلبومین در نمونه می باشد. برای اندازه گیری بیلی روبین معرف دی آزو (مخلوط نیتريت سدیم و اسید سولفانلیک) با بیلی روبین واکنش داده و ایجاد رنگ آزو را می کند که در pH قلیایی قرمز رنگ است. بیلی روبین مستقیم پس از ایجاد به رنگ صورتی در می آید ولی بیلی روبین تام با افزودن محلول تسريع کننده و در pH قلیایی سبزرنگ می گردد (۲۴، ۱). آنزیم های کبدی با استفاده از کیت های اختصاصی شرکت پارس آزمون ایران و به وسیله دستگاه اتوآنالایزر تمام اتوماتیک (Technico RA-1000) ساخت آمریکا اندازه گیری شدند.

آزمایش های بافت شناسی

پس از کالبدگشایی حیوانات کبد آن ها برداشته و در فرمالین بافر خنثی ۱۰ درصد تثبیت گردیدند. مرحله

داد. میزان سرمی پروتئین تام در گروه های تجربی ۱ و تجربی ۲ نسبت به گروه شاهد مثبت افزایش معنی داری نشان می دهد. در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه تجربی ۱ افزایش معنی داری در میزان سرمی پروتئین تام مشاهده شد. میزان پروتئین تام در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه های کنترل و شاهد منفی کاهش معنی داری نشان می دهد ($p < 0/05$). میانگین میزان توتال بیلی روبین در گروه شاهد مثبت نسبت به گروه های کنترل و شاهد منفی افزایش معنی داری نشان داد. میزان توتال بیلی روبین در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه شاهد مثبت کاهش معنی داری نشان می دهد. در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه تجربی ۱ در میزان توتال بیلی روبین کاهش معنی داری مشاهده شد. میانگین غلظت سرمی توتال بیلی روبین در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه های کنترل و شاهد منفی افزایش معنی داری نشان می دهد ($p < 0/05$).

یافته های بافت شناسی

اسلایدهای میکروسکوپی از کبد تمام گروه های کنترل، شاهد مثبت، شاهد منفی، تجربی ۱ و تجربی ۲ تهیه شده است. نتایج حاصل از بررسی مطالعات بافت شناسی کبد نشان داد بافت کبد در گروه های کنترل و شاهد منفی کاملاً طبیعی و فاقد آسیب سلولی می باشد. این گروه ها دارای نظم سلولی بوده و حفظ حالت شعاعی و طبیعی بودن سلول های کبد (یک هسته ای و دو هسته ای) و وجود هستک و ورید مرکزی از ویژگی های مشخص آن است (اشکال ۱ و ۲). در گروه شاهد مثبت در مقایسه با گروه های کنترل و شاهد منفی آسیب سلولی مشاهده شد. آسیب سلولی به صورت تورم سیتوپلاسم، تورم هسته، ایجاد واکوئل و نکروز ملاحظه گردید (شکل ۳). در گروه تجربی ۱ در مقایسه با گروه های کنترل و شاهد منفی آسیب سلولی مشاهده شد آسیب سلولی به صورت تورم سیتوپلاسم، تورم هسته، ایجاد واکوئل و نکروز ملاحظه گردید ولی آسیب ها در مقایسه با گروه شاهد

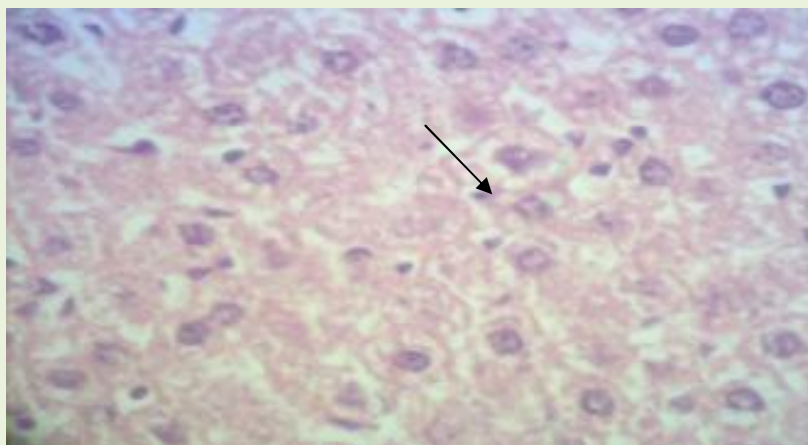
آنزیم AST مشاهده شد. میزان این آنزیم در گروه های تجربی ۱ و تجربی ۲ نسبت به گروه های کنترل و شاهد منفی افزایش معنی داری نشان می دهد ($p < 0/05$). میانگین میزان آنزیم ALP در گروه شاهد مثبت نسبت به گروه های کنترل و شاهد منفی افزایش معنی داری نشان داد. میزان سرمی آنزیم ALP در گروه های تجربی ۱ و تجربی ۲ نسبت به گروه شاهد مثبت کاهش معنی داری نشان می دهد. در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه تجربی ۱ کاهش معنی داری در میزان آنزیم ALP مشاهده شد. میزان این آنزیم در گروه های تجربی ۱ و تجربی ۲ نسبت به گروه های کنترل و شاهد منفی افزایش معنی داری نشان می دهد ($p < 0/05$). میانگین میزان آنزیم GGT در گروه شاهد مثبت نسبت به گروه های کنترل و شاهد منفی افزایش معنی داری نشان می دهد. میزان سرمی آنزیم GGT در گروه های تجربی ۱ و تجربی ۲ نسبت به گروه شاهد مثبت کاهش معنی داری نشان داد. میزان این آنزیم در گروه های تجربی ۱ و تجربی ۲ نسبت به گروه شاهد مثبت کاهش معنی داری نشان می دهد ($p < 0/05$). میانگین میزان آلومین در گروه شاهد مثبت نسبت به گروه های کنترل و شاهد منفی کاهش معنی داری نشان داد. میانگین غلظت سرمی آلومین در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه شاهد مثبت افزایش معنی داری نشان می دهد. میزان آلومین در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه شاهد مثبت افزایش معنی داری نشان داد. میانگین غلظت سرمی آلومین در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه های کنترل و شاهد منفی کاهش معنی داری نشان می دهد. میزان آلومین در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه شاهد مثبت کاهش معنی داری نشان داد. در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه تجربی ۱ در میزان آلومین افزایش معنی داری نشان می دهد ($p < 0/05$). میانگین میزان پروتئین تام در گروه شاهد مثبت نسبت به گروه های کنترل و شاهد منفی کاهش معنی داری نشان

مثبت شدت کمتری دارند (شکل ۴). در گروه تجربی ۲ در مقایسه با گروه های کنترل و شاهد منفی نکروز حقیقی دیده می شود و تقریباً مانند گروه کنترل و شاهد منفی به نظر می رسد ولی در مقایسه با گروه شاهد مثبت اثری از نکروز قابل مشاهده نیست (شکل ۵). در گروه های تجربی ۱ و ۲ به تدریج از میزان تخریب بافتی کاسته می- شود و در کل می توان گفت میزان تخریب بافت کبد، متناسب با دوز عصاره کاهش می یابد.

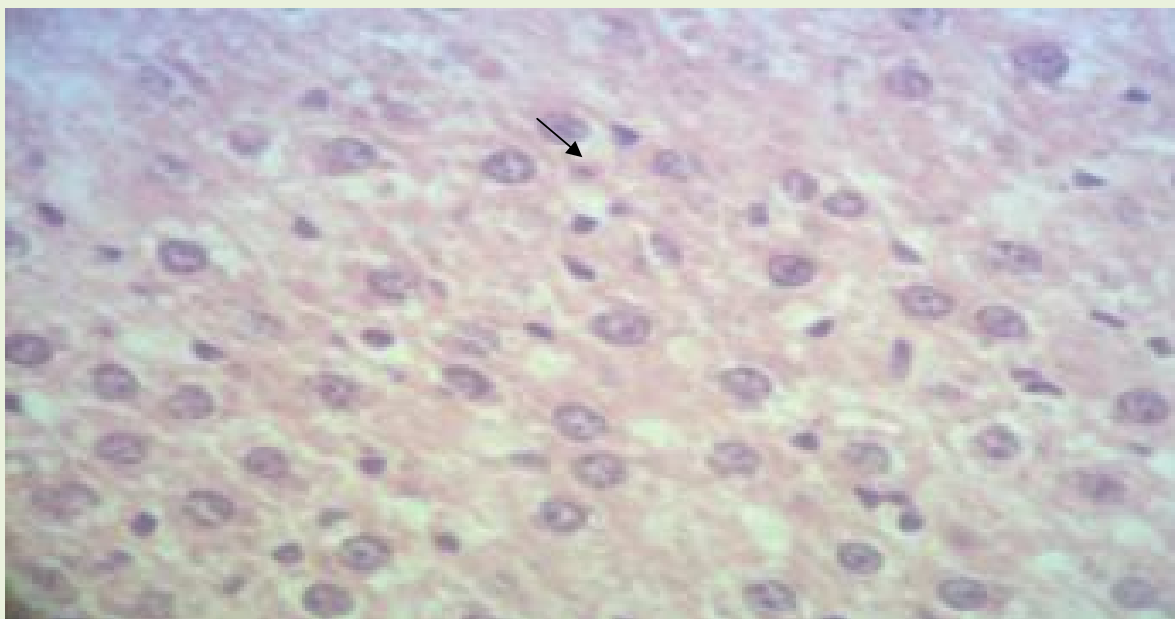
جدول ۱- مقایسه اثر عصاره هیدروالکی اسفناج بر میانگین \pm انحراف معیار غلظت سرمی ALT (آلانین ترانسفراز)، AST (آسپارات آمینوترانسفراز)، ALP (آلتالین فسفاتاز)، GGT (گاما گلوتامیل ترانس پپتیداز)، آلبومین، پروتئین تام و توتال بیلی رویین بین گروه های تجربی، کنترل و شاهد موش های صحرایی نر بالغ تحت تیمار با فلوکستین

گروه های آزمایش	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)	آلبومین (mg/dl)	پروتئین تام (mg/dl)	توتال بیلی رویین (mg/dl)
کنترل	۸۰/۶۲ \pm ۱/۳۱	۲۴۵/۱۲ \pm ۴/۰۱	۳۳۰/۶۰ \pm ۴/۰۴	۲/۴۳ \pm ۰/۸۴	۵/۳۹ \pm ۱/۲۳	۸/۱۳ \pm ۰/۹۸	۰/۲۳ \pm ۰/۰۳۶
شاهد منفی	۸۰/۴۲ \pm ۱/۱۸	۲۳۸/۵۲ \pm ۴/۶۱	۳۲۹/۲۰ \pm ۳/۳۴	۲/۴۴ \pm ۰/۷۷	۵/۴۹ \pm ۱/۰۲	۸/۰۴ \pm ۱/۳۵	۰/۲۱ \pm ۰/۰۲۷
شاهد مثبت	۹۴/۷۰ \pm ۱/۰۱*	۳۲۷/۹۷ \pm ۷/۴۸*	۳۸۳/۱۲ \pm ۳/۸۷*	۳/۶۵ \pm ۱/۱۹*	۴/۰۲ \pm ۰/۹۰*	۶/۴۲ \pm ۱/۲۲*	۰/۵۷ \pm ۰/۰۴۹*
تجربی ۱	۹۰/۲۷ \pm ۶/۶۵*	۲۹۸/۹۱ \pm ۵/۸۱*	۳۶۶/۹۰ \pm ۲/۴۳*	۳/۲۱ \pm ۰/۵۲*	۴/۴۹ \pm ۱/۲۷*	۷/۲۰ \pm ۱/۴۶*	۰/۴۵ \pm ۰/۰۳۴*
تجربی ۲	۸۵/۴۰ \pm ۶/۶۳*	۲۷۰/۱۹ \pm ۵/۷۹*	۳۵۴/۲۰ \pm ۲/۷۸*	۲/۹۴ \pm ۰/۸۵*	۴/۹۶ \pm ۰/۷۴*	۷/۸۱ \pm ۰/۷۳*	۰/۳۰ \pm ۰/۰۳۹*

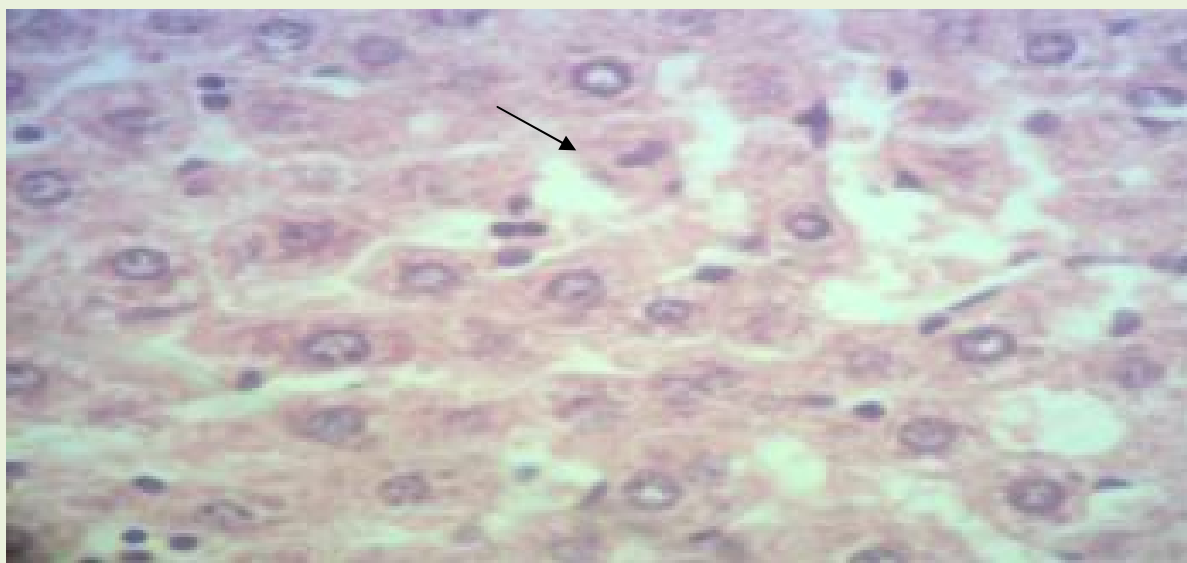
* اختلاف معنی دار با گروه های کنترل و شاهد منفی ($P < ۰/۰۵$)، گروه کنترل: ۲۱ روز فقط آب و غذای نامحدود، گروه شاهد مثبت: ۲۱ روز فقط فلوکستین با دوز ۱۲۰ mg/kg bw به طور خوراکی ($LD50 = ۴۵۲ \text{ mg/kg}$)، گروه شاهد منفی: ۲۱ روز فقط عصاره هیدروالکی اسفناج با دوز ۲۰۰ mg/kg به طور خوراکی دریافت کردند، گروه تجربی ۱: ۲۱ روز اول ۱۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکی اسفناج به طور خوراکی و ۲۱ روز دوم ۱۲۰ mg/kg bw فلوکستین دریافت کردند، گروه تجربی ۲: ۲۱ روز اول ۲۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکی اسفناج به طور خوراکی و ۲۱ روز دوم ۱۲۰ mg/kg bw فلوکستین دریافت کردند.



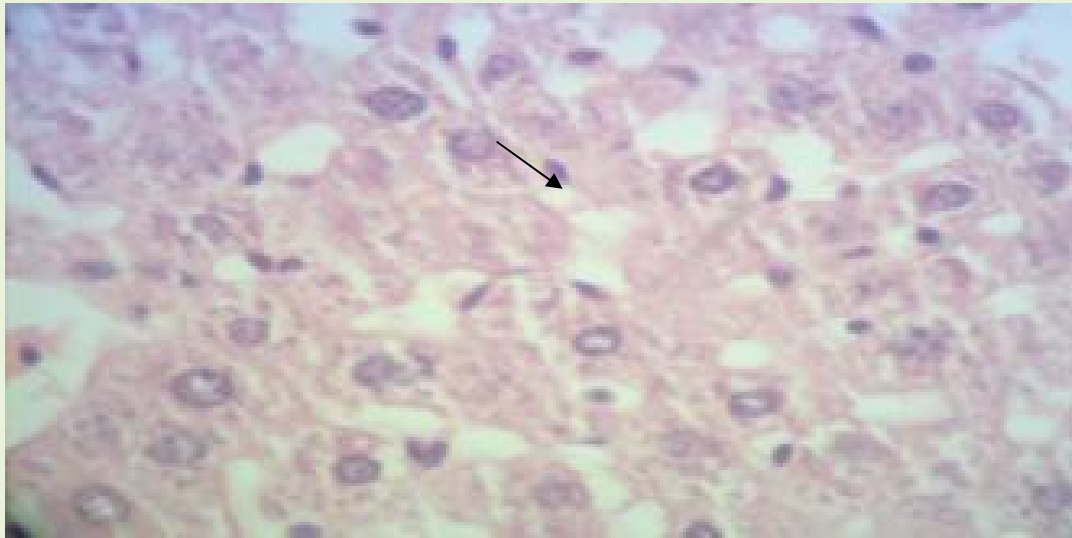
شکل ۱- اثر عصاره هیدروالکی اسفناج بر بافت کبد در موش های صحرایی نر بالغ تحت تیمار با فلوکستین
فتومیکروگرافی از بافت کبد موش صحرایی در گروه کنترل. در این گروه بافت کبد کاملاً طبیعی و فاقد آسیب سلولی به نظر می رسد. (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ۴۰ \times)



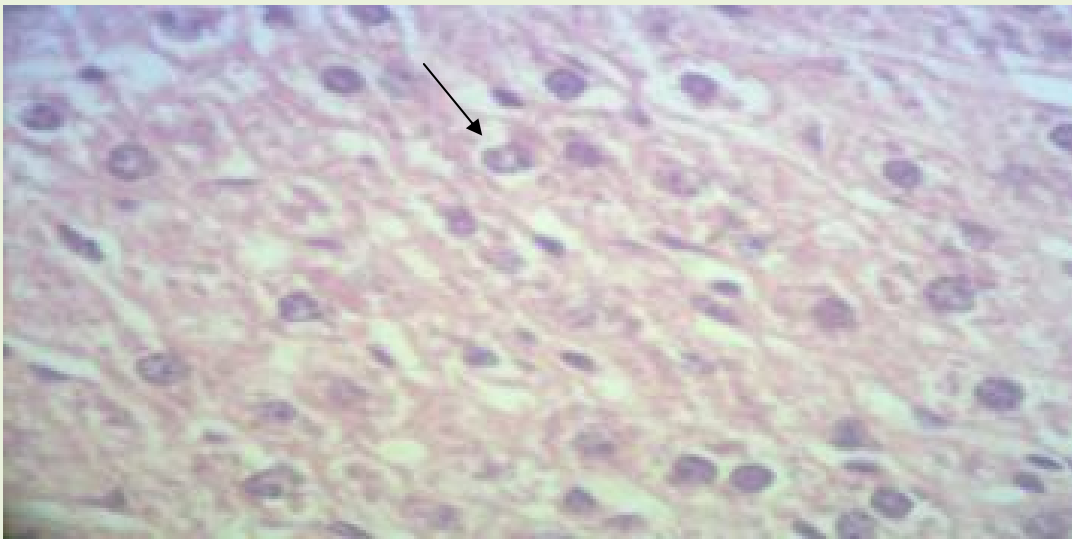
شکل ۲- اثر عصاره هیدرو الکلی اسفناج بر بافت کبد در موش های صحرائی نر بالغ تحت تیمار با فلوکستین فتومیکروگرافی از بافت کبد موش صحرائی در گروه شاهد منفی. در این گروه تغییر خاصی از نظر بافتی نسبت به گروه کنترل دیده نمی شود و بافت کبد کاملاً طبیعی و فاقد آسیب سلولی به نظر می رسد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۴۰ آ)



شکل ۳- اثر عصاره هیدرو الکلی اسفناج بر بافت کبد در موش های صحرائی نر بالغ تحت تیمار با فلوکستین فتومیکروگرافی از بافت کبد موش صحرائی در گروه شاهد مثبت. در این گروه در مقایسه با گروه های کنترل و شاهد منفی آسیب سلولی مشاهده شد. آسیب سلولی به صورت تورم سیتوپلاسم، تورم هسته، ایجاد واکوئل و نکروز ملاحظه گردید (رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۴۰ آ)



شکل ۴- اثر عصاره هیدرو الکلی اسفناج بر بافت کبد در موش های صحرائی نر بالغ تحت تیمار با فلوکستین فتومیکروگرافی از بافت کبد موش صحرائی در گروه تجربی ۱. در این گروه در مقایسه با گروه های کنترل و شاهد منفی آسیب سلولی مشاهده شد آسیب سلولی به صورت تورم سیتوپلاسم، تورم هسته، ایجاد واکوئل و نکروز ملاحظه گردید ولی آسیب ها در مقایسه با گروه شاهد مثبت شدت کمتری دارند (رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۴۰ آ)



شکل ۵- اثر عصاره هیدرو الکلی اسفناج بر بافت کبد در موش های صحرائی نر بالغ تحت تیمار با فلوکستین فتومیکروگرافی از بافت کبد موش صحرائی در گروه تجربی ۲. در این گروه در مقایسه با گروه های کنترل و شاهد منفی نکروز خفیفی دیده می شود و تقریباً مانند گروه کنترل و شاهد منفی به نظر می رسد ولی در مقایسه با گروه شاهد مثبت اثری از نکروز قابل مشاهده نیست (رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۴۰ آ)

صحرائی نر بالغ مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. مقایسه نتایج به دست آمده نشان داد فعالیت آنزیم های ALT، AST، ALP، GGT و هم چنین غلظت سرمی توتال بیلی روبین در گروه دریافت کننده فلوکستین به تنهایی افزایش معنی داری نسبت به گروه های کنترل و شاهد منفی نشان می دهد مقایسه میزان آنزیم

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق، اثر حفاظتی عصاره هیدرو الکلی اسفناج با مقادیر ۲۰۰ و ۱۰۰ mg/kg به مدت ۲۱ روز بر میزان فاکتورهای کبدی به دنبال مسمومیت مزمن با فلوکستین به مقدار ۱۲۰ mg/kg (به مدت ۲۱ روز) در موش

القاشده توسط کلرید جیوه را از طریق مهار پیام رسانی Nfr2/NFK-B/P53 را در موش های صحرایی تصحیح می کند (۴۶). علاوه بر این لوتولین و کورستین ۳-B-d-گلوکوزید دارای اثرات حفاظتی بر مسمومیت کبدی القاشده توسط استامینوفن می باشد (۳۲). تحقیقات نشان داده اند که لوتولین می تواند دارای اثرات حفاظتی بر مسمومیت کبدی القاشده توسط تراکلرید کربن باشد. تراکلرید کربن باعث افزایش بیان heat shock protein gp96 در کبد موش می گردد که پیش درمانی با لوتولین این تغییرات را اصلاح می کند. درمان موش ها با لوتولین باعث کاهش معنی داری در فعالیت میلو پراکسیداز یک عامل دلالت کننده التهاب سلولی می-گردد (۷). هم چنین لوتولین اثر حفاظتی بر مسمومیت کبدی القا شده توسط استامینوفن و تحریک ظرفیت آنتی اکسیدانتی دارد (۸). مطالعات نشان داده اند که لوتولین از طریق تنظیم مسیر پیام رسانی Sirt/Nrf2/TNF-a نقش محوری در تصحیح مسمومیت کبدی القا شده توسط کلرید جیوه دارد. لوتولین دارای اثرات ضدالتهابی و ضد سرطانی و آنتی اکسیدانتی دارد. نتایج نشان داد که لوتولین تولید گونه اکسیژن واکنشی (ROS) و حیات هپاتوسیت ها را در شرایط invitro و استرس های اکسیداتیو و مرگ سلولی برنامه ریزی شده را تنظیم می-کند. بنابراین لوتولین تغییرات در سطوح پروتئین های مرتبط با مرگ سلولی برنامه ریزی شده و دخیل در ایجاد التهاب از جمله NFK-B, TNF-a, Sirt1, NFK- B, mTOR, Bax, Bcl-2 را معکوس کرده و فعالیت p38MAPK را مهار کرد. لوتولین سیستم دفاعی آنتی اکسیدانتی پایه گذاری شده بر اساس Keap1, Nrf2 را تحریک می کند (۴۳). علاوه بر این لوتولین دارای اثرات ضدالتهابی و آنتی اکسیداتیو و ضد استرس شبکه آندوپلاسمی در پاسخ به صدمه کبدی القا شده توسط استامینوفن می باشد (۳۵). تحقیقات نشان داده اند که

های ALT, AST, ALP, GGT و غلظت توتال بیلی روبین در گروه دریافت کننده فلوکستین به همراه عصاره هیدروالکلی اسفناج به مقدار ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg نسبت به گروه دریافت کننده فلوکستین به تنهایی کاهش معنی داری را نشان می دهد و به سطح گروه کنترل نزدیک شده است (جدول ۱). مقایسه نتایج به دست آمده نشان داد غلظت سرمی آلبومین و پروتئین تام در گروه دریافت کننده فلوکستین به تنهایی کاهش معنی داری نسبت به گروه های کنترل و شاهد منفی نشان می دهد. مقایسه غلظت سرمی آلبومین و پروتئین تام در گروه دریافت کننده فلوکستین به همراه عصاره هیدروالکلی اسفناج به مقدار ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg نسبت به گروه دریافت کننده فلوکستین به تنهایی افزایش معنی داری را نشان می دهد و به سطح گروه کنترل نزدیک شده است (جدول ۱). علاوه بر این نتایج مطالعات بافت شناسی کبد نیز نشان داد که در گروه های تجربی دریافت کننده اسفناج از نکرز سلولی القاشده توسط فلوکستین کاسته شد که این اثرات وابسته به دوز بود. که این نتایج بافت شناسی کبد با نتایج به دست آمده با مطالعات بیوشیمیایی مطابقت دارد و اثرات حفاظتی کبدی اسفناج را به اثبات می رساند. از جمله ترکیبات موجود در اسفناج آسکوربیک اسید می باشد. مطالعات نشان داده اند که آسکوربیک اسید عملکرد میتوکندریایی کبد را در موش های صحرایی درمان شده با آرسنیک بهبود می بخشد که به موجب آن می تواند از صدمات کبدی واسطه شده توسط ROS بر کبد پیشگیری کند. آسکوربیک اسید می تواند DNA را از حملات ROS تولید شده توسط آرسنیک حفاظت کند که به موجب این وقایع فعالیت ATPase طبیعی می گردد و فعالیت سوکسینیک دهیدروژناز به حالت طبیعی برمی گردد (۳۴). از جمله ترکیبات موجود در اسفناج لوتولین می باشد. مطالعات نشان داده اند که لوتولین رژیم غذایی صدمه کبدی

می کند. مطالعات نشان داده اند که کورستین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و گلوکوتایون رودکتاز و محتوی گلوکوتایون را افزایش داد (۴۴). هم چنین کورستین از صدمه کبدی ناشی از دیابت نوع ۱ از طریق مهار سیتوکروم CYP2E1 جلوگیری می کند (۲۰). تحقیقات نشان داده که نانوذره کورستین دارای اثرات محافظت کنندگی کبدی بر علیه مسمومیت سلولی آفلاتوکسین B1 می باشد که این عمل را از طریق خنثی کردن رادیکال های آزاد اعمال می کند (۹).

در مطالعه Kemelo و همکاران در سال ۲۰۱۶ مشخص گردید که کورستین و SRT1720 دارای اثرات حفاظت کنندگی سلولی بر صدمه کبدی القا شده توسط D-گالاکتوز آمین و لیپو پلی ساکارید می باشد (۱۸). مطالعات نشان داده اند که کورستین صدمه کبدی القاشده توسط تتراکلرید کربن را از طریق تصحیح صدمات استرس های اکسیداتیو در شرایط *in vivo* بهبود می بخشد. این اثر حفاظتی ممکن است که به وسیله ظرفیت آنتی اکسیدانته القا شده توسط کورستین ایجاد گردد. کورستین سطوح افزایش یافته AST, ALT بعد از دریافت تتراکلرید کربن را کاهش می دهد (۴۷). علاوه بر این کورستین دارای اثرات حفاظتی بر علیه صدمه کبدی القا شده توسط D-گالاکتوز آمین و لیپو پلی ساکارید در موش از طریق مهار مسیر پیام رسانی MAPK, IKK/NF-KB می باشد (۲۷). تحقیقات نشان داده اند که کورستین، استرس های اکسیداتیو القاء شده توسط لیندان (گاما بنزن هگزاکلراید) را در کلیه و کبد در موش های صحرائی نژاد ویستار اصلاح می کند. مصرف کورستین منجر به کاهش سطوح آنزیم های کبدی و بهبود علائم نارسایی کلیوی می گردد (۲۶). هم چنین کورستین صدمه کبدی القا شده توسط گلیکوزیدهای *Tripterygium* را احتمالاً از طریق کاهش استرس های اکسیداتیو و خواص ضدالتهابی اش بهبود می بخشد (۳۸).

لوتولین دارای اثرات تصحیح کننده بر استئاتوز و صدمه کبدی القا شده توسط اتانول می باشد (۱۹). هم چنین لوتولین دارای اثرات حفاظتی بر علیه صدمه القا شده در سلول های کبدی L02 از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و مهار مرگ سلولی برنامه ریزی شده می باشد (۱۳). از جمله ترکیبات موجود در گیاه اسفناج کورستین می باشد. مطالعات نشان داده اند که کورستین صدمه کبدی القا شده توسط تریپتولید را به وسیله تصحیح تعادل Th17/Treg از طریق مسیر TLR4-MYD88-NFK-B تصحیح می کند. کورستین بیان mRNA و پروتئین گیرنده ۴ شبه (TLR-4)/Toll و فاکتور نکروز کاپا B و سیتوکین های مرتبط با التهاب IL-6 و IL-17 را مهار کرده ولی سطوح ایمونوگلوبین سلولی و پروتئین ۳ حاوی دوماین موسین (Tim-3) را به طور تحریکی افزایش می دهد (۴۱). علاوه بر این کورستین در پیشگیری از صدمه کبدی القاشده توسط دیفینوکونازول موثر می باشد. هم القایی کورستین باعث بهبود پارامترهای بیوشیمیایی و بافتی شده و سطح MDA و تولید پروتئین های اکسیدانته را کاهش داده و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانته و سطح ویتامین C را افزایش می دهد و می تواند از این طریق اثرات حفاظتی خود را اعمال کند (۱۷). تحقیقات نشان داده اند که مکمل کورستین ممکن است که مسمومیت میتوکندریایی کبدی القا شده توسط سیسپلاتین را در طی شیمی درمانی کاهش دهد و یک کاندیدای دفاعی برای استرس های اکسیداتیو القا شده و عامل ضد سرطان باشد. کورستین فعالیت آنتی اکسیدانته های آنزیمی و آنزیم های کمپلکس میتوکندریایی را تعدیل می کند. علاوه بر این کورستین تغییرات در سطوح پراکسیداسیون لیپید و محتوی گلوکوتایون را معکوس می کند (۴۰). هم چنین القا آنتی اکسیدانته کورستین از استرس اکسیداتیو القاشده توسط نیکوتین در سلول های کبدی HePG2 پیشگیری

کاهش استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپید را نشان دادند (۳۹). از جمله ترکیبات موجود در گیاه اسفناج میریستین می باشد. در مطالعه Geng و همکاران در سال ۲۰۱۷ مشخص گردید که میریستین فعالیت سلول های ستاره ای شکل کبدی را مهار می کند و فیروز کبدی القا شده توسط تتراکلرید کربن را در موش ها تصحیح می کند و ممکن است به عنوان یک عامل درمانی قوی در درمان فیروز کبدی عمل کند. میریستین اکتین ماهیچه ای صاف آلفا و رسوب کلژن ۱ را کاهش داده و فسفوریلاسیون smad2 و پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوژن و Akt را در موش های درمان شده با تتراکلرید کربن بلوکه کرد (۱۰). تحقیقات نشان داده اند که میریستین ممکن است یک عامل درمانی قوی برای درمان استئاتوزیس کبدی القا شده با رژیم غذایی با چربی بالا از طریق فعالیت مسیر پیام رسانی PPAR و مسیری Nrf2 باشد (۴۲). علاوه بر این میریستین کاندیدای درمانی بر علیه کارسینومای سلول های سرطانی می باشد. میریستین به طور انتخابی مرگ سلولی برنامه ریزی شده در هپاتوسیت های سرطانی را به وسیله هدف قرار دادن میتوکندریشان القا می کند. میریستین افزایش قابل ملاحظه سطح گونه اکسیژن واکنشی (ROS) و تورم میتوکندریایی و رهسازی سیتوکروم C را در سلول های سرطانی القا می کند ولی در هپاتوسیت های طبیعی القا نمی کند (۳۱). نتایج این تحقیق نشان داد مصرف فلوکستین موجب افزایش آنزیم های کبدی از جمله ALT، AST، ALP، GGT می گردد که با تحقیقات گذشته هم خوانی دارد (۱۵، ۲۳). از آن جایی که این آنزیم ها درون سلولی هستند و در مواردی که آسیب سلولی رخ دهد به جریان خون وارد می شوند، چنین نتیجه گیری می شود که فلوکستین موجب آسیب سلول-های کبدی شده است. در تحقیق حاضر موش هایی که علاوه بر فلوکستین عصاره آبی-الکلی اسفناج دریافت

از جمله ترکیبات موجود در اسفناج آپی ژنین می باشد. در مطالعه Zhou و همکاران در سال ۲۰۱۷ مشخص گردید که آپی ژنین صدمه کبدی القا شده توسط D-گالاکتوز آمین و لیپو پلی ساکارید را از طریق تنظیم افزایشی بیان گیرنده فعال شده توسط تکثیر کننده پرو اکسی زوم (PPAR&) و فاکتور ۲ مرتبط با اریترئید ۲ فاکتور هسته ای کبد (Nrf-2) در موش مهار می کند. پیش درمانی با آپی ژنین سطوح بیان پروتئین PPAR و Nrf-2 و هم چنین فعالیت گلوکوتایون رودکتاز و گلوکوتایون-s-ترانسفراز و کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را افزایش داد (۴۸). مطالعات نشان داده اند که آپی ژنین دارای اثرات حفاظتی بر علیه صدمه کبدی القا شده توسط الکل در موش به وسیله تنظیم استرس اکسیداتیو واسطه شده توسط CYP2E1 و بیان ژن لیپولیتیک واسطه شده توسط PPARa می باشد (۳۷). هم چنین آپی ژنین فرآیندهای مرگ سلولی برنامه ریزی شده را مهار کرده و صدمه ایسکمی-رپرفیوژن کبدی را تصحیح می نماید (۳۶). از جمله ترکیبات موجود در اسفناج کامپفرول می باشد. در مطالعه Guo و همکاران در سال ۲۰۱۷ مشخص گردید که کامپفرول مرگ سلولی سلول های کارسینومای هپاتوسلولار را از طریق مسیر پیام رسانی اتوفاژی-CHO-استرس شبکه آندوپلاسمی القا می کند (۱۱). علاوه بر این کامپفرول مرگ سلولی برنامه ریزی را در سلول های کبدی HePG از طریق فعالیت مسیرهای استرس شبکه آندوپلاسمی القا می کند. مرگ سلولی برنامه ریزی شده القاشده توسط کامپفرول ممکن است از طریق مسیرهای استرس شبکه آندوپلاسمی عمل کند (۱۲). مطالعات نشان داده اند که کامپفرول دارای اثر حفاظت کنندگی کبدی بر علیه صدمه کبدی القا شده توسط الکل از طریق تصحیح فعالیت و بیان سیتوکروم CYP2E1 و تحریک سیستم آنتی اکسیدانتی می باشد. موش های درمان شده با الکل دوزهای مختلف کامپفرول

غشایی در سلول ها موجب حفاظت از سلول های کبدی در مقابل استرس اکسیداتیو می شود و از آزاد شدن آنزیم های کبدی به سرم جلوگیری می کند. نتایج این تحقیق نشان داد عصاره آبی-الکلی اسفناج، کبد را در برابر مسمومیت کبدی ناشی از مصرف فلوکستین محافظت می کند و اثرات آن را کاهش می دهد. احتمالاً اثرات حفاظتی این گیاه به ترکیبات آنتی اکسیدانی و فنولی آن وابسته است. هر چند مطالعات بیشتری در این زمینه لازم است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین و اساتید محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز که موجبات انجام این تحقیق را فراهم نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

کرده اند، میزان آنزیم های ALT، AST، ALP، GGT و غلظت سرمی توتال بیلی روبین در مقایسه با گروه مصرف کننده فلوکستین کاهش نشان دادند، هم چنین مصرف عصاره با مقادیر ۲۰۰mg/kg و ۱۰۰ به همراه فلوکستین باعث برگشت سطح کاهش یافته پروتئین تام و آلبومین به سطح طبیعی (کنترل و شاهد منفی) شد. نزدیک شدن میزان فاکتور های فوق به حالت طبیعی توسط عصاره آبی-الکلی اسفناج، دلیل واضحی بر اثرات حفاظتی عصاره این گیاه است که احتمال دارد علت آن خاصیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موثر اسفناج از جمله آسکوربیک اسید، کورستین، آپی ژنین، لوتئولین، میریستین و کامپفرول که با مهار رادیکال های آزاد، کاهش پراکسیداسیون لیپید، افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و ایجاد ثبات

منابع

1. Atef, M. (2012). Attenuating effect of Ginkgo biloba Leaves extract on liver fibrosis induced by thioacetamide in mice. J Biomed Biotechnol, 2012;761450.
2. Bogin, J.F. (2009). Animal anatomy and physiology, 2 ed. reston publishing CO, Inc, Reston, Virginia, pp;154-156
3. Bunea, A., Andjelkovic, M., Socaciu, C., Bobis, O., Neacsu, M. (2008). Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). Food Chem, 108; 649-56.
4. Chenxi, Xu., Chen, J., Honghe, S., Xiaofeng, C., Xiaoli, W., Chenhui, G. (2017). Draft genome of spinach and transcriptome diversity of 120 *Spinacia* accessions. Nature Communications, 8(10);1038.
5. Das, S., Guha, D. (2008). CNS depressive role of aqueous extract of *Spinacia oleracea* L. leaves in adult male albino rat. Nature, 46;185-90.
6. Dehkharghanian, M., Adenier, H., Vijayalakshmi, MA. (2010). Study of flavonoids in aqueous spinach extract using positive electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. Food Chem, 121; 863-70.
7. Domitrovi, R., Jakovac, H., Tomac, J., Sain, I. (2009). Liver fibrosis in mice induced by carbon tetrachloride and its reversion by luteolin. Toxicology and Applied Pharmacology, 241; 311-321.
8. Domitrovi, R., Jakovac, H., Grebi, D., Milin, C., Radosevi-Stasi, B. (2008). Dose- and time-dependent effects of luteolin on liver metallothioneins and metals in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. Biol Trace Elem Res, 126(1-3);176-85.
9. Eftekhari, A., Ahmadian, E., Panahi-Azar, V., Hosseini, H., Tabibiazar, M., Maleki Dizaj, S. (2017). Hepatoprotective and free radical scavenging actions of quercetin nanoparticles on aflatoxin B1-induced liver damage: in vitro/in vivo studies. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 1-10.
10. Geng, Y., Sun, Q., Li, W., Lu, ZM., Xu, HY., Shi, JS. (2017). The common dietary flavonoid myricetin attenuates liver fibrosis in carbon tetrachloride treated mice. Mol Nutr Food Res, 61(4); doi: 10.1002/mnfr.201600392.
11. Guo, H., Lin, W., Zhang, X., Zhang, X., Hu, Z., Li, L. (2017). Kaempferol induces hepatocellular carcinoma cell death via endoplasmic reticulum stress-CHOP-autophagy signaling pathway. Oncotarget, 8(47);82207-82216.
12. Guo, H., Ren, F., Zhang, L., Zhang, X., Yang, R., Xie, B. (2016). Kaempferol induces apoptosis in HepG2 cells via activation of the endoplasmic reticulum stress pathway. Mol Med

Rep, 13(3); 2791-800.

13.He, LZ., Meng, YK., Han, YZ., Zhang, ZF., Yin, P., Sang, XX. (2016). Protective effects of luteolin against acetaminophen-induced damage in L02 liver cells. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 41(22); 4234-4239.

14.Inkielewicz-Stepniak, I. (2011). Impact of fluoxetine on liver damage in rats. *Pharmacological Reports*, 63; 441-447.

15.Jain, NK., Singhai, AK. (2012). Ameliorative effects of *Spinacia oleracea* L. seeds on carbon tetrachloride(CCL4)-Induced hepatotoxicity: In Vitro and in vivo studies. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2; S232-7.

16.Jaswir, I., Noviendri, D., Hasrini, RF., Octavianti, F. (2011). Carotinoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *J Med Plants Res*, 5;7119-31.

17.Kasmi, S., Bkhairia, I., Harrabi, B., Mnif, H., Marrakchi, R., Ghazzi, H. (2018). Modulatory effects of quercetin on liver histopathological, biochemical, hematological, oxidative stress and DNA alterations in rats exposed to graded doses of score 250. *Toxicol Mech Methods*, 28(1);12-22.

18.Kemelo, MK., Horinek, A., Canová, NK., Farghali, H. (2016). Comparative effects of quercetin and SRT1720 against D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity in rats: biochemical and molecular biological investigations. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20(2); 363-71.

19.Liu, G., Zhang, Y., Liu, C., Xu, D., Zhang, R., Cheng, Y. (2014). Luteolin alleviates alcoholic liver disease induced by chronic and binge ethanol feeding in mice. *J Nutr*, 144(7);1009-15.

20.Maksymchuk, O., Shysh, A., Rosohatska, I., Chashchyn, M. (2017). Quercetin prevents type 1 diabetic liver damage through inhibition of CYP2E1. *Pharmacol Rep*, 69(6); 1386-1392.

21.Mane PC, Kadam DD, Chaudhari RD, Varpe KA, Sarogade SD, Thorat TV et al. (2015). Phytochemical investigations of *Spinacia oleracea*: An important leafy vegetable used in Indian diet. *Cent Eur J Exp Biol*, 4; 1-4.

22.Matboo, F., Modaresi, M. (2016). The effects of hydro-alcoholic extract of spinach on pituitary-gonadal axis in male mice. *Der Pharma Chemica*, 8(1); 404-407.

23.Maximas, HS., Sudha, PN., Sudhakar, K. (2014). A study of hepatoprotective activities of methanol extract of *Spinacia oleracea* (Linn.) to the induced hepatotoxicity in wistar rat models. *Int J Pharm Res Health Sci*, 2; 287-301.

24.Mostafavi Pour, Z., Zal, F., Monabat, I., Vessal, M. (2008). Protective effects of a combination of quercetin and vitamin E against cyclosporine A-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Hepathol Res*, 38(4); 385-92.

25.Noguchi, N., Niki, E. (2000). Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. *Free Rad Biol Med*, 28(10); 1538-1546.

26.Padama, VV., Baskaran, R., Roopesh, RS., Poornima, P. (2012). Quercetin attenuates lindane induced oxidative stress in wistar rats. *Miol Biol Rep*, 39(6); 6895-906.

27.Peng, Z., Gong, X., Yang, Y., Huang, L., Zhang, Q., Zhang, P. (2017). Hepatoprotective effect of quercetin against LPS/d-GalN induced acute liver injury in mice by inhibiting the IKK/NF- κ B and MAPK signal pathways. *Int Immunopharmacol*, 52; 281-289.

28.Raju, SBG., Battu, RG., Manju latha, YB., Srinivas, K. (2012). Antihepatotoxic activity of smilax china roots on CCL4 induced hepatic damage in rats. *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences*, 4(1); 494-496.

29.Ramesh, BN., Rao, TS., Prakasam, A., Sambamuri, K., Rao, KS. (2010). Neuronutrition and Alzheimers disease. *J Alzheimers Dis*, 119; 1123-39.

30.Schmitt-Schillig, S., Schaffer, S., Weber, CC., Eckert, GP., Muller WE. (2005). Flavonoids and the aging brain. *J Physiol Pharmacol*, 56(Suppl1); 23-36.

31.Seydi, E., Rasekh, HR., Salimi, A., Mohsenifar, Z., Pourahmad, J. (2016). Myricetin selectively induces apoptosis on cancerous hepatocytes by directly targeting their mitochondria. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 119(3); 249-58.

32.Shanmugam, S., Thangaraj, P., Lima, BDS., Chandran, R., de Souza Araújo, AA., Narain, N. (2016). Effects of luteolin and quercetin 3-O-glucoside identified from *Passiflora subpeltata* leaves against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Biomed Pharmacother*, 83;1278-1285.

33.Shohang, MJ., Wei, YY., Yu, N., Zhang, J., Wang, K., Patrin, G. (2011). Natural variation of folate content and composition in spinach (*Spinacia oleracea* L.) germplasm. *J Agric Food Chem*, 59; 12520-6.

34.Singh, S., Rana, SV. (2010). Ascorbic acid improved mitochondrial function in liver of arsenic-mitochondrial function in liver of

arsenic- treated rat. *Toxicol Ind Health*, 26(5); 265-72.

35. Tai, M., Zhang, J., Song, S., Miao, R., Liu, S., Pang, Q. (2015). Protective effects of luteolin against acetaminophen-induced acute liver failure in mouse. *Int Immunopharmacol*, 27(1); 164-70.

36. Tsaroucha, AK., Tsiaousidou, A., Ouzounidis, N., Tsalkidou, E., Lambropoulou, M., Giakoustidis, D. (2016). Intra peritoneal administration of apigenin in liver ischemia/reperfusion injury protective effects. *Saudi J Gastroenterol*, 22(6); 415-422.

37. Wang, F., Liu, J.C., Zhou, R.J., Zhao, X., Liu, M., Ye, H. (2017). Apigenin protects against alcohol-induced liver injury in mice by regulating hepatic CYP2E1-mediated oxidative stress and PPAR-mediated lipogenic gene expression. *Chem Biol Interact*, 275; 171-177.

38. Wang, J., Miao, M., Zhang, Y., Liu, R., Li, X., Cui, Y. (2015). Quercetin ameliorates liver injury induced with Tripterygium glycosides by reducing oxidative stress and inflammation. *Can J Physiol Pharmacol*, 93(6); 427-33.

39. Wang, M., Sun, J., Jiang, Z., Xie, W., Zhang, X. (2015). Hepatoprotective effect of kaempferol against alcoholic liver injury in mice. *Am J Chin Med*, 43(2); 241-54.

40. Waseem, M., Tabassum, H., Bhardwaj, M., Parvez, S. (2017). Ameliorative efficacy of quercetin against cisplatin induced mitochondrial dysfunction: Study on isolated rat liver mitochondria. *Mol Med Rep*, 16(3); 2939-2945.

41. Wei, C.B., Tao, K., Jiang, R., Zhou, L.D., Zhang, Q.H., Yuan, C.S. (2017). Quercetin protects mouse liver against triptolide-induced hepatic injury by restoring Th17/Treg balance

through Tim-3 and TLR4-MyD88-NF- κ B pathway. *Int Immunopharmacol*, 53;73-82.

42. Xia, S.F., Le, G.W., Wang, P., Qiu, Y.Y., Jiang, Y.Y., Tang, X. (2016). Regressive effect of myricetin on hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet. *Nutrients*, 8(12); E799.

43. Yang, D., Tan, X., Lv, Z., Liu, B., Baiyun, R., Lu, J. (2016). Regulation of Sirt1/Nrf2/TNF-signaling pathway by luteolin is critical to attenuate acute mercuric chloride exposure induced hepatotoxicity. *Sci Rep*, 6; 37157.

44. Yarahmadi, A., Zal, F., Bolouki, A. (2017). Protective effects of quercetin on nicotine induced oxidative stress in HepG2 cells. *Toxicol Mech Methods*, 27(8); 609-614.

45. Yjlmaz, A., Elbey, B., Yazgan, U.C., Donder, A., Arslan, N., Arslan, S. (2016). Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on fluoxetine-induced hepatotoxicity. *BioMed Research International*, 1; 1-8.

46. Zhang, H., Tan, X., Yang, D., Lu, J., Liu, B., Baiyun, R. (2017). Dietary luteolin attenuates chronic liver injury induced by mercuric chloride via the Nrf2/NF- κ B/P53 signaling pathway in rats. *Oncotarget*, 8(25); 40982-40993.

47. Zhang, J.Q., Shi, L., Xu, X.N., Huang, S.C., Lu, B., Ji, L.L. (2014). Therapeutic detoxification of quercetin against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice and its mechanism. *J Zhejiang Univ Sci B*, 15(12); 1039-47.

48. Zhou, R.J., Ye, H., Wang, F., Wang, J.L., Xie, M.L. (2017). Apigenin inhibits d-galactosamine/LPS-induced liver injury through upregulation of hepatic Nrf-2 and PPAR expressions in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 493(1);625-630.



The Protective Effect of Hydroalcoholic Extract of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) on Fuctional Tests and Liver Tissue Changes in Adult Male Rats Treated with Fluoxetine

M. Helali¹, M.Shariati²

1. Msc in Animal Biology ,Department of Biology ,Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

2. Associated Professor, Department of Biology ,Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

mehrdadshariati@hotmail.com

Received:2017. 24. 4

Accepted: 2018.27.10

Abstract

Inroduction & Objective: Fluoxetine is a selective inhibitor of serotonin reabsorption (SSRI), and is used as the first-line drug against depression and many other mental-psychological disorders. It induces impairment in the levels of hepatic enzymes as well as histological damages. In the present study, the protective effects of spinach hydro-alcoholic extract on hepatic histology and functions were investigated following administration of fluoxetine to adult male rats.

Material and Methods: 50 adult male Wistar rats were randomly divided in 5 groups: (1) the control group left untreated, the positive control receiving 120mg/kg bw fluoxetine, The negative control receiving 200 mg/kg bw spinach extract and the experimental groups 1 and 2 first received 100 and 200 mg/kg spinach extract respectively, and then 120 mg/kg bw Fluoxetine for 21 days. At the end of this period, animals were weighed and blood samples were taken from their hearts. These samples were used for measurement of serum levels of ALT, AST, ALP, GGT, total protein, albumin and total bilirubin. At the end of the test, remove the liver completely in the abdominal cavity. After weighing the liver, place it in a container containing 10% formalin until the specimens are fixed and ready to be crossed.

Results: In comparison to the control and the negative control, serum levels of ALT, AST, ALP, GGT and total bilirubin showed a significant increase in the positive control group receiving fluoxetine alone. Also, animals of positive control showed a decrease in serum levels of albumin and total protein. Consumption of spinach extract alone had no significant effect on the serum levels of ALT, AST, ALP, GGT, total bilirubin, albumin, total protein relative to the control group, While consumption of this extract in experimental groups 1 and 2 reduced hepatic toxicity induced by fluoxetine ($p < 0.05$) Compared to control and control groups, the fluoxetine recipient alone caused cellular damage in the liver tissue. The consumption of spinach extract alone did not significantly alter the liver tissue compared to the control group, while the extract recipient groups reduced fluconazole-induced liver toxicity .

Conclusion: According to the results, spinach extract has a considerable protective effects against fluoxetine side effects on the liver, and can improve, hepatic functions and liver tissue damages.

Keywords: *Spinach*, Fluoxetine, Liver function, Rat.