بررسی تغییرات آنزیم شاخص کلستاز و میزان بیان TGF-β در کبد موشهای صحرایی کلستاتیک تیمار شده با عصاره اتانولی گیاه بز شاخدار

فاطمه کریمی[۱]، پژمان مرتضوی[۲*]، احمد اصغری [۳]

چکیده

فیبروز کبدی یکی از بیماریهای مزمن و شایع بوده که با افزایش بیش از حد کلاژن در کبد، توسط سلولهای ستاره ای شکل با افزایش بیان TGF-β همراه می باشد. القا کلستاز، یکی از روشهای ایجاد فیبروز کبدی است. با توجه به مطالعات انجام شده در خصوص اثرات محافظت کنندگی گیاه بز شاخدار در برخی بیماریها، در این مطالعه اثر ضد فیبروزی عصاره گیاه بز شاخدار در فیبروز کبدی القا شده با انسداد مجاری صفراوی(BDL) در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از ٤٠ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در ۸ گروه۵ تایی شامل کنترل سالم، تجربی سالم تحت درمان با دوز هایmg/Kg ۱۰۰، ۲۰۰ و ٤٠٠ عصاره گیاه بز شاخدار ، گروه BDL و گروه های BDL تحت درمان با دوز های ذکر شده استفاده شد. موشها به مدت ٤۵ روز، روزانه یکبار تحت تیمار با عصاره گیاه بز شاخدار قرار گرفتند. پس از آسان کشی و جداسازی سرم ،آلکالین فسفاتاز ALP اندازه گیری شد. همچنین کبد موشها پس از فیکس شدن، با استفاده از روش رایج ایمنوهیستوشیمی با آنتی بادیβ -TGFرنگ آمیزی و مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده افزایش معنی دار سطح سرمی آنزیم های فوق و افزایش بیان TGF-βدر گروه BDL بود. تیمار با عصاره گیاه بز شاخدار توانست این تغییرات را به طور قابل توجه و به صورت وابسته به دوز بهبود بخشد. نتایج این مطالعه نشان داد گیاه بز شاخدار احتمالا با افزایش ثبات غشای سلولی موجب بهبود سطح سرمی آنزیم های کبدی شده و همچنین با مهار فعالسازی سلول های ستاره ای و مهار TGF-β باعث کاهش تولید و رسوب کلاژن در کبد می گردد.

واژگان کلیدی: موش صحرایی، کلستاز، فیبروز، بز شاخدار، ALP، TGF-β

تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۲/۱ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۱۱/۱٦

مقدمه

کلستاز به عنوان نقص در جریان صفرا تعریف می شود ، که منجر به انسداد مجرای صفراوی و مهار جریان صفرا و برگشت مجدد مواد صفراوی و انباشتگی آن ها در خون میشود در صورت عدم درمان منجر به فیبروز کبدی و در نهایت سیروز می گردد. (۱) BDL (Bile Duct Ligation) مدلی برای القای کلستاز در حیوانات آزمایشگاهی بوده که نسبت به سایر روش ها کلستاز را با شدت بیشتر و تلفات کمتری به رت ها القا می کند (۲).

فیبروز با تجمع بیش از حد پروتئین های ماتریکس خارج سلولی از جمله کلاژن در بافت آسیب دیده مشخص می شود که منجر به اختلال در عملکرد ارگان ها می شود (۳). انسداد مجرای صفراوی باعث افزایش فشار صفراوی، التهاب خفیف و ترشح سایتوکاین ها توسط سلول های اپیتلیال صفراوی می شود. این امر منجر به افزایش بیان نشانگر های فیبروژنیک از جمله TGF-β، α -SMA، کلاژن ۱، ایجاد ROS و آسیب کبدی می شود (٤). به بیان دیگر، کلستاز عامل توسعه استرس اکسیداتیو در کبد است وآنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که بافت های بیولوژیکی را در برابر رادیکال های آزاد محافظت می نمایند. (۵).

کلستاز خارج کبدی یا کلستاز انسدادی به معنای انسداد در خارج از کبد است که از لحاظ بیوشیمیایی ، با افزایش ALP سرم مشخص می شود (٦). آنزیم های کبدی ۲ نوع نشتی و القایی دارند. آنزیم های القایی کبد مانند انزیم آلکالین فسفاتاز(ALP)با نیه عمر ۳ روز و ایزوآنزیم های مختلف، که در محیط های قلیایی عمل می کند، به طور

۱- دانش آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علـوم و تحقیقـات دانشـگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*۲- گروه پاتوبیولوژی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسـلامی، تهـران، ایـران ایران(sp.mortazavi@srbiau.ac.ir)

۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقـات دانشـگاه آزاد اسـلامی، تهـران، ایران

عمده در هپاتوسیت‌ها و سلول های اپیتلیوم مجاری صفراوی (ایزوآنزیم کبدی) حضور داشته و غالبا به غشای پلاسمایی متصل می‌باشد و با افزایش نفوذپذیری غشا، در اثر آسیب های کبدی، به سرم آزاد می شوند. افزایش سرمی فعالیت آنزیمی در نتیجه ی القای آنزیم ها، معمولا در اثر کلستاز، داروها و یا اثرات هورمونی رخ می دهد (۷).

در کلستاز انسدادی، ALP تقریبا متناسب با افزایش میزان بیلی روبین سرم به ۳-۲ برابر حد طبیعی یا بیشتر افزایش پیدا می کند. احتمال می رود که در سندرم کلستاز، احتباس اسیدهای صفراوی در کبد، سنتز آلکالین فسفاتازها را در سطح ترجمه ای القاء می کنند (۷). سلول های ستاره ای (فیبروبلاستیک) سلول های اصلی در روند فیبروژنز بافت کبد هستند. TGF-β یک تنظیم کننده مهم فنوتیپ و عملکرد فیبروبلاست است که در بسیاری از سلول ها تولید می شوند. در طیف گسترده ای از عملکردهای سلولی دخیل هستند. در پستانداران، سه ایزوفرم ساختاری مشابه TGF-β ، شامل TGF-β1، TGF-β2 و TGF-β3 هستند . اگرچه هر سه ایزوفرم در بافتهای فیبروتیکی بیان می شوند ، اما توسعه فیبروز بافتی در درجه اول به TGF-β1 نسبت داده می شود. (۳) TGF مهمترین فاکتور پیش فیبروتیک و میانجی درگیر در فیبروز می باشد و محرکی قوی برای تولید کلاژن۱ و ماتریکس خارج سلولی است و با فعال کردن HSCها در حین فیبروز به همراه فاکتور رشد پلاکتی منجر به سنتز بافت همبند و آپوپتوز سلول ها شده و در نهایی سبب گسترش فیبروز میگردد. مسیر های با واسطه TGF-β می تواند اهداف درمانی جذابی برای درمان بیماران مبتلا به شرایط فیبروتیکی باشد.

بز شاخدار با نام علمی Epimedium ، به عنوان دارویی در طب سنتی چینی استفاده می شده است. این گیاه شامل ترکیبات گلیکوزید فلاونوییدی همچون ایکارین ،اپیمدینB ، اپیمدینC می باشند که خاصیت آنتی اکسیدانی،ضد التهابی،ضد پیری و ضد توموری دارند، و در درمان پوکی استخوان، ناتوانی جنسی، نارسایی قلبی عروقی و تنظیم هورمون هاو تعدیل فعالیت ایمنی موثر اند. (۸)

با وجود پیشرفت های چشمگیر در درک فیبروز کبدی و تعیین اهداف برای درمان ، داروهای ضد فیبروتیک محدودی برای استفاده بالینی در بیماران مبتلا به بیماری پیشرفته کبد وجود دارد و گروه بزرگی از بیماران به درمان معمولی پاسخ نمی دهند و بنابراین در معرض خطر پیشرفت فیبروز به سیروز قرار می گیرند. آنتی اکسیدان ها قادر به تخریب ECM هستند. درمان ترکیبی که روی مکانیسم های مختلفی برای جلوگیری از فعالسازی سلول های ستاره ای و پاتوژنز فیبروز کبدی کار می کند مناسب تر است. (۹) هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات ضد فیبروزی عصاره گیاه بز شاخدار در موش های مدل انسداد مجاری صفراوی و بررسی تغییرات آنزیم های کبدی و TGF-β بود.

مواد و روش‌کار

حیوانات

در این مطالعه از ٤٠ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (Wistar) با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم استفاده شد. حیوانات به صورت تصادفی به ۸ گروه ۵ تایی شامل گروه کنترل سالم، ۳ گروه تجربی سالم تحت تیمار با دوز هایmg/Kg۱۰۰، ۲۰۰ و ٤٠٠ بز شاخدار، گروه BDL و ۳ گروه BDL تحت تیمار با دوز های ذکر شده تقسیم شدند. حیوانات از غذای مخصوص موش خریداری شده از شرکت خوراک دام پارس تغذیه شدند و آبخوری حاوی آب تمیز بدون محدودیت در اختیار حیوانات قرار داده شد. حیوانات تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ٦٠-٤٠ درصد، در قفس های فایبرگلاس به ابعاد ۳۵×۳۰×۱۵ سانتی متر نگهداری شدند. در طول دوره تحقیق موازین اخلاقی کار با حیوانات

آزمایشگاهی، رعایت گردید. به منظور سازگار شدن حیوانات با شرایط نگهداری جدید، پس از دو هفته کار عملی آغاز گردید.

عصاره گیری

۱کیلوگرم بز شاخدار از عطاری های مختلف شهر تهران خریداری شد و سپس جهت تایید، گیاه، به آزمایشگاه هرباریوم مجتمع آزمایشگاهی رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ارسال و مورد تایید قرار گرفت. برای تهیه عصاره هیدروالکلی در اتانول ۸۰٪ مخلوط و به مدت ۷۲ ساعت بر روی دستگاه شیکر IKA KS 260 basic شیک شد. سپس از کاغذ صافی رد شده و برای ۱/۵ ساعت در دستگاه روتاری IKA-WERKE قرار داده شد. در انتها مایع حاصل شده به مدت ٢٤ ساعت در فور ۵۰ درجه سانتی گراد خشک گردید و پودر به دست آمده در مقدار مشخصی از آب مقطر به عنوان حلال دارو مخلوط و به صورت گاواژ درون معده ای یک بار در روز تیمار گردید، به این صورت که هر ۲ گرم از پودر بز شاخدار در ۵۰ سی سی آب مقطر مخلوط شد و از محلول به دست آمده، ۰/۵ سی سی به دوز ۱۰۰، ۱ سی سی به دوز ۲۰۰ و ۵/۱ سی سی به دوز ٤۰۰ داده شد.

جراحی (Bile Duct Ligation (BDL و تیمار حیوانات

جراحی طبق روش استاندارد Uchinami و همکاران در سال ۲۰۰٦ انجام شد. به این منظور پس از طی دوره ۲ هفته ای سازگاری موش ها با محیط، حیوانات با ترکیب کتامین (۹۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. پس از شیو کردن و ضدعفونی کردن ناحیه، یک برش ۳ سانتی متری در خط میانی شکم زده شد و پوست و عضله از هم باز شد. سپس کبد کمی به بالا متمایل شد و پس از شناسایی مجرای مشترک صفراوی، مجرا، در دو مکان (بعد از انتهای مجرای صفراوی داخل کبدی و قبل از ورود مجرای پانکراس) توسط نخ بخیه سیلک ۰-٤ بخیه زده و مسدود شد و سپس فضای بین دو سایت قطع شد. در انتها ۳ سی سی محلول نرمال سالین ۱۰٪ در داخل خفره شکمی ریخته شد و عضله و پوست به ترتیب با نخ بخیه ویکریل قابل جذب ٤-۰ و نایلون غیر قابل جذب ۳-۰ بسته شد. از اسپری اکسی تتراسایکلین برای جلوگیری رت ها از جویدن بخیه استفاده شد. تمام حیوانات در طول آزمایش جان سالم به در بردند. . ۲-۳ روز پس از انجام BDL ادرار و گوش های حیوان به طرف زرد شدن رفتند که این نشانه ای دال بر موفقیت آمیز بودن جراحی بود. از فردای روز جراحی تیمار به صورت گاواژ درون معده ای با بز شاخدار آغاز گردید. بعد از اتمام دوره ٤۵ روزه و بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی، حیوانات با پنبه آغشته به کلروفرم آسان کشی شدند، بعد از آن بلافاصله حیوانات را در تشتک تشریح خوابانده و به وسیله قیچی در وسط قفسه سینه آن ها برشی داده شد و پس از ظاهر شدن قلب ،به طور مستقیم از داخل قلب با استفاده از سرنگ ۵ میلی لیتری، خون گیری انجام شد همچنین قسمتی از بافت کبد به جهت بررسی های ایمونوهیستوشیمی در محلول بافر فرمالین ۱۰٪ فیکس گردید.

بررسی سرمی ALP

به منظور اندازه گیری فعالیت سرمی آنزیم ALP نمونه های خون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق لخته شدند و سپس توسط دستگاه سانتریفیوژ دور ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، سرم نمونه ها جدا گردید و سطح سرمی این آنزیم بر اساس روش IFCC (فدراسیون بین المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی) توسط کیت اختصاصی مربوطه از شرکت پارس آزمون(ایران) و با دستگاه اتوآنالایزر(Italy، BT1500BT1500) اندازه گیری شد.

ارزیابی ایمونوهیستوشیمی

ایمونوهیستوشیمی روشی برای نشان دادن حضور و محل حضور پروتئین ها در برش های بافتی است و مشاهده فرایندها را در زمینه بافت دست نخورده ممکن می سازد. به این منظور بعد از تثبیت بافت مراحل آماده سازی بافت با استفاده از دستگاه اتوتکنیکون انجام گرفت و به روش رایج قالبهای پارافینی اسلاید بافتی تهیه و به روش استاندارد ایمنوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی TGF-β1 (ABCAM-USA) رنگ آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور تبدیل داده های کیفی به داده های کمی و استفاده در برنامه آماری، بیان TGF-β1 تعریف و درجه بندی شدند. برای تعیین درجه برای هر یک نمونه، از ۱۰ فیلد تصادفی استفاده شد و به روش زیر امتیاز دهی گردید:

درجه صفر ، منفی، عدم بیان TGF-β1 در هسته هپاتوسیتها،

درجه۱ ، کم، بیان TGF-β1 در کمتر از ۲۵٪ هسته هپاتوسیتها

درجه ۲ ، متوسط، بیان TGF-β1 در ۵۰- ٪۲۵ هسته هپاتوسیتها

درجه ۳ ، شدید، بیان TGF-β1 در ۷۵- ٪۵۰ هسته هپاتوسیتها

درجه ٤ ، خیلی شدید، بیان TGF-β1 در بیشتر از ۷۵٪ هسته هپاتوسیتها.

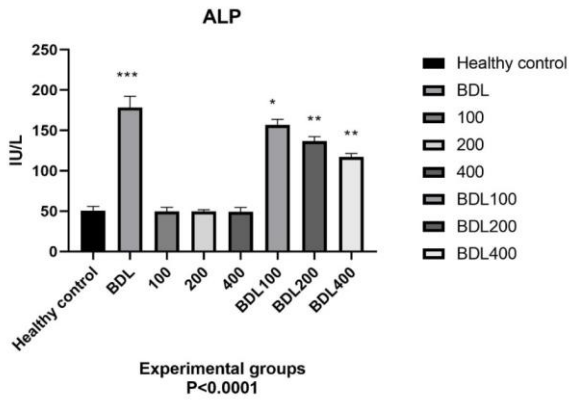
تجزیه و تحلیل آماری

تمام داده‌ها به لحاظ آماری با استفاده از آزمون one way Anowa و کروسکال والیس و برنامه آماری پریسم بررسی گردید. نتایج به صورت Mean ± S.E.M ارائه و ملاک استنتاج آماری ($p< 0.0001$). می باشد.

نتایج

میزان تغییرات ALP سرم

با توجه به نمودار ۱ ، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در گروهBDL در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی دار فعالیت آنزیم ALP ایجاد شد ($p< 0.0001$). تیمار حیوانات سالم در ۳ گروه با بز شاخدار در دوزهای ۲۰۰،۱۰۰mg/Kg و ٤۰۰ ، تغییر معنی داری را در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نکرد. در صورتیکه تیمار حیوانات BDL با بز شاخدار در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ٤۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت وابسته به دوز کاهش معنی داری را در فعالیت سرمی ALP نسبت به گروه BDL ایجاد نمود، به صورتی که بیشترین میزان کاهش این آنزیم در تیمار با بز شاخدار با دوز ٤۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه BDL بدست آمد ($p< 0.0001$)

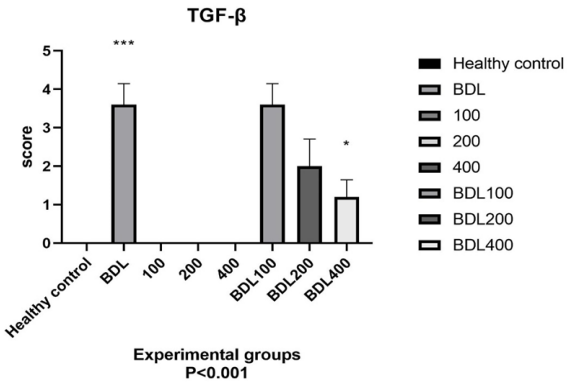


نمودار :۱ اثر تیمار خوراکی بز شاخدار در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ٤۰۰میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر فعالیت سرمی آنزیم ALP در رت های نر سالم و BDL

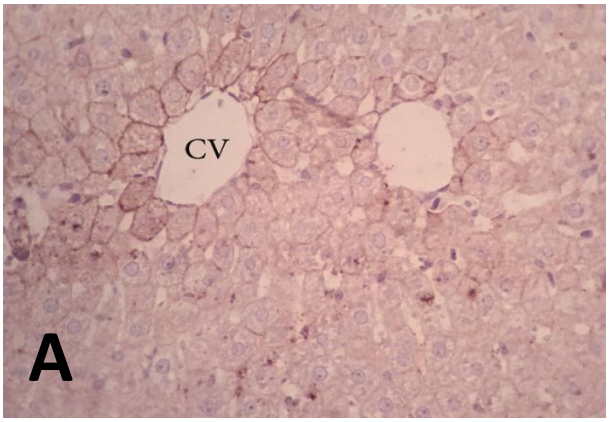
ایمونوهیستوشیمی

بعد از تهیه اسلاید های مورد نظر و بررسی زیر میکروسکوپ، بیان TGF-β در نواحی مختلف لام بررسی شد. با توجه به مقادیر معناداری شاخص TGF-β در آنالیز

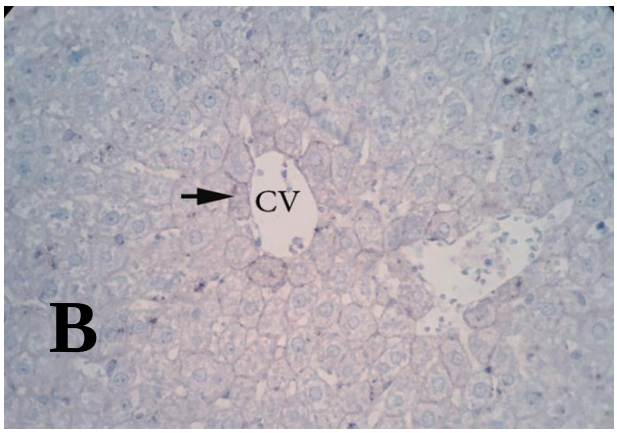
آماری گروه های مختلف، بیان این شاخص در گروه های مختلف تفاوت معناداری با یکدیگر داشت. علاوه بر آنالیز آماری، نمره به دست آمده نیز تفاوت معناداری در لام های کبد گروه های مختلف را نشان داد. نمودار ۲ تغییرات شاخص TGF-β در گروه های مختلف را نشان می دهد. در گروه های کنترل (نگاره ۱، A) و تجربی سالم تحت تیمار با دوز 100 mg/Kg، 200 و ٤٠٠ بز شاخدار (نگاره ۱، C-E) ، بیان TGF-β در هپاتوسیت های اطراف سیاهرگ مرکزی منفی بود معیار مثبت بودن بیان TGF-β1 قهوه ای شدن سیتوپلاسم حداقل۵۰٪ از هپاتوسیت ها می باشد، که در گروه های کنترل تیمار شده با بز شاخدار، بیان TGF-β1 منفی بود. به عبارت دیگر این گروه ها در بیان TGF-β با یکدیگر تفاوتی نداشتند. اما BDL به طور چشمگیری موجب افزایش بیان TGF-β در گروه کلستاز گردید (نگاره ۱، B). در گروه کلستاز بیان TGF-β در اطراف سیاهرگ مرکزی و نواحی فیبروزه به شدت مثبت بود وقهوه ای شدن سیتوپلاسم هپاتوسیت ها به میزان زیادی در نواحی فیبروزه و مجاری صفراوی کاذب دیده می شد.



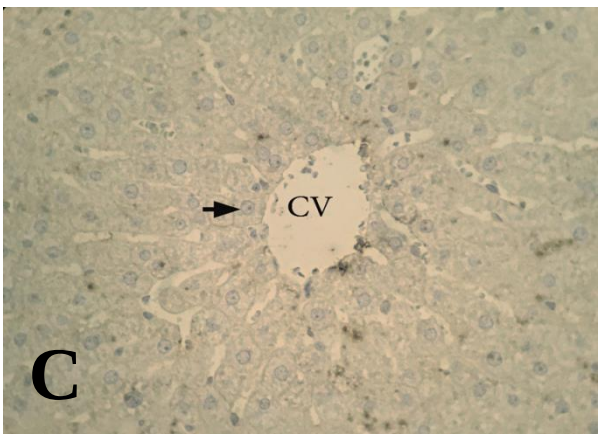
نمودار ۲: اثر تیمار خوراکی بز شاخدار در دوزهای100 mg/Kg، 200 و ٤٠٠ بر میزان بیان TGF-β در کبد گروههای مختلف مورد مطالعه($p< 0.0001$).



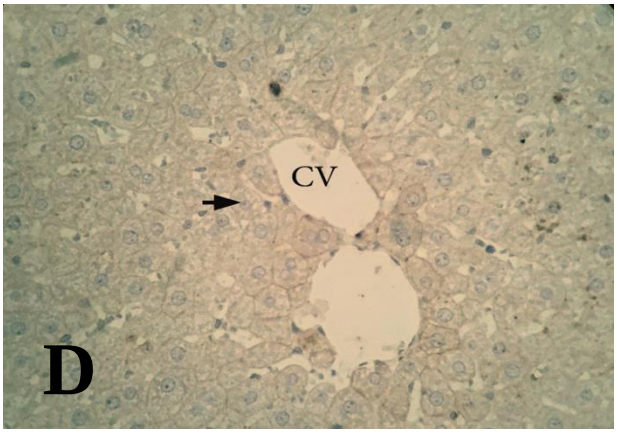
شکل A: گروه کنترل که عدم بیان TGF هپاتوسیتهای اطراف سیاهرگ مرکزی(CV) و دیگر هپاتوسیتها مشاهده می شود.



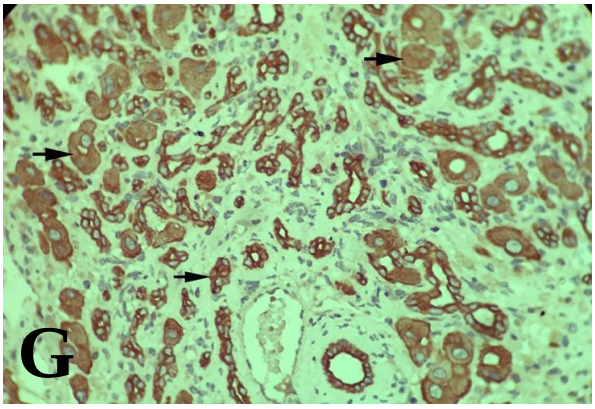
شکل B: گروه تجربی سالم۱۰۰ که عدم بیان TGF هپاتوسیتهای(پیکان) اطراف سیاهرگ مرکزی(CV) و دیگر هپاتوسیتها مشاهده می شود



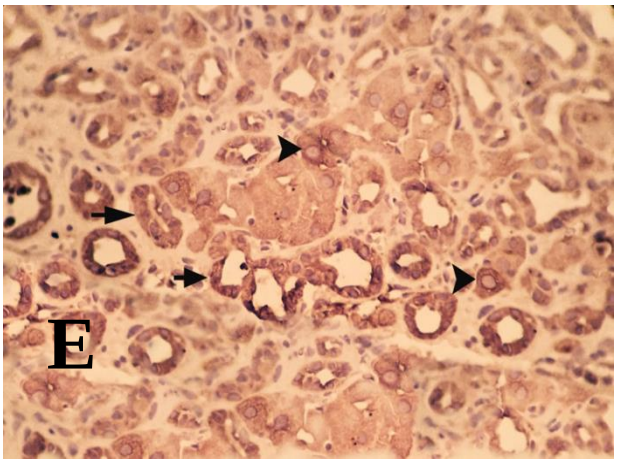
شکل C: گروه تجربی سالم۲۰۰ که عدم بیان TGF هپاتوسیتهای(پیکان) اطراف سیاهرگ مرکزی(CV) و دیگر هپاتوسیتها مشاهده می شود.

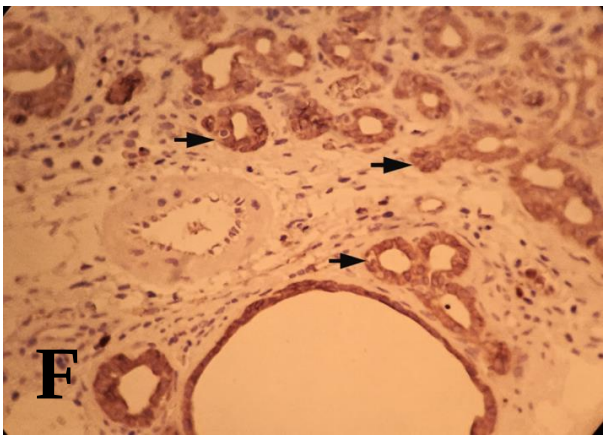


شکل D: گروه تجربی سالم۴۰۰ که عدم بیان TGF هپاتوسیتهای(پیکان) اطراف سیاهرگ مرکزی(CV) و دیگر هپاتوسیتها مشاهده می شود.

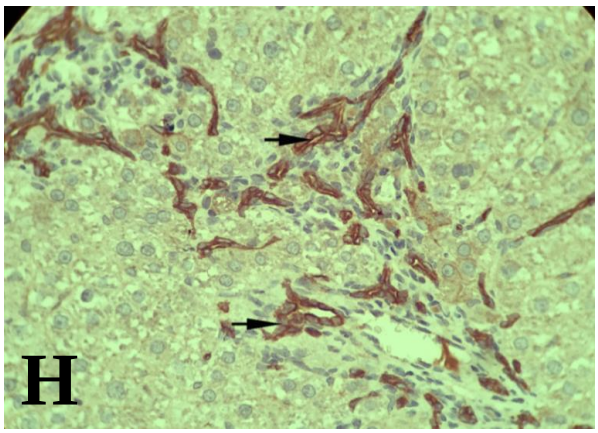


شکل G: گروه کلستاز و درمان با دوز ۱۰۰ که بیان شدیدTGF در سلولهای مجاری صفراوی هاپرپلاستیک(پیکان) مشاهده می شود .

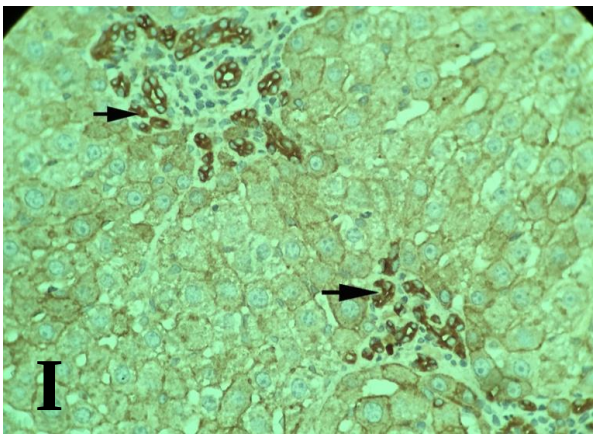




شکل E,F :گروه کلستاز که بیان شدید TGF در هپاتوسیتها(نوک پیکان) و سلولهای مجاری صفراوی هاپرپلاستیک(پیکان) مشاهده می شود.



شکلH :گروه کلستاز و درمان با دوز ۲۰۰ که بیان قابل توجهTGF در سلولهای مجاری صفراوی هاپرپلاستیک(پیکان) مشاهده می شود.



شکل I:گروه کلستاز و درمان با دوز ۴۰۰ که بیان کمTGF در سلولهای مجاری صفراوی هاپرپلاستیک(پیکان) مشاهده می شود.

بحث

در این مطالعه کلستاز و متعاقبا فیبروز کبدی توسط جراحی BDL به موشها القا گردید تا اثر ضد فیبروزی عصاره گیاه بز شاخدار بر فیبروز کبدی کلستاتیک بررسی شود. BDL از طریق تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) و افزایش بیان نشانگر های فیبروژنیک منجر به فیبروز کبدی می گردد.(٤)

آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که می توانند باعث تأخیر، جلوگیری و یا حذف آسیب اکسیداتیو به مولکول هدف شوند. سلول های فیبروتیک در مقایسه با سلول های طبیعی، سطح بالاتری از آسیب‌های اکسیداتیو را دارا هستند، لذا به نظر می رسد که در بیمارانی که از این آسیب ها رنج می‌برند، استفاده از مکمل های آنتی اکسیدانی مفید خواهد بود. (١٠) پلی ساکارید های استخراج شده ار بز شاخدار دارای آنتی اکسیدان های طبیعی هستند و مورد استفاده قرار می گیرند.(١١) اندازه گیری سطح ALP سرم ابزاری غیر مستقیم برای ارزیابی وضعیت کبد است. احتباس و تجمع اسید های صفراوی آبگریز در داخل هپاتوسیت ها در طی کلستاز مدتهاست که به عنوان یکی ازمهمترین عوامل آسیب کبدی در این بیماری مطرح شده است.. اسید های صفراوی می توانند غشای سلولی را از طریق عمل شویندگی خود بر روی اجزای لیپیدی مختل کنند و باعث تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) شوند که به نوبه خود، به طور اکسیداتیو لیپیدها ، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک را تغییر داده و در نهایت باعث آپوپتوز کبدی می شوند. علاوه بر این ، آنها می‌توانند سلولهای کوپفر را برای تولید ROS فعال کنند ، که ممکن است بیشتر به نابودی هپاتوسیت‌ها کمک کند. (١٠)

آسیب های ساختاری و عملکردی ناشی از اسید های صفراوی هیدروفوب به غشای هپاتوسیت ها از طریق تولید ROS، نقش مهمی در پاتوژنز بیماریهای کبدی کلستاتیک دارد . در هپاتوسیت ها، هنگامی که غلظت اسید های صفراوی آبگریز بیش از ظرفیت اتصال پروتئین های سیتوزولی باشد، این ترکیبات احتمالاً به غشاهای ارگانل آسیب می رسانند (١٢). آنزیم ALP از گروه آنزیم های القایی کبد، آنزیمی است که به غشای هپاتوسیت ها متصل است، در نتیجه در اثر آسیب به غشای هپاتوسیت، سطح سرمی آن افرایش می یابد. بعد از ٤٥ روز از شروع آزمایش، گروه BDL افزایش چشمگیری را در سطح ALP سرم نشان داد. درمان رت های گروه BDL با دوز های مختلف عصاره گیاه بز شاخدار به طور قابل توجهی و به صورت وابسته به دوز منجر به کاهش سطح سرمی آنزیم ALP گردید. نتایج مطالعات قبلی بر روی بز شاخدار نشان داد که ایکارین جدا شده از اپیمدیوم کورنئوم فعالیت آنتی هپاتوتوکسیک و محافظتی از کبد داردو در محیط کشت سلول های کبدی موش مسموم با تتراکلرید کربن از عصاره ی این گیاه استفاده شد ،در پایان مشاهده شد که میزان آنزیم های ALT و SDH کاهش چشم گیری داشته و از سلول های کبدی در برابر سمیت محافظت ٧٦ درصدی به عمل آمده است و از طریق اندازه گیری سیتوکروم P-450 و گلوتاتیون –S– ترانسفراز فعالیت آنتی هپاتوتوکسیکی ایکارین ثابت شد(١٣) در مطالعه دیگری خواص استروژنی عصاره های آبی و اتانولی گونه های brevicornum Epimedium ثابت شد واین اثر استروژنی سبب تحریک گیرنده استروژن و همچنین سرکوب فاکتور نکروز تومور (TNF) میشود که می تواند از آپوپتوز سلول ها جلوگیری نماید.(١٤) پلی ساکارید – پروپولیس فلاون(EPI) اپیمدیوم

در دوزهای بالا و متوسط می تواند به طور قابل توجهی تیتر آنتی بادی و غلظت IgG، IgM و IL-6 را در۳ دسته جوجه ای که با سیکلوفسامید تزریق شده بودند افزایش دهد ، باعث تکثیر لنفوسیت ها و بزرگ شدن اندام ایمنی بدن در مقایسه با گروه کنترل شود و موجب کاهش ادم و پیشروی التهاب در بافت گردد(۱۵)). نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات ذکر شده در رابطه با نقش محافظت کبدی و آنتی اکسیدانی عصاره گیاه بز شاخدار، همسو بود. سلولهای ستاره ای کبدی (HSC) که در گذشته سلول های Ito نامیده می شدند، منبع اصلی اجزای ماتریکس خارج سلولی هستند. آزاد سازی ROS به همراه ترشح سایتوکین ها و فاکتور های رشد (مانند PDGF، TGF-β، فاکتور رشد بافت همبند (CTGF)، اینترلوکین-٦ (IL-6) و اینترلوکین ۱۳ IL-13)) و سلول های ایمنی در طول فاز التهابی به عنوان محرک فعال سازی سلول های ستاره ای و رسوب کلاژن در فیبروز شناخته شده است. از این بین، TGF-β قوی ترین سایتوکین پیش فیبروزی است. حضورROS میتواند باعث فعال شدن مسیر های سیگنال دهنده TGF-β شود که این مسیر ها شامل مسیر های وابسته به Smad و یا مسیر های غیر وابسته به Smad می باشد. بیان TGF-β منجر به تکثیر و انتقال فیبروبلاست ها به میوفیبروبلاست، تولید و رسوب بیش از حد ماتریکس خارج سلولی شده و فیبروز رخ می دهد. همچنین TGF-β به عنوان مولکول شرکت کننده در تولید ROSداخل سلولی است و از این طریق نیز باعث القای فبیروز می گردد. (۱۰)

ایکاریین که از بز شاخدار جدا شده است دارای چندین کارکرد محافظتی است و موجب اصلاح نقص اندوتلیال ، مهار تکثیر و مهاجرت سلولهای عضلانی صاف ، سرکوب کردن تشکیل سلولهای فومی مشتق از ماکروفاژها و واکنشهای التهابی است و همچنین از فعال شدن پلاکت جلوگیری می کند وآن را به یک داروی عالی برای درمان های قلبی عروقی تبدیل کرده است هم چنین دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی می باشد. خاصیت آنتی اکسیدانی این گیاه سبب حفظ غشای هپاتوسیت ها در مقابل اکسیدان ها می شود بنابراین سبب کاهش سطح آنزیم ها می گردد.(١٦) ایکارین موجود در بز شاخدار فعالیت ضد توموری قدرتمندی را در کلاسهای بسیار وسیع از انواع سلولهای سرطانی مانند معده، کبد ، کیسه صفرا ، روده بزرگ ، پستان ایفا می کند و یک ترکیب با راندمان بالا در پیشگیری و درمان سرطان است(۱۷)

مطالعات گذشته به خوبی نشان می دهد که BDL منجر به افزایش قابل توجه بیان TGF-β در بافت کبد می شود. در این مطالعه نیز جراحی BDL از طریق تجمع اسید های صفراوی در کبد و تولید ROS ، منجر به افزایش بیان این شاخص در گروه BDL گردید. در حالیکه تیمار رت های گروه BDL با دوز های ۲۰۰ و ٤۰۰ میلی گرم/کیلوگرم بز شاخدار توانست به طور معناداری بیان این سایتوکاین را کاهش دهد. تا به امروز اثر عصاره گیاه بز شاخدار بر شاخص های ایمونوهیستوشیمی بررسی نشده است. اما مطالعات قبلی بر روی سایر ترکیبات معدنی و گیاهی با خاصیت آنتی اکسیدانی بر شاخص TGF-β با نتایج مطالعه حاضر همسو بود بطور مثال در مطالعه ی ونگ بر روی یک مدل نارسایی حاد کبدی ALFدر موش های صحرایی نشان داد که ایکارین موجود در اپیمدیوم پتانسیل افزایش سلول بنیادی مزانشیمی (MSC) را دارد و سبب ترمیم و بازسازی سلول ها و کاهش آسیب کبدی شده و بقای موش های ALF را افزایش میدهد که این مکانیسم احتمالا با فعالیت آنتی اکسیدانی آن ها، توانایی آن ها در کاهش سطح TGF-

βو مهار سنتز کلاژن همراه است. (۱۸) نتایج این مطالعه اثرات وابسته به دوز ضد فیبروزی عصاره گیاه بز شاخدار را در کبد کلستاتیک نشان می دهد. گیاه بز شاخدار احتمالا بواسطه سرکوب کردن سایتوکان هایی همچون TNF-αتوسط این گیاه بطور معنا داری بیان TGF-β در رت های BDL کاهش یافت ،هم چنین بنا بر خاصیت ضد التهابی این گیاه از بروز آپوپتوز هپاتوسیت ها ممانعت بعمل می آورد و تشکیل آبشار سیگنال دهنده داخل سلولی و بیان TGF را مهار میکند و با جلوگیری کردن از رسوب فیبروبلاست سبب کاهش تولید و رسوب کلاژن در کبد و در نهایت بهبود فیبروز می گردد. همچنین به نظر می رسد این گیاه با افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کبد و حفظ پایداری و ثبات غشای هپاتوسیت ها و موجب بهبود سطح سرمی آنزیم ALPگردید. به نظر می رسد این اثرات گیاه بز شاخدار به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی و حذف کنندگی رادیکال های ازاد توسط این گیاه باشد که این اثرات احتمالا به ترکیبات فلاونوییدی و ایکارین موجود در گیاه بر می گردد. . از بین دوز های مورد استفاده بز شاخدار ، دوز 100 میلی گرم/کیلوگرم بدون تأثیر و دوز های 200 و 400 میلی گرم/کیلوگرم به طور معناداری بیان TGF-β را در رت‌های BDL کاهش دادند و از فیبروز کبدی پیشگیری کردند. نتیجه اینکه گیاه بز شاخدار می تواند به عنوان یک داروی پیشگیری کننده با اثرات ضد فیبروزی برای بیماران مبتلا به کلستاز کبدی در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

فهرست منابع

1. Tomur A, KantermM, Gurel A, Erboga M. The efficiency of CAPE on retardation of hepatic fibrosis in biliary obstructd rats. G Mol Histol. 2011; 42(5):451-8.
2. Tag CG, Weiskirchen S, Hittatiya K, Tacke F, Tolba RH, Weiskirchen R. Induction of experimental obstructive cholestasis in mice. Laboratory animals. 2015;49(51): 70-80
3. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis N.G. TGF-β signaling in fibrosis. PMC. 2011; 29(5): 196-202.
4. Yanguas S, Cogliati B, Willebrords J, Maes M, Colle I, van den Bossche B, Oliveira C, Andraus W, Alves V Leclercq L, Vinken M. Experimental models of liver fibrosis. PMC. 2016;90(5): 1025-1048.
5. Chen WY, Chen CJ, Liao JW, Mao FC. Chromium attenuates hepatic damage in a rat model of chronic cholestasis. Life Sci 2009;84:606–14.
6. Shah R, John S. Cholestatic Jaundice (Cholestasis, Cholestatic Hepatitis). In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2019.
7. Kenneth S. Latimer. Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical PATHOLOGY. Fifth edition. 2011.
8. Meng FH, Li YB, Xiong ZL, Jiang ZM, Li FM. Osteoblastic proliferative activity of Epimedium brevicornum Maxim. Phytomedicine. 2005 Mar 22;12(3):189-93.
9. Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. Chem Biol Interact 2011:193:225_31.
10. Morry J, Ngamcherdtrakul Worapol, Yantasee W. Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. Elsevier. Redix Biology. 2017;11:240-253.
11. Lu Y, Wang D, Hu Y, Huang X, Wang J. Sulfated modification of Epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV. Carbohydrate Polymers. 2008 Jan 24;71(2):180-6.
12. Perez MJ, Briz O. Bile-acids-induced cell injury and protection. World J Gastroenterol. 2009; 15(14): 1677-1689.

13. Lee MK, Choi YJ, Sung SH, Shin DI, Kim JW, Kim YC. Antihepatotoxic activity of icariin, a major constituent of Epimedium koreanum. Planta medica. 1995 Dec;61(06):523-6.
14. Cohen I, inventor; Bionovo Inc, assignee. Method of using extracts of Epimedium species. United States patent application US 11/298,957. 2006 Jun 22.
15. Fan Y, Lu Y, Wang D, Liu J, Song X, Zhang W, Zhao X, Nguyen TL, Hu Y. Cell Immunol. 2013 Jan;281(1):37-43. doi: 10.1016/j.cellimm.2013.01.008. Epub 2013 Feb 4..
16. Fang J, Zhang Y. Icariin, an anti-atherosclerotic drug from chinese medicinal herb horny goat weed. Frontiers in pharmacology. 2017 Oct 12;8:734.
17. Jung YY, Lee JH, Nam D, Narula AS, Namjoshi OA, Blough BE, Um JY, Sethi G, Ahn KS. Anti-myeloma effects of icariin are mediated through the attenuation of jak/stat3-dependent signaling cascade. Frontiers in pharmacology. 2018 May 30;9:531.
18. Wang L, Li S, Wang HY, Zeng J, Zhang ZZ, Lv DY, Kuang WH.Evid Based Complement Alternat Med. 2019 Nov 7;2019:4253846. doi: 10.1155/2019/4253846. eCollection 201.