مطالعه تجربی عصاره اتانولی جلبک قهوه ای Nizimuddiniazanardinii بر ضایعات هیستوپاتولوژیکی کبدی القاء شده توسط انسداد مجرای صفراوی در موش های صحرایی

مدارا نصیری[۱]، مهسا آل ابراهیم[۲*]، رامین حاجی خانی[۱]، پژمان مرتضوی[۳]، مریم بنانج[۱]

چکیده

فیبروزکبدی به‌عنوان یک عامل ایجاد مرگ‌ومیر در انسان شناخته شده است. استرس اکسیداتیو در بیماری کبد_کلستاتیک به‌عنوان رابط بین آسیب‌کبدی و فیبروز کبدی عمل می‌کند. بنابراین هرعاملی که توانایی متعادل‌کردن آسیب‌اکسیداتیو را داشته باشد، قادر به کاهش فیبروز در کبدکلستاتیک خواهد بود. جلبک قهوه‌ای Nizimuddiniazanardinii یکی از منابع طبیعی در اکوسیستم دریایی است که‌حاوی ترکیبات فعال بیولوژیکی بوده واثرات ضدالتهابی، ضدسرطانی، ضدقارچی و آنتی-اکسیدانی آن شناخته شده است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر عصاره اتانولی جلبک قهوه‌ایNizimuddiniazanardinii بر ضایعات هیستوپاتولوژیکی کبدی القاء شده با انسدادمجرای‌صفراوی در موش‌های صحرایی نر بود. ٥٤ سر موش صحرایی نر بطور تصادفی در ۹ گروه تقسیم‌بندی شدند (n=6). گروه‌کنترل (موش‌های دست-نخورده)، گروه شم (لاپاراتومی بدون انسداد مجرای صفراوی)، گروه‌های کنترل عصاره جلبک (۵۰، ۱۰۰ یا ۲۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم)، گروه BDL، گروه‌های درمان تجربی (موش‌های BDL + عصاره جلبک با غلظت ۵۰، ۱۰۰ یا ۲۰۰ میلی‌گرم بر-کیلوگرم).BDL سطح سرمی آسپارتات‌آمینوترانسفراز، آلانین‌آمینوترانسفراز، آلکالین-فسفاتاز، بیلی‌روبین تام، کلسترول و تری‌گلیسرید را بطور معنی‌داری نسبت به گروه شم افزایش داد، درحالی که سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز در کبد و سطح سرمی آلبومین و پروتئین‌تام را کاهش داد. درمان موش‌های صحرایی BDL با عصاره جلبکاین تغییرات را بهبود بخشید.براساس رنگ‌آمیزی تری-کروم‌ماسون،BDLبه‌طور قابل‌توجهی باعث ایجاد فیبروز در کبد گردید.این تغییرات نیز با تیمار عصاره جلبکبه‌صورت وابسته‌به غلظت کاهش یافت. نتایج این مطالعه اثر محافظت کبدی و ضدفیبروزیNizimuddiniazanardinii در کبدکلستاتیک را نشان داد. اثر ضدفیبروزی این جلبک احتمالا ناشی از اثرات آنتی‌اکسیدانی ومهار رادیکال‌های آزاد می باشد.

واژگان کلیدی: انسداد مجرای صفراوی، کلستاز، فیبروز کبدی، جلبک قهوه ای، Nizimuddiniazanardinii.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۳۰

۱ – گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲ – گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (aleebrahim@iaups.ac.ir)

۳ – گروه پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مقدمه

کلستاز به معنای مهار یا کند شدن جریان صفرا است که در نتیجه انسداد مجرای مشترک صفراوی و یا مجاری صفراوی داخل کبدی ایجاد می‌شود (۱). مدل تجربی انسداد مجرای صفراوی (Bile Duct Ligation, BDL) به منظور شبیه سازی آسیب کبدی ناشی از کلستاز و ارائه درمان های تجربی مورد نظر، بطور گسترده ای در حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می گیرد (۲). اختلال در ترشح صفرا و تجمع ترکیبات صفراوی سمی در کبد کلستاتیک (Cholestatic liver)، منجر به ایجاد آسیب در هپاتوسیت ها، سلول های اپیتلیال مجرای صفراوی، و بروز التهاب شده و می تواند فیبروز و سیروز کبدی را ایجاد نماید (۳). تجمع نمک‌های صفراوی سمی و آبگریز، با افزایش تولید رادیکال های آزاد، گونه های واکنشگر اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) و افزایش استرس اکسیداتیو سبب بروز آسیب کبدی می‌گردد (٤). در میان گیاهان دریایی، جلبک‌ها دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، آنتی بیوتیکی، ضد ویروسی، ضد قارچی، ضد سرطانی و ضد التهابی می‌باشند (۵). جلبک های قهوه‌ای نیز منبع عالی از پروتئین، ویتامین ها، اسیدهای چرب ضروری و مواد معدنی می‌باشد (٦). جلبک *Nizamuddiniazanardinii* یک ماکروجلبک قهوه ای استوایی است که در سواحل خلیج فارس یافت می شود و منبع بسیار غنی از اکریلیک اسیدها، آمینواسیدها، استروئیدها، ترپنوئیدها، ترکیبات فنلی، کتون های هالوژنه، فلوروتانین ها،

پلی سولفیدها، آلکان ها و اسیدهای چرب ضروری است. همچنین این جلبک به دلیل دارا بودن ترکیباتی همچون اسیدآسکوربیک، پلی فنل‌ها، ترپن‌ها، کاروتنوئیدها، آلکالوئیدها و توکوفرول ها، دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می‌باشد (۷). اسیدهای چرب اشباع نشده موجود در این جلبک، از جمله امگا ۳ و امگا ٦، منابع غنی آنتی اکسیدانی و ترکیباتی مفید برای سلامت انسان هستند (۸). هدف از انجام مطالعه حاضر ارزیابی اثر ماکروجلبک قهوه ای *Nizimuddiniazanardinii* بر آسیب کبدی القاء شده با انسداد مجرای صفراوی در موش های صحرایی نر نژاد ویستار بود.

مواد و روش‌کار

روش آماده سازی جلبک ها و عصاره گیری

جلبک قهوه ای *Nizimuddiniazanardinii* از بندر چابهار جمع آوری و در یک جعبه یونولیتی حاوی یخ ذخیره گردید. سپس به آزمایشگاه فارماکوسیوتیکس دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران منتقل شد. پس از اطمینان از سلامت ظاهری و تایید متخصصان بخش گیاه شناسی و هرباریوم دانشگاه،جلبک ها با روش استاندارد عصاره گیری گردید (۹). به این ترتیب که ابتدا جلبک ها کاملاً شسته شده و به منظور از بین رفتن املاح سطحی، در آب مقطر غوطه ور شدند و در عرض چند ساعت۳ بار آب آنها تعویض گردید. سپس جلبک ها به مدت چند روز در سایه و بر روی کاغذ صافی قرار گرفت تا کاملاً خشک شود.جلبک های خشک شده توسط هاون چینی خورد شد. به منظور تهیه عصاره اتانولی، ۲۰۰ گرم از پودر جلبک مورد مطالعه درون اتانول ۸۰٪ خیسانده شد. سپس به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای اتاق و دور ۱۰۰rpm انکوبه گردید. فرآیند استخراج ۲ بار تکرار شد و سپس با کاغذ صافی وایتمن شماره ۱، فیلتر گردید. عصاره تغلیظ شده در زیر هود به مدت ٤٨ ساعت قرار داده شد تا کاملاً خشک شود. عصاره فوق تا زمان مصرف و تهیه دوزهای مورد نیاز در دمای ٤ درجه سانتیگراد قرار داده شد.

حیوانات و گروه بندی

تعداد ٥٤ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی۲۵۰-۲۳۰ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری و به اتاق حیوانات دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال منتقل گردید. حیوانات در شرایط استاندارد از جمله دمای تقریبی ۲۲ درجه سانتیگراد، چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی/ ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ٦٠-٤٠ درصد نگهداری شدند. حیوانات دسترسی آزادانه به آب و غذای مخصوص جوندگان (پلت) داشتند. پلت از شرکت خوراک دام پارس تهران تهیه و آب لوله کشی تمیز، بدون محدودیت از طریق آبخوری های مخصوص در اختیار حیوانات قرار گرفت. تمام مراحل کار با حیوانات بر اساس شیوه نامه اخلاق در کار با حیوانات آزمایشگاهی کمیته ملی اخلاقانجام شد و تأییدیه آن از کمیته اخلاق دانشکده دریافت گردید. حیوانات به‌طور تصادفی در ۹ گروه تقسیم شدند و هر گروه شامل ۹ سر موش صحرایی بود.

گروه ۱ (کنترل): حیوانات سالم که روزانه آب مقطر را به عنوان حلال دارو دریافت کردند. گروه ۲ (شم): حیوانات جراحی شده بدون ایجاد کلستاز (BDL) که روزانه با آب مقطر (حلال دارو) تیمار شدند. گروه های ٥-۳ (کنترل عصاره جلبک): حیوانات روزانه با عصاره جلبک در دوزهای ۵۰ یا ۱۰۰ و یا ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تیمار شدند. گروه ٦ (گروه BDL): حیواناتی که تحت جراحی BDL قرار گرفته اند و روزانه آب مقطر دریافت کردند. گروه های ۹-۷ (درمان تجربی): حیوانات تحت عمل BDL قرار گرفتند و روزانه با عصاره جلبک در دوزهای ۵۰

یا ۱۰۰ و یا ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تیمار شدند. دوره تحقیق ٤٥ روزه بود. تمامی حیوانات عصاره جلبک قهوه ای را به صورت محلول در ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر از طریق گاواژ داخل معده ای یک بار در روز و به مدت ٤٥ روز متوالی دریافت نمودند. لازم به ذکر است که تیمار عصاره به حیوانات از همان روز جراحی صورت گرفت (Cotreatment).

جراحی انسداد مجرای صفراوی(Bile Duct Ligation) و القاء کلستاز

انسداد مجاری صفراوی طبق روش استاندارد Uchinami و همکاران انجام شد (۱۰). هر حیوان با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین (۹۰ میلیگرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شد. سپس بخش میانی حفره شکمی در ۳ لایه پوست، عضله و صفاق برش داده شد و مجرای مشترک صفراوی شناسایی شده و در دو قسمت توسط نخ بخیه نایلونی شماره ٤-۰ مسدود گردید. گره اول دقیقا زیر تقاطع مجرای کبدی و گره دوم قبل از ورودی مجرای پانکراسی ایجاد شد. سپس مجرای صفراوی از بین این دو نقطه بریده شد. در پایان جراحی، ۲ میلی لیتر سرم استریل قابل تزریق (سالین ۱۰٪) به درون حفره صفاقی ریخته شد و سپس لایه‌های صفاق و عضله و پوست به دقت بخیه زده شد. پس از اتمام جراحی بمنظور جلوگیری از کاهش درجه حرارت بدن، حیوان تا زمان بهوش آمدن کامل بر روی صفحه گرمایشی قرار گرفت. موش های صحرایی گروه شم مشابه گروه کلستاتیک، تحت بیهوشی کامل قرار گرفته و بخش میانی حفره شکمی در ۳ لایه پوست، عضله و صفاق برش داده شد و بدون ایجاد انسداد مجرای صفراوی (BDL)لایه های شکمی با نخ بخیه دوخته شد.

نمونه گیری و سنجش پارامترهای بیوشیمیایی در سرم

پس از پایان دوره ٤٥ روزه آزمایش، حیوانات به مدت ۱۲ ساعت ناشتا نگه داشته شده و سپس با استفاده از کتامین (۹۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن) و زیلازین (۱۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن)، بیهوش شده و مستقیماً از قلب آنها خونگیری انجام شد. نمونه‌های خون با دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سرم آن ها جدا شد. سپس سطح سرمی آنزیم های ALT، AST، ALP، کلسترول، تری گلیسیرید، بیلی روبین تام، آلبومین و پروتئین تام بر اساس روش IFCC (فدراسیون بین المللی شیمی بالینی و پزشکی آزمایشگاهی) و کیت های مربوطه توسط دستگاه اتوآنالایزر (۱۵۰۰BT، ایتالیا) ارزیابی شد (۱۱).

سنجش فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT)در هموژنات کبدی

پس از خروج بافت کبد از بدن حیوانات و شستشوی آن با سرم فیزیولوژی،بخشی از بافت کبد به منظور انجام بررسی های هیستوپاتولوژیکی در فرمالین۱۰درصد تثبیت گردید و بخش دیگر بافت کبد با استفاده از دستگاه هموژنایزر، هموژن گردید. محلولهای همگن تهیه شده در چندین فالکونریخته شد و توسط سانتریفیوژ یخچالدار در دمای ٤ درجه سانتیگراد و ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی جدا گردید. سپس فعالیت آنزیم هایSOD و CATبا استفاده از کیت های مربوطه (شرکت پارس آزمون) اندازه گیری گردید.

بررسی هیستوپاتولوژی

پس از انجام روش های متداول پرداش بافتی، از نمونه های بافت کبد، قالب های پارافینی تهیه گردید و سپس برش هایی به ضخامت ٦-٤ میکرومتر توسط دستگاه میکروتوم روتاری ایجاد شد. پس از تهیه اسلاید، نمونه های بافتی، با روش تریکوم ماسون (Masson’sTrichrome) رنگ آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

روش تجزیه تحلیل آماری

تمامی داده های مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ و با آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی تحلیل گردید. نتایج بصورت SEM ± Means ارائه شد و ملاک استنتاج آماری و سطح معناداری کمتر از ۵ درصد در نظر گرفته شد.

نتایج

تأثیر عصاره هیدروالکلی جلبک قهوه ای *Nizimuddiniazanardinii* بر پارامترهای سرمی

همانطور که در نگاره ۱ نشان داده شده است، BDL به طور معناداری سطح سرمی آنزیم آسپارتات‌آمینوترانسفراز (AST)، آلانین‌آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین‌فسفاتاز (ALP)، بیلی‌روبین تام، کلسترول و تری‌گلیسیرید را بطور معنی‌داری نسبت به گروه شم افزایش داد ($P<0.001$)، درحالی که سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید-دیسموتاز و کاتالاز در کبد (نگاره ۲) و سطح سرمی آلبومین و پروتئین تام را کاهش داد($P<0.001$). درمان موش‌های صحرایی BDL با عصاره جلبک قهوه ای *izimuddiniazanardini* این تغییرات را به صورت وابسته به غلظت بهبود بخشید، هرچند که این بهبود فقط در غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم معنادار بود.در گروه های کنترل عصاره جلبک نیز هیچ تغییر معناداری برای هیچ یک از فاکتورها نسبت به گروه کنترل مشاهده نگردید.

نتایج یافته های هیستوپاتولوژی

فیبروز و آسیب کبدی بر اساس روش اصلاح شده Sant'Anna و همکاران در سال ۲۰۱۱ رتبه بندی شد. در این روش، در هر نمونه ۱۰ منطقه به طور تصادفی مورد بررسی قرار گرفت و میانگین آسیب به عنوان یک رتبه واحد در نظر گرفته شد (جدول ۱). درجه بندی آسیب به شرح ذیل است:

نکروز: ۰= بدون نکروز، ۱= آسیب موضعی کمتر از ۲۵٪، ۲= آسیب موضعی بین ۵۰-۲۵٪، ۳= نکروز گسترده ولی موضعی، ٤= نکروز وسیع.

نفوذ سلول های التهابی: ۰= عدم التهاب، ۱= التهاب کانونی کمتر از ۲۵٪، ۲= التهاب کانونی بین ۵۰-۲۵٪، ۳= التهاب گسترده ولی موضعی، ٤= التهاب وسیع.

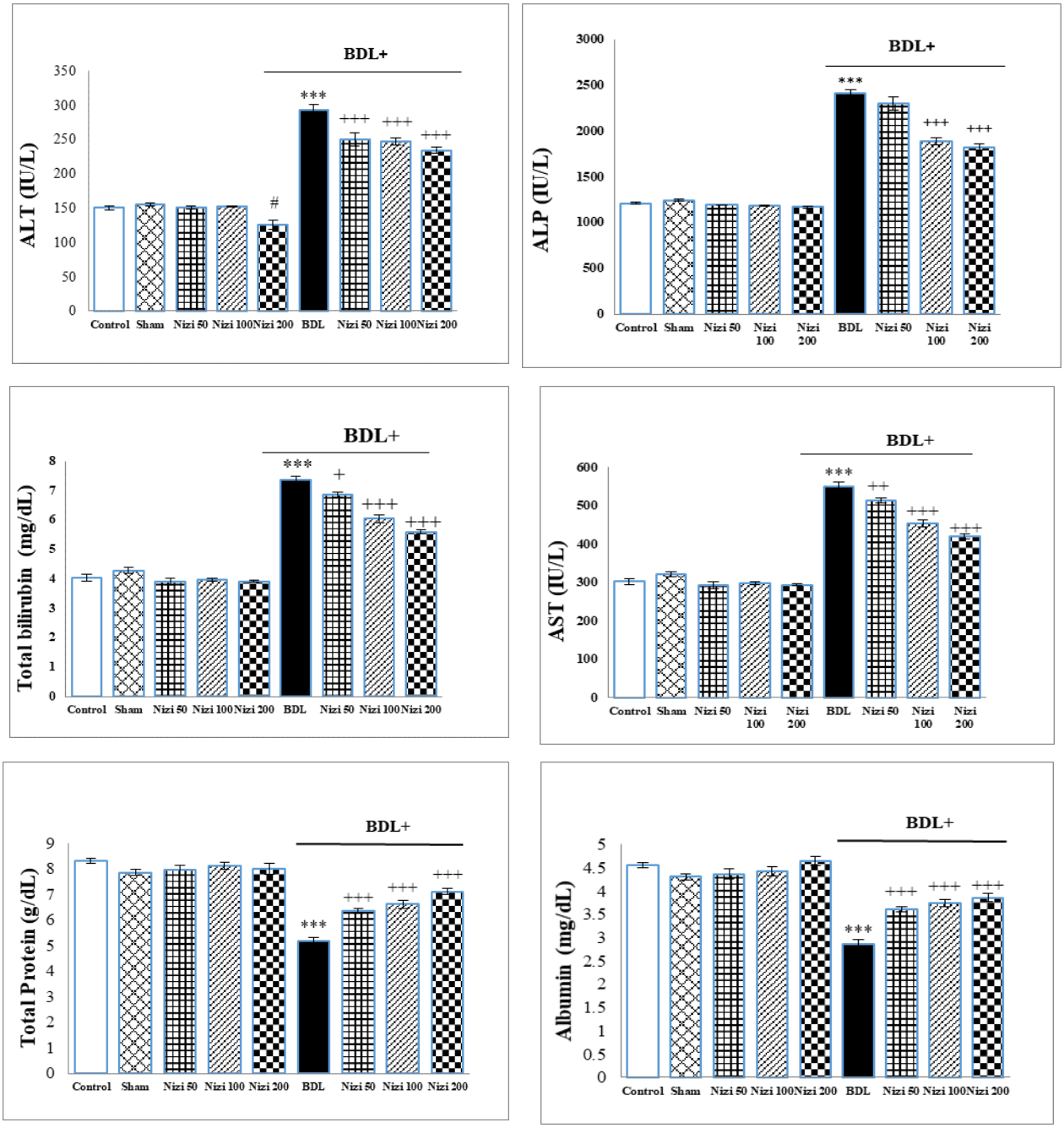
بافت همبند: ۰= فاقد بافت همبند، ۱= رسوب کلاژن بدون تشکیل دیواره، ۲= تشکیل دیواره ناقص، ۳= دیواره کامل و نازک، ٤= دیواره کامل و ضخیم.

هایپرپلازی مجاری صفراوی: ۰= عدم هیپرپلازی، ۱= کمتر از ۲۵٪ هر لبول، ۲= ۵۰-۲۵٪ هر لبول، ۳= گسترده ولی موضعی، ٤= وسیع (۱۲).

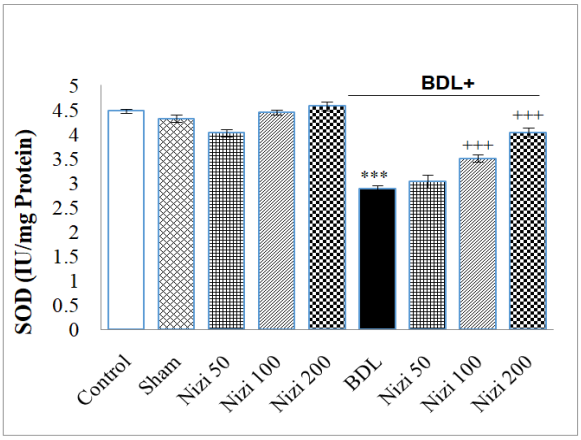
بر اساس داده های موجود در جدول ۱، بررسیهای آسیبشناسی بافتی با رنگآمیزی تریکروم، شاخصهای فیبروز کبدی از جمله نکروز هپاتوسیتها، نفوذ سلولهای التهابی، رسوب کلاژن و هیپرپلازی مجاری صفراوی را در گروهBDLنشان داد.در حالیکه تیمار با عصاره هیدروالکلی جلبک قهوه ای *Nizimuddiniazanardini*با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت وابسته به دوزمیزان فیبروز کبدی را در گروههایBDLکاهش داد.

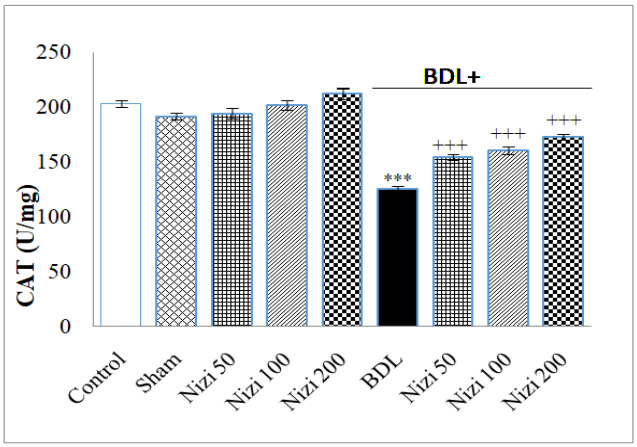
بحث

کبد اندامی کلیدی است که در ترشح بسیاری از آنزیمها و همچنین متابولیزه کردن مواد مختلف در بدن و سمزدایی بدن از سموم مختلف نقش بسیار مهمی دارد (۱۳). اختلال در عملکرد کبد می تواند منجر به ایجاد بیماریهای مختلفی همچون فیبروز، سیروز، هپاتیت و حتی سرطان سلولهای کبدی گردد. فیبروز اختلال اصلی در بیماریهای مزمن کبدی است که به طور گستردهای عامل مرگ و میر در بسیاری از



نگاره ۱: اثر عصاره هیدروالکلی جلبک قهوه ای*Nizimuddiniazanardinii* با غلظت های ۵۰، ۱۰۰ یا ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در گروه های مختلف بر سطح سرمی آنزیم های ALT، AST، ALP و فاکتورهای تری گلیسیرید، کلسترول، بیلی روبین تام، پروتئین تامو آلبومین در فیبروز کبدی ناشی از انسداد مجرای صفراوی (BDL) در موش صحرایی نر نژاد ویستار. داده ها به صورت میانگین ±SEMگزارش شده است. $^{\#}P<0.001$سطح معناداری در مقایسه با گروه کنترل، $^{***}P<0.001$ سطح معناداری نسبت به گروه شم، $^{+++}P<0.001$، $^{++}P<0.01$ و $^{+}P<0.05$ سطح معناداری نسبت به گروه BDLرا نشان می دهد.



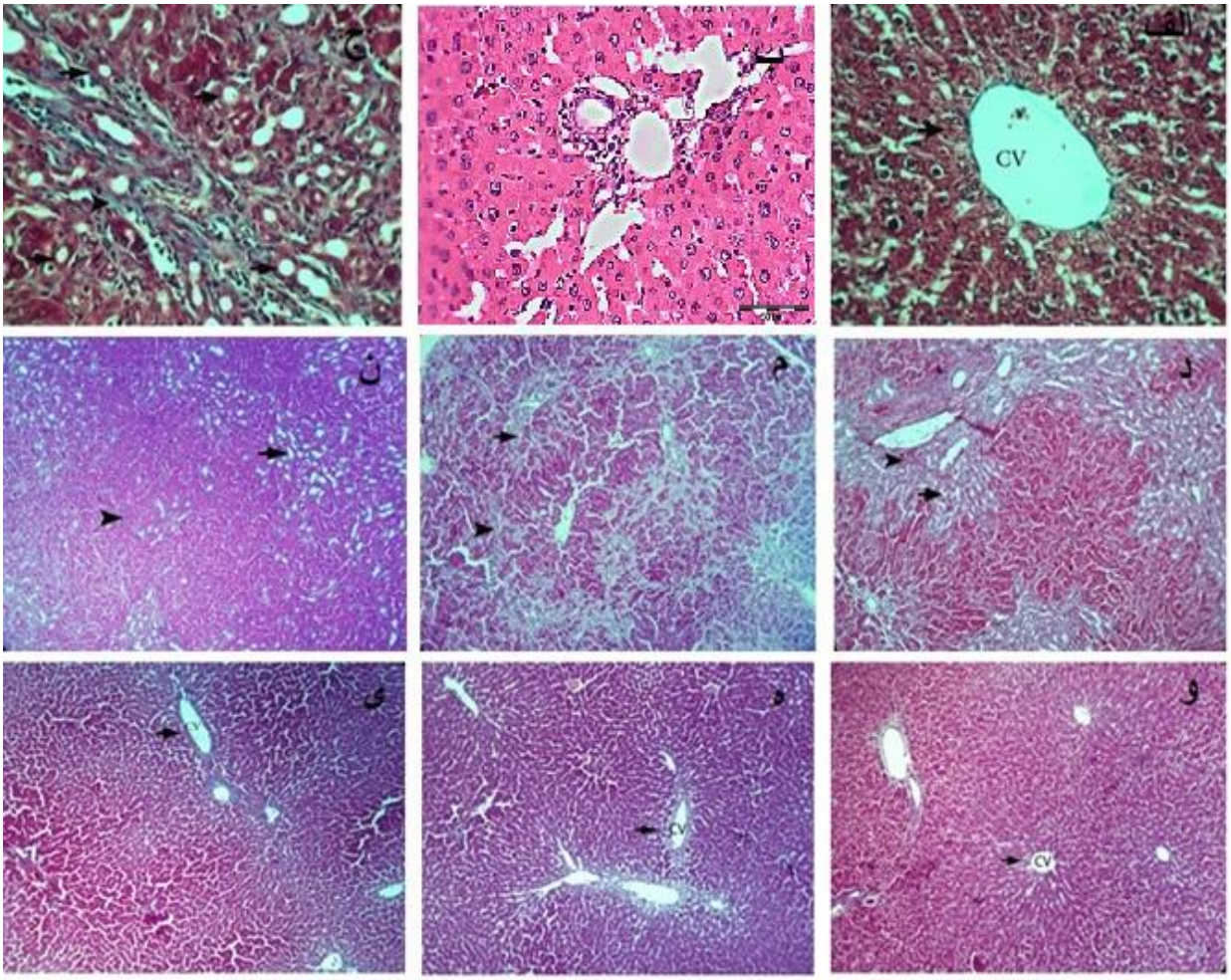


نگاره ۲: اثر عصاره هیدروالکلی *Nizimuddiniazanardini*با غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و یا ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در گروه های مختلف بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در هموژن بافت کبد در فیبروز کبدی ناشی از BDL در موش های صحرایی نر نژاد ویستار. داده ها به صورت میانگین±SEMگزارش شده است. $^{***}P<0.001$سطح معناداری در مقایسه با گروه شم و $^{+++}P<0.001$سطح معناداری در مقایسه با گروهBDL را نشان می دهد.

جدول ۱- تأثیر عصاره اتانولی جلبک قهوه ای *Nizimuddiniazanardini*با دوزهای ۵۰،۱۰۰ و ۲۰۰میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر فیبروز کبدی ناشی از انسداد مجرای صفراوی در گروه های مختلف

	رتبه بندی آسیب			
گروه ها	نکروز	التهاب	بافت همبند (کلاژن)	هایپرپلازی مجاری صفراوی
کنترل	۰	۰	۰	۰
شم	۰	۰	۰	۰
کلستاز(BDL)	۳***	۳***	۴***	۴***
کنترل عصاره جلبک (۵۰ میلیگرم/کیلوگرم)	۰	۰	۰	۰
کنترل عصاره جلبک (۱۰۰ میلیگرم/کیلوگرم)	۰	۰	۰	۰
کنترل عصاره جلبک (۲۰۰ میلیگرم/کیلوگرم)	۰	۰	۰	۰
BDL+ عصاره جلبک (۵۰ میلیگرم/کیلوگرم)	۳/۱۶	۲/۶۷	۳/۵۸	۳/۶۹
BDL+ عصاره جلبک (۱۰۰میلیگرم/کیلوگرم)	۲/۳۱+++	۲/۱۳++	۲/۳۳+++	۲/۶۶+++
BDL+ عصاره جلبک (۲۰۰میلیگرم/کیلوگرم)	۱/۳۳+++	۱/۱۶+++	۱/۵+++	۲/۳۳+++

$^{***}P<0.001$ سطح معناداری نسبت به گروه شم، $^{++}P<0.001$ و $^{+++}P<0.001$ در مقایسه با گروه کلستاز را نشان می دهد.



نگاره ۳-اثر عصاره اتانولی جلبک قهوه ای *Nizimuddiniazanardinii*بر فیبروز کبد کلستاتیک القاء شده با روش انسداد مجرای صفراوی (BDL) در موش های صحرایی نر نژاد ویستار.الف:نمونه بافت کبد در گروه کنترل، سیاهرگ مرکزی (CV)و هپاتوسیتهای سالم اطراف آن دیده میشود (Trichrome*460)/ب:نمونه بافت کبد در گروه شم، سیاهرگ مرکزی (CV)و هپاتوسیتهای سالم اطراف آن دیده میشود (Trichrome*460)، ج: نمونه بافت کبد در گروهBDL، نفوذ بافت همبند به صورت دیواره های کامل (نوک پیکان) و هایپرپلازی مجاری صفراوی (پیکان) مشاهده می شود(Trichrome*460)/ د-ن: نمونه بافت کبد در گروه های درمان تجربی (BDL+ عصاره جلبک به ترتیب با غلظت های ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، نفوذ بافت همبند (نوک پیکان) و هایپرپلازی مجاری صفراوی (پیکان) نشان داده شده است (Trichrome*160)/ و-ی: نمونه بافت کبد در گروه های کنترل عصاره به ترتیب در غلظت های ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، سیاهرگ مرکزی (CV)و هپاتوسیتهای سالم اطراف آن مشاهده میشود(Trichrome*160).

افراد مبتلا به کلستاز کبدی میباشد.ویژگی اصلیفیبروز، افزایش رسوب ماتریکس‌خارج سلولی خصوصا کلاژن و کاهش تخریب آن است که سبب سفت و سخت شدن بافت و از دست رفتن کارایی آن می شود (۱٤).در پژوهش حاضر با استفاده از مدل تجربی انسداد مجرای صفراوی (BDL)در موش های صحرایی،کلستاز کبدی ایجاد گردید، تا اثر محافظت کبدی و ضدفیبروزی عصاره اتانونی جلبک قهوه ای*Nizimuddiniazanardinii* مورد ارزیابی قرار گیرد.

همانطور که انتظار می رفت، BDL به طور قابل توجهی سطح سرمی آنزیم های ALT، AST وALP را افزایش داد. اندازه گیری سطح سرمی فاکتورهای سلامت کبدی، معیاری غیرمستقیم در سنجش وضعیت کبدی محسوب می شود. تجمع اسیدهای صفراوی آبگریز و سمی در کبد کلستاتیک از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو، منجر به کاهش یکپارچگی غشاء هپاتوسیت های کبدی می گردد. بنابراین، آنزیم هایکبدیکه با غلظت زیاددر سلول های کبدی وجود دارند، به جریان خون آزاد می شوند (۱۵). تیمار گروه هایBDLبا غلظت های مختلف عصاره جلبکقهوه ای به طور معناداری سطح ALT،ASTوALPرا در سرم کاهش داد، هرچند که این کاهش در دوز ۵۰میلیگرم بر کیلوگرم برای ALP معنی دار نبود.یکی دیگر از وظایف مهم کبد، ساخت پروتئین های خون از جمله آلبومین است.در مطالعه حاضر کاهش سطح سرمی آلبومین و پروتئین تام در گروه BDL نشان دهنده اختلال در عملکرد کبد کلستاتیک شده بود. درحالی که تیمار با عصاره جلبک*Nizimuddiniazanardinii* سبب بهبود این فاکتورها در سرم گردید (نگاره-۱).

در مطالعه حاضر سطح سرمی بیلی روبین تام در گروه BDL به طور معنی داری افزایش یافت. افزایش بیلی روبین تام (کونژوگه) در سرم، شاخص اصلی کلستاز است. در کلستاز به دلیل وجود انسداد در مجرای مشترک صفراوی، دفع بیلی روبین کونژوگه از طریق جریان صفرا کاهش می یابد و در نتیجه بیلی روبین وارد سرم می شود. اگرچه مکانیسم دقیق آن مشخص نیست، اما احتمالاً به دلیل تضعیف اتصالات محکم (Tight junction) بین سلولهای کبدی،بیلی روبین به جریان خون راه پیدا می کند (۱۵). تیمار گروه هایBDL با عصاره جلبک قهوه ای*Nizimuddiniazanardinii*به طور قابل توجهی سبب کاهش سطح سرمی بیلی روبین تام گردید که این امر اثر آنتی اکسیدانی جلبک و نقش آن در محافظتاز غشاهای سلولی را نشان می دهد. اسیدهای صفراوی از طریق تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) و ایجاد استرس اکسیداتیو، سبب ایجاد اختلال در عملکرد کبد می شوند (۱۶). همچنین گزارش شده است که مدل تجربی انسداد مجرای صفراوی با کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی SOD و CAT در کبد مرتبط است (۱۷). در مطالعه حاضر القاء کلستاز خارج کبدی به مدت۴۵ روز بطور معنی داری فعالیت آنزیم های SOD و CATرا در گروه BDL کاهش داد، در حالی که تیمار با عصاره*N. zanardinii* باعث افزایش فعالیت این آنزیم ها در گروه های تیمار شده گردید (نگاره-۲).SOD و CAT از مهمترین آنزیم های آنتی اکسیدانی بدن و مسئول سمزدایی رادیکال های آزاد هستند که می توانند نقش مهمی در پیشگیری از استرس اکسیداتیو و فیبروز کبدی داشته باشند. همچنین گزارش شده است که در شرایط *in vitro* نیز، این آنزیم ها از هپاتوسیت ها در برابر سمیت نمک های صفرای محافظت می کنند (۱۸). در مطالعه حاضر افزایش آنزیم های آنتی اکسیدانی SOD و CATدر گروه های BDL تیمار شده با عصاره جلبک قهوه ای، در مقایسه با گروه BDL، نشان دهنده اثر عصاره جلبک در بهبود وضعیت آنتی اکسیدانی کبد می باشد.در سال های اخیر استفاده از منابع گیاهی جدید با خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبیبسیار مورد توجه قرار گرفته است.نتایج تحقیقات پیشین نشان می دهد که جلبک قهوه ای *N. zanardinii*منبع بسیار غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی مختلف از جمله پلی فنول ها، کاروتنوئیدها، توکوفرول ها، ترپن ها، اسید اسکوربیک و آلکالوئیدها می باشد (۱۹). این ترکیبات به سرعت با گونه های اکسیژن واکنش پذیر مانند رادیکال های هیدروکسیل، سوپراکسید و پراکسید واکنش داده و در نتیجه بروز استرس اکسیداتیو در سلول ها را کاهش می دهند (۲۰).

کلستاز به عنوان اختلالی شناخته میشود که با واکنشهای التهابی و استرس اکسیداتیو در کبد همراه استکه می تواندبه

آسیب کبدی و در صورت ادامه یافتن به فیبروز کبدی منجر شود.تحت شرایط کلستاز در اثر تجمع نمکهای صفراوی سمی و آبگریز در کبد، التهاب بافتی به صورت تجمع سلول های التهابی تک هسته ای و فعال شدن سلولهای کوپفر آغاز میشود (۷ و ٦).تحت این شرایط سلولهای التهابی با آزاد کردن مولکولهای واکنش پذیر مشتق شده از اکسیژن (Species/ROSReactiveOxygen)سبب بروز استرس اکسیداتیو در کبد میشوند که به دنبال آن سلول های ستاره ای در کبد فعال شده و تولید کلاژن در ماتریکس خارج سلولی افزایش مییابد (٦).بنابراین فرایندهای التهابی و استرس اکسیداتیو به عنوان دو هدف اصلی در پیشگیری و درمان فیبروز کبدی در نظر گرفته میشوند (۷). جلبک های قهوه ای خصوصا جلبک*N. zanardinii*به دلیل داشتن خواص آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد التهابی و ضد ویروسی، کاربرد بسیار گسترده ای در درمان انواع بیماری ها داشته و در میان گیاهان دریایی بسیار مورد توجه قرار گرفته اند (۷).اسیدآسکوربیک، پلی فنل ها، ترپن ها، کاروتنوئیدها، آلکالوئیدها و توکوفرول های موجود در این گونه از جلبک ها، سبب ایجاد خواص آنتی اکسیدانی بسیار قوی در آنها می شوند (۷، ۲۱).بر اساس نتایج هیستوپاتولوژیکی مطالعه حاضر، BDLسبب القاء فاکتورهای آسیب کبد کلستاتیک از جمله نکروز، التهاب و رسوب کلاژن و هایپرپلازی مجاری صفراوی گردید، درحالیکه تیمار موشهای صحرایی BDL با عصاره جلبک قهوه ای *N. zanardinii*سبب بهبودرتبه آسیب در یک الگوی وابسته به غلظت گردید (جدول-۱) که احتمالا به دلیل خواص آنتی اکسیدانی این جلبک می باشد.

نتایج این مطالعه اثرات محافظت کبدی و ضد فیبروزی عصاره *Nizimuddiniazanardinii* در کبد کلستاتیک را نشان داد. عصاره *N.zanardinii*احتمالا از طریق خاصیت آنتی اکسیدانی، مهار رادیکال های آزاد، محافظت از غشای سلول و مهار فعال شدن سلول های ستاره ای،تولید کلاژن را مهار مینمایدو اثرات ضد فیبروزی خود را اعمال می کند.

فهرست منابع

1. Ale Ebrahim M, Eidi A, Mortazavi P, Tavangar SM, Minai Tehrani D. The evaluation of sodium molybdate effect on liver fibrosis in a rat model of bile duct ligation. J. Comp. Pathol. 2014; 11(4):1421-28.
2. Greim H, Trülzsch D, Czygan P, Rudick J, Hutterer F, Schaffner F and Popper H. Mechanism of cholestasis: 6. Bile acids in human livers with or without biliary obstruction. Gastroenterology. 1972; 63(5):846-50.
3. Mohammadian Z, Eidi A, Mortazavi P, Tavangar SM, Asghari A. Effect of folic acid in cholestatic hepatic fibrosis induced by bile duct ligation model in rat. J Comp Pathol. 2015; 2(49):1627-36.
4. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, and Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. Hepatology. 1981; 1(5): 431-35.
5. Dillon S and Tobias JD. Ondansetron to treat pruritus due to cholestatic jaundice. J Pediatr Pharmacol Ther. 2013; 18(3): 241-346.
6. Silva G, Pereira RB, Valentão P, Andrade PB and Sousa C. Distinct fatty
acid profile of ten brown macroalgae. Rev Bras Farmacogn. 2013; 23(4): 608-13.
7. Mohammadian E, Shabanpoor B, Kordjazi M. Effect of Nizimuddinia zanardini aqueous extract against human pathogenic microbes and evaluating its antioxidant activity. J. Mar. Biol. 2019; 40(10):75-82.
8. Nomura M, Kamogawa H, Susanto E, Kawagoe C, Yasui H, Saga N, Hosokawa M, Miyashita K. Seasonal variations of total

fucoxanthin contents of Sargassumhorneri (Turner) and Cystoseirahakodatensis (Yendo) from the northern seashore of Japan. J. Appl. Phycol. 2013; 25(4):1159-69.
9. Salehi P, Sonboli A, Eftekhar F, Nejad-Ebrahimi S, Yousefzadi M. Essential Oil Composition, Antibacterial and Antioxidant Activity of the Oil and Various Extracts of Ziziphoraclinopodioides subsp. rigida (B OISS.) R ECH. f. from Iran. Biol. Pharm. Bull. 2005; 28(10): 1892-96.
10. Uchinami H, Seki E, Brenner DA, D'armiento J. Loss of MMP 13 attenuates murine hepatic injury and fibrosis during cholestasis. Hepatology. 2006; 44(2): 420-29.
11. Moss DW. Clinical enzymology. Nature. 1971; 233(5320): 505-505.
12. Sant'Anna LB, Cargnoni A, Ressel L, Vanosi G, Parolini O. Amniotic membrane application reduces liver fibrosis in a bile duct ligation rat model. Cell Transplant. 2011; 20(3):441-53.
13. Koohsari M, Hosseinizadeh SMJ, Valipour MA. Review of Protective Effect of Natural Products Against Carbon Tetrachloride-induced Liver Damage. Clin Exc. 2018; 7(4):13-27.
14. Lin SY, Wang YY, Chen WY, Liao SL, Chou ST, Yang CP, et al. Hepatoprotective activities of rosmarinic acid against extrahepatic cholestasis in rats. Food Chem Toxicol. 2017; 108: 214-23.
15. Ale-Ebrahim M, Eidi A, Mortazavi P, Tavangar SM, Tehrani DM. Hepatoprotective and antifibrotic effects of sodium molybdate in a rat model of bile duct ligation. J Trace Elem Med Biol. 2015; 29: 242-48.
16. Tayyar AT, Kozalı S, YetkinYildirim G, Karakus R, Yuksel IT, Erel O, Neselioglu S, Eroglu M. Role of ischemia-modified albumin in the evaluation of oxidative stress in intrahepatic cholestasis of pregnancy. J lipids, fatty acid composition, and Matern Fetal Neonatal Med. 2019; 32(22):3836-40.
17. Orellana M, Rodrigo R, Thielemann L, Guajardo V. Bile duct ligation and oxidative stress in the rat: effects in liver and kidney. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2000; 126(2): 105-11.
18. Cralle LJ, Cralley LV, Bus JB. Patty's industrial toxicology. 3rd ed. NJ: Wiley Interscience; 1981.
19. Duan XJ, Zhang WW, Li XM, Wang BG. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, Polysiphoniaurceolata. Food Chem. 2006; 95(1):37-43.
20. Cox S, Abu-Ghannam N, Gupta S. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. Int. Food Res. J. 2010; 17(1): 205-20.
21. Fariman GA, Shastan SJ, Zahedi MM. Seasonal variation of total lipid, fatty acids, fucoxanthin content, and antioxidant properties of two tropical brown algae (Nizamuddiniazanardinii and Cystoseiraindica) from Iran. J. Appl. Phycol. 2016; 28(2):1323-31.