مجله دیابت و متابولیسم ایران. فروردین- اردیبهشت ۱۳۹۷؛ دوره ۱۷ (شماره ۴) ۱۹۷-۱۸۹

مقاله پژوهشی

اثر عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری بر آسیب‌شناسی بافتی و فعالیت آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان

هانیه سادات باقریه حق[۱]، سیما نصری[۱]، پریسا کریشچی خیابانی*[۲]

چکیده

مقدمه: با توجه به پیشرفت روزافزون دیابت و لزوم استفاده از داروهای جایگزین و کم خطر گیاهی، در این مطالعه‌ی تجربی اثر عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری (Rosmarinus Officinalis L) بر آسیب‌شناسی بافتی و فعالیت آنزیم‌های کبدی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی ۵۰ عدد موش صحرایی نر از نژاد ویستار با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۱۰ تایی شامل کنترل سالم، کنترل دیابتی و ۳ گروه تجربی (دیابتی تیمار شده با دوزهای 50 mg/kg، 100 mg/kg و 200 mg/kg عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری) تقسیم شدند. فعالیت و تغییرات آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP در همه‌ی گروه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. سپس مقاطع عرضی میکروسکوپیک از بافت کبد تهیه و مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: فعالیت آنزیم های کبدی (ALT، ASTو ALP) در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل غیردیابتی افزایش معنی داری داشت ($P<0.01$). استفاده از عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری باعث کاهش معنی‌دار میزان آنزیم‌های کبدی در فعالیت آنزیم‌ها و ترمیم بافت کبد موش‌های دیابتی شده است ($P<0.01$).

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری در موش‌های دیابتی می‌تواند فعالیت آنزیم های کبدی را تعدیل کند. همچنین در حالت ابتلاء به دیابت، این عصاره اثر ترمیمی بر بافت کبد از خود نشان داد. از خواص فارماکولوژیکی و اثر ضد التهابی عصاره‌ی رزماری می‌توان در جلوگیری از التهاب کبدی ناشی از دیابت استفاده نمود.

واژگان کلیدی: عصاره‌ی رزماری، کبد، آنزیم های کبدی، موش صحرایی، دیابت

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم، دانشگاه پیام نور تهران شرق، تهران، ایران

۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، تهران، ایران

***نشانی**: تهران، حکیمیه، خیابان سازمان آب، خیابان ۱۵متری شیرازی، پلاک ۳- کد پستی: ۱۶۵۹۶۳۹۸۸۴ -شماره تماس گویا: ۷۷۳۱۸۵۸۱، پست الکترونیک: parisakerishchi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۹ **تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹۷/۰۲/۱۸** **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۰۷**

مقدمه

دیابت یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر و ایجاد هزینه‌های مالی در جامعه است که به‌علت رشد جمعیت، شهرنشینی، چاقی و عدم فعالیت بدنی و افزایش سن در حال ازدیاد می‌باشد [۱]. دیابت شیرین یکی از اختلالات شایع در جهان است که تخمین زده می شود حدوداً ۳۰۰ میلیون نفر در سال ۲۰۲۵ مبتلا به این بیماری خواهند شد [۲]. در واقع؛ دیابت نوعی اختلال مزمن در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین است که مشخصه آن افزایش قند خون در بیماران می‌باشد. این بیماری به‌دلیل عدم جذب سلولی قند خون ناشی از کاهش ترشح انسولین و یا مقاومت سلول‌های بدن در برابر انسولین ایجاد می‌شود [۳]. با وجود اینکه انسولین و داروهای خوراکی شیمیایی پایین آورنده‌ی قند خون مانند بی گوانیدها، سولفونیل اوره‌ها، تیازولیدین دیون‌ها و مهار کننده‌های آلفاگلوکوزیداز اساس درمان دیابت را تشکیل می‌دهند، اما اثرات جانبی مهمی دارند و نمی‌توانند مسیر عوارض دیابت را به‌طور قابل توجهی تغییر دهند [٤]. کبد یکی از اندام‌هایی است که در بیماری دیابت دچار آسیب می‌گردد [٦] و اندام مهمی است که حذف آن باعث مرگ فوری فرد خواهد شد [۷]. کبد عضو قهوه‌ای مایل به قرمز با چهار لوب نابرابر از نظر شکل و اندازه و بزرگترین اندام داخلی بدن و فرمی صاف و مثلثی شکل داشته و نیز به‌عنوان یک سیستم بافری مهم برای گلوکز خون عمل می‌کند [۸].

حساس‌ترین و پرمصرف ترین آنزیم‌های تشخیصی کبد، آمینوترانسفرازها (ترانس آمینازها) هستند که باعث کاتالیز واکنش های شیمیایی در سلول‌ها می‌شوند که در آن گروه آمین از یک مولکول دهنده به مولکول گیرنده منتقل می‌گردد. به همین دلیل به آنها آمینوترانسفراز گفته می‌شود. آنزیم‌های کبدی، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) هستند که از شاخص‌های حساس عملکرد کبد در بدن می‌باشد. این آنزیم‌ها به‌طور معمول داخل سلول‌های کبدی قرار دارند و زمانی که کبد دچار آسیب می‌شود، سلول‌های کبدی این آنزیم‌ها را وارد جریان خون می‌کنند. در واقع در افراد مبتلا به دیابت میزان این آنزیم‌ها افزایش می‌یابد و بالارفتن سطح آنزیم‌ها در خون نشانه‌ی آسیب کبدی است. [۹]. در افراد مبتلا به دیابت، میزان آنزیم‌های کبدی ذکر شده نسبت به افراد غیر دیابتی افزایش می‌یابد [۱۰]. در بیماری دیابت به‌دلیل مقاومت به انسولین، افزایش گلوکز خون و عدم تعادل متابولیکی گلوکز، عملکرد کبد دچار اختلال می‌شود [۱۱]. بنابراین می‌توان گفت، در افرادی که مبتلا به بیماری دیابت می‌باشند، افزایش انسولین باعث ایجاد سیروز کبدی می‌شود [۱۳]. با توجه به اینکه داروهای تهیه شده‌ی صنعتی کاهش دهنده‌ی قندخون، باعث بروز عوارض جانبی در مصرف کننده می‌شوند و قادر به جلوگیری از آسیب‌های کبدی نیستند [١٤]، در طول تاریخ از گیاهان متفاوتی برای کاهش قند خون و بهبود اثرات دیابت استفاده شده و در طب سنتی ایران و سایر کشورهای جهان، اطلاعات کمابیش مفصلی در این رابطه به چشم می‌خورد. داروهای گیاهی به خاطر کم بودن اثرات جانبی، در دسترس بودن، هزینه‌ی نسبتاً کم و مؤثر بودنشان، به‌طور وسیع در سرتاسر جهان تجویز شده و می‌شود [۱۵].

رومارن یا اکلیل کوهی و با نام عمومی رزماری و نام علمی (Rosmarinus Officinalis L.) از خانواده‌ی نعناعیان (Lamiaceae) که بومی منطقه‌ی مدیترانه و کشور اوروگوئه بوده [١٦] و گیاهی پایا و معطر است که به‌صورت بوته‌ای و دارای ساقه‌های چوبی به ارتفاع ۱-۰/۵ متر و به حالت خودرو می‌روید [۱۷]. قسمت مورد استفاده آن برگ و سرشاخه‌های گل دار آن است و اسانس آن از قسمت هوایی تهیه می‌شود [١٦]. رزماری یک منبع خوب از ویتامین E و آنتی اکسیدان های قوی و عوامل ضد التهابی می‌باشد که اسیدهای طبیعی داخل این گیاه کمک می کند به سلول‌های بدن و DNA تا از آسیب رادیکال‌های آزاد در امان باشند [۱۸]. مصرف رزماری موجب سهولت ترشح و دفع صفرا می‌شود و از این جهت از آن در بیماری‌های یرقان و نارسایی اعمال کبد استفاده می‌کنند ولی بهتر است که رزماری در دوران بارداری، شیردهی و در بیماران صرعی و فشار خون بالا به کار نرود [۱۷، ۱۹، ۲۰].

با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در زمینه‌ی تأثیر برگ گیاه رزماری (Rosmarinus Officinalis L.) برروی آسیب شناسی بافتی و آنزیم‌های کبدی در افراد دیابتی صورت نگرفته است؛ این مطالعه به‌منظور بررسی اثرات عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه رزماری (Rosmarinus Officinalis L.) بر آسیب شناسی بافتی و میزان آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان صورت گرفته است.

روش‌ها

جمع آوری گیاه: گیاه رز ماری با نام علمی (Rosmarinus Officinalis L.) از شهر بابل در شمال ایران جمع آوری شد و پس از اطمینان از جنس و گونه گیاه، از آن عصاره‌ی هیدروالکلی تهیه شد. برای عصاره گیری برگ گیاه رزماری، گیاه باید کاملاً سالم و عاری از هرگونه مواد خارجی، آفت و بیماری باشد.

آماده سازی عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه رزماری

عصاره‌گیری به روش ماسترا سیون انجام شد. به این صورت که پس از جمع‌آوری گیاه از استان مازندران، پس از شستشوی گیاه با آب فراوان و مجدداً نیز با آب‌مقطر، گیاه رزماری حدوداً ۱۰ تا ۱۵ روز در سایه قرار می‌گیرد تا خشک شود. بعد از اینکه گیاه کاملاً خشک شد، آسیاب شده و آن را در ظرفی از جنس مناسب (شیشه، استیل، چینی و غیره) ریخته و مقدار معینی از حلال اتانول به نسبت ۱:۱۰ ،۱:۱۵ و یا ۱:۲۰ بر روی آن ریخته می شود.

برای اینکه از تغییرات شیمیایی، در اثر فعل و انفعالات شیمیایی حاصل از تابش نور بر روی مواد متشکله گیاهی، جلوگیری شود، عصاره‌گیری را در مکانی که از تابش مستقیم خورشید در امان باشد انجام گردید و با محکم کردن درب ظرف عصاره‌گیری و پو شاندن آن با فویل، از تبخیر حلال جلوگیری شد. سپس از دستگاه شیکر برای تکان دادن نمونه استفاده شد و به‌مدت ۴۸ ساعت با دور ۱۲۰ و در دمای اتاق عصاره‌گیری شد و بعد از این زمان که تعادل غلظت مواد موجود در حلال و بافت گیاهی برقرار شد، عمل عصاره گیری خاتمه یافته و سپس عصاره‌ی حاصل را با کاغذ واتمن چندین بار صاف نموده و در مرحله‌ی بعد، به‌وسیله دستگاه روتاری اواپراتور حلال پرانی انجام می شود. درنهایت؛ عصاره به غلظت مورد نظر رسیده و برای تهیه دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری در آب مقطر به‌عنوان حلال، حل گردید.

حیوانات

در این پژوهش از موش‌های نر نژاد ویستار با محدوده‌ی وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم که از ستیتو پاستور ایران خریداری شد، استفاده گردید. درجه‌ی حرارت نگه‌داری آنها با وسایل گرمایشی و سرمایشی مناسب در شرایط استاندارد نزدیک به ۲۵-۲۰ درجه‌ی سانتیگراد فراهم شد. با نوردهی مصنوعی و تایمر اتومات شرایط نوردهی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی ایجاد شد. موش‌ها در قفس‌های مخصوص پوشیده شده از پوشال، نگه داری شدند و آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. تمامی آزمایش‌ها پس از یک هفته از استقرار حیوانات و سازش با شرایط محیط جدید انجام شد. پس از پایان مرحله‌ی تیمار، تمامی حیوانات مورد آزمایش با استفاده از کلروفرم بیهوش و خون‌گیری از آنها به‌عمل آمد. در مرحله‌ی آخر با استفاده از روش مرگ آسان، کشته شدند و بلافاصله اندام کبد از بدن جدا شد و در فرمالین ۱۰درصد جهت اقدامات بعدی قرار گرفت.

القای دیابت: جهت القای دیابت، ۰/۵ گرم از پودر آلوکسان را روی ترازو وزن کرده و در ۱۰ سی سی سرم فیزیولوژی حل و سپس به چهار گروه تجربی تزریق شد تا مبتلا به دیابت شوند. پس از ۷۲ ساعت از تزریق آلوکسان، از بخش انتهایی دم موش ها نمونه گیری به‌عمل آمد و قندخون ناشتای حیوانات به‌وسیله دستگاه گلوکومتر Medisign اندازه‌گیری شد. ملاک دیابتی شدن موش‌ها قندخون بالاتر از ۲۰۰mg/dl بود.

نحوه‌ی گروه بندی و انجام مطالعه: دراین پژوهش از ۵۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن حدود ۲۰۰-۲۵۰ گرم استفاده شد و موش‌ها به ٤ گروه تحت مطالعه و یک گروه کنترل؛ یعنی ۵ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه‌های تحت مطالعه ۱۲۰mg/kg داروی آلوکسان (جهت دیابتی شدن) و پس از اطمینان از ابتلا به دیابت موش‌ها، به‌ترتیب به‌مدت ١٤ روز، دوزهای ۵۰mg/kg، ۱۰۰mg/kg و ۱۰۰mg/kg عصاره‌ی رزماری دریافت کردند. در موش‌های گروه شاهد و گروه دیابتی تزریق درون صفاقی سرم فیزیولوژی به خاطر یکسان بودن شرایط آزمایش، انجام و آب و غذای معمولی تهیه شده از شرکت دام و طیور پارس در اختیار گروه‌ها قرار داده شد.

خون گیری و آزمایش‌های بیوشیمیایی: پس از تیمار موش‌های صحرایی و پایان آزمایش، با استفاده از سرنگ خون گیری، از قلب حیوانات نمونه گیری به‌عمل آمد. سپس لوله‌های آزمایش را به‌صورت متقارن در داخل سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۲۰ دقیقه قرار می‌دهیم تا سرم خون جدا شود. سپس، جهت اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی ALT, AST, ALP با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر و کیت آنزیمی پارس آزمون، میزان آنزیم‌های موردنظر اندازه‌گیری شد.

آز مایش های هیســـتولوژی: پس از بیهوش کردن موش ها و خونگیری از بطن چپ قلب آنها، اندام کبد خارج و جهت تثبیت، در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. از بافت کبد گروه‌های مورد مطالعه، برش‌هایی با ضـــخامت ۵ میکرون تهیه و رنگ آمیزی با هماتوکسیلین ائوزین، صورت گرفت. آسیب شناسی بافتی مقاطع با استفاده از میکرو سکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت و در پایان پس از بررســـی تمامی اســـلایدهای مقاطع بافتی تغییرات هیستومورفولوژی کبد، ثبت و گزارش شد.

تحلیل آماری

در این پژوهش جهت ارائه نتایج، داده ها به کمک نرم افزار SPSS توسط روش آمار تحلیلی و آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) تجزیه و تحلیل شد و به‌دلیل برابر بودن اختلاف واریانس‌ها، از تســت تعقیبی Tukey اســتفاده و نتایج به‌صــورت میانگین± خطای استاندارد میانگین گزارش شد.

یافته‌ها

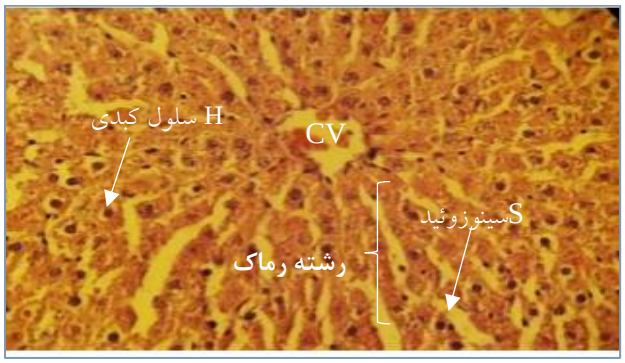
میزان فعالیت آنزیم آلانین آمینو تراتســـفراز :ALT میزان ALT سرم خون گروه کنترل دیابتی در مقایسه با ALT سرم خون گروه کنترل سالم، افزایش معنی‌داری یافته است (P<0.01) ولی میزان ALT ســـرم خون گروه‌های دیابتی دریافت کننده‌ی دوزهای ۵۰ mg/kg، ۱۰۰ mg/kg و ۲۰۰ mg/kg عصـــاره‌ی رزماری نیز، افزایش معنی‌داری نیافته اســـت (P>0.01). این موضـــوع بیانگر آســـیب بافت کبد و اثر تعدیل کننده عصـــاره‌ی گیاه رزماری در فعالیت آنزیم در شـــرایط دیابتی بودن بیمار می‌باشـــد. تفاوت معنی‌داری بین سطح آنزیم ALT گروه دریافت کننده‌ی دوز ۱۰۰ mg/kg عصاره ی رزماری با گروه کنترل ســـالم وجود نداشـــت و این بیانگر این موضـــوع می‌باشـــد که عصـــاره‌ی رزماری اثر تعدیل کننده‌ای در موش‌های دیابتی دارد.

میزان فعالیت آنزیم آسپارتات آمینو تراتسفراز :AST میزان آنزیم AST ســـرم خون گروه کنترل دیابتی در مقایســـه با میزان آنزیم AST گروه کنترل سالم افزایش معنی‌داری یافت (P<0/01) و این نشـــان می‌دهد که آنزیم AST در ســـرم خون گروه کنترل دیابتی افزایش می‌یابد. همچنین میزان آنزیم AST در ســـرم خون گروه های تجربی تیمار شـــده با دوزهای ۵۰ mg/kg، ۱۰۰ mg/kg و ۲۰۰ mg/kg عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری (Rosmarinus Officinalis) نســـبت به میزان آنزیم AST در خون گروه کنترل دیابتی کاهش معنی‌داری وجود دارد (P<0/01) واین یعنی اینکه این ســـه دوز گفته شـــده در کاهش آنزیم AST مؤثر بوده‌اند. تفاوت معنی‌داری بین سطح آنزیم AST در گروه دیابتی دریافت کننده‌ی دوز ۲۰۰ mg/kg عصـــاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری و گروه کنترل غیر دیابتی وجود نداشت.

میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسـفاتاز :ALP افزایش معنی‌داری در میزان آنزیم ALP ســـرم خون گروه کنترل دیابتی در مقایســـه با میزان آنزیم ALP ســـرم خون گروه کنترل ســـالم وجود دارد (P<0/01) و این مسأله نشان می‌دهد که این آنزیم ALP در سرم خون گروه کنترل دیابتی افزایش یافته اســـت. همچنین کاهش معنی‌داری در میزان آنزیم ALP ســـرم خون گروه های تجربی تیمارشـــده با دوزهای ۵۰ mg/kg، ۱۰۰ mg/kg و ۲۰۰ mg/kg عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری (Rosmarinus Officinalis) در مقایسه با میزان آنزیم ALP در خون گروه کنترل دیابتی وجود دارد (P<0/01) که این مسـأله نشـان می‌دهد که این سـه دوز در کاهش آنزیم ALP سـرم خون گروه‌های تجربی، مؤثر بوده‌اند. از بین گروه‌های دیابتی دریافت کننده عصـــاره، دوز ۲۰۰ mg/kg عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری همانند موارد قبل، مؤثرترین دوز است، به‌طوری که نسبت به گروه غیر دیابتی اختلاف معنی داری نداشت (P>0.01).

۱- بررسی ساختار بافت شناسی کبد در گروه‌های مختلف مورد بررسی

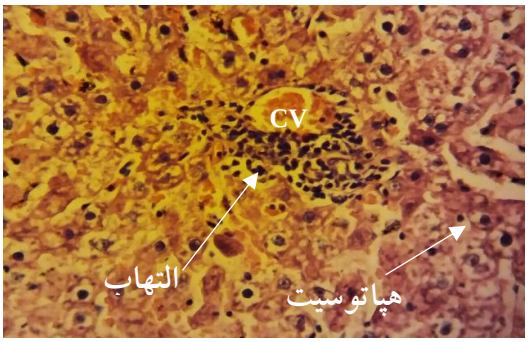
بررسی هیستومورفولوژیک بافت کبد در بین دو گروه کنترل غیردیابتی و دیابتی و سه گروه تجربی دریافت کننده دوزهای ۵۰ mg/kg، ۱۰۰ mg/kg و ۲۰۰ mg/kg عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری نتایج زیر را نشان داد.



شکل ۱- مقطع عرضی یک لبول کبدی در گروه کنترل سالم که دارای ساختاری طبیعی بوده و با بزرگنمایی ۱۰۰* می‌باشد. ساختار لبول کبدی، ورید مرکزی CV، سلول کبدی H، سینوزوئید S

۱-۱- گروه کنترل دیابتی

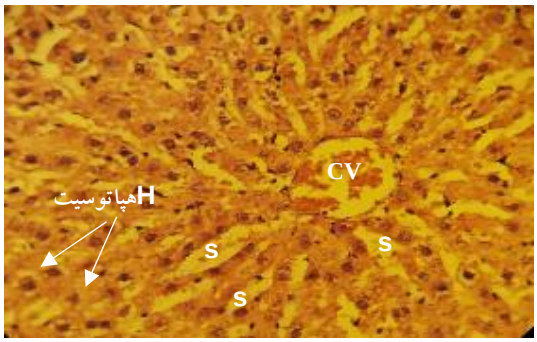
در گروه کنترل دیابتی، ساختار بافت کبد به هم ریخته است. محوشدن سینوزوئیدها، به هم ریختن نظم صفحات سلول کبدی (رماک)، التهاب به‌صورت ارتشاح تک هسته‌ای‌ها و پرولیفراسیون سلول‌های کوپفر نیز مشاهده می‌شود (شکل ۲).



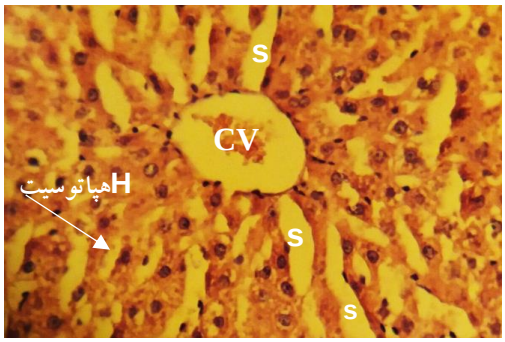
شکل ۲- مقطع عرضی یک لبول کبدی در گروه کنترل دیابتی، محوشدن سینوزوئیدها، به هم ریختن نظم صفحات سلول کبدی (رماک)، التهاب به صورت ارتشاح تک هسته‌ای‌ها و پرولیفراسیون سلول‌های کوپفر (بزرگنمایی ۱۰۰*). ورید مرکزی CV، سلول کبدی H، سینوزوئید S

۱-۲-گروه کنترل دیابتی تیمار شده با دوز ۵۰mg/kg عصاره ی هیدروالکلی برگ رزماری، در مقایسه با گروه کنترل دیابتی؛ در اطراف وریدمرکزی التهاب (ارتشاح سلول‌ها و تکثیر سلول کوپفر در سینوزوئیدها) مشاهده نمی‌شود و بی نظمی کمتری در صفحات سلول کبدی (رشته‌ی رمارک) مشاهده می‌شود. بیشتر سینوزوئیدها قابل رویت می‌باشند و نظم صفحات سلول کبدی (رماک) هم بهتر شده است، اما با این حال روی هم افتادگی سینوزوئید در قسمت‌هایی دیده می‌شود در داخل ورید مرکزی مقداری خون دیده می‌شود. و نیز نکروز التهابی به‌صورت تجمع لنفوسیت‌ها در سلول‌های کبدی (هپاتوسیت‌ها) مشاهده نمی‌شود (شکل ۳).

۱-۳- گروه کنترل دیابتی تیمار شده با دوز۱۰۰mg/kg عصاره ی هیدروالکلی برگ رزماری، در مقایسه با گروه کنترل دیابتی؛ در ساختار لبول کبدی، التهاب اطراف ورید مرکزی به‌صورت ارتشاح تک هسته‌ای‌ها و پرولیفراسیون سلول کوپفر دیده نمی شود. نظم رشته‌های رماک بهتر شده است و سینوزوئیدها به صورت واضح قابل رویت می‌باشند (شکل ٤).

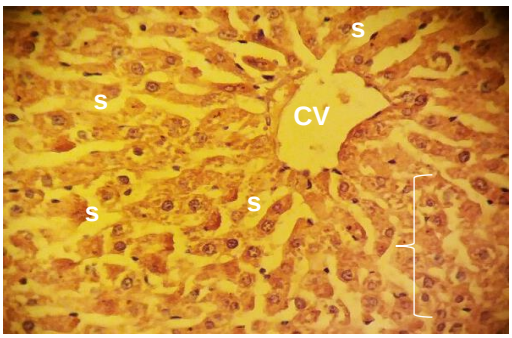


شکل ۳- مقطع عرضی یک لبول کبدی در گروه کنترل تجربی تیمار شده با دوز ۵۰mg/kg عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری که در آن در اطراف ورید مرکزی التهابی (ارتشاح سلول‌ها و تکثیر سلول کوپفر در سینوزوئیدها) مشاهده نمی‌شود (بزرگنمایی ۱۰۰*).
ورید مرکزی CV، سلول کبدی H، سینوزوئید S



شکل ۴- مقطع عرضی یک لبول کبدی در گروه کنترل تجربی تیمار شده با دوز ۱۰۰ mg/kg عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری که در آن در اطراف ورید مرکزی التهابی (ارتشاح سلول‌ها و تکثیر سلول کوپفر در سینوزوئیدها) مشاهده نمی‌شود (بزرگنمایی ۱۰۰*). ورید مرکزی CV، سلول کبدی H، سینوزوئید S

۱-۳- گروه کنترل دیابتی تیمار شده با دوز ۲۰۰mg/kg عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری، در مقایسه با گروه کنترل دیابتی؛ در ساختار لبول کبدی، التهاب در اطراف ورید مرکزی به‌صورت ارتشاح سلول‌ها و پرولیفراسیون سلول کوپفر دیده نمی‌شود. در صفحات سلول کبدی (رماک) نظم برقرار است و سینوزوئیدها به وضوح دیده می‌شوند. نکروز التهابی به‌صورت تجمع تک هسته‌ای‌ها مشاهده نمی‌شود (شکل ۵).



شکل ۵- مقطع عرضی یک لبول کبدی در گروه کنترل تجربی تیمار شده با دوز ۲۰۰ mg/kg عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری که در آن در اطراف ورید مرکزی التهابی (ارتشاح سلول‌ها و تکثیر سلول کوپفر در سینوزوئیدها) مشاهده نمی‌شود (بزرگنمایی ۱۰۰*).
ورید مرکزی CV، سلول کبدی H، سینوزوئید S.

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که فعالیت سرمی آنزیم‌های کبدی AST ، ALT و ALP در موش‌های صحرایی دیابتی شده در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایش یافته است. تیمار موش‌های صحرایی دیابتی با عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری، فعالیت آنزیم‌های AST ، ALT و ALP را در سرم خون این حیوانات کاهش داد. در واقع مشاهده شد که اثر عصاره‌ی رزماری در موش های دیابتی می تواند فعالیت آنزیم‌های کبدی را تاحدی به حالت نرمال نزدیک کند. نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات Ashraf و همکاران (۱۳۹۲) [۲۱] و Cheraghi و همکاران (۱۳۹٤) [۲۲] مطابقت دارد.

Harris در سال ۲۰۰۵ در مطالعه‌ی تغییرات بافت کبد در دیابت نوع دو، مشاهده کرد که در افراد مبتلا به دیابت، سطوح سرمی آنزیم‌های ALP، AST و ALT نسبت به افراد غیر دیابتی افزایش می‌یابد [۱۰].

تحقیقات Sotelo-Félix و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داد که عصاره‌ی رزماری علاوه بر کاهش آنزیم‌های کبدی در موش‌های دیابتی شده، باعث حفظ ساختار فعالیت بافت کبد موش‌های صحرایی می‌شود [۲۳].

در پژوهش حاضر، به هم ریختن نظم صفحات سلول کبدی (رماک) در ساختار لبول کبدی گروه دیابتی مشاهده شد. همچنین مطالعات Masjedi و همکاران و Das و همکاران، نشان داد که در گروه کنترل دیابتی، بی‌نظمی صفحه‌های کبدی (رشته های رماک) وجود دارد [۲٤، ۲۵].

همچنین Cheraghi و همکاران، بیان کردند که در گروه دیابتی در ساختار لبول کبدی در اطراف ورید مرکزی التهاب به‌صورت تجمع تک هسته‌ای و سلول کوپفر و بی‌نظمی در آرایش صفحات سلول کبدی (رشته‌ی رمارک) اتساع ورید مرکزی و سینوزوئیدهای آن مشاهده می‌شود و همچنین تجمع سه تا پنج سلول تک هسته‌ای (لنفوسیت) درون هپاتوسیت‌ها و محو شدن سینوزوئیدها و افتادگی صفحات سلول کبدی بر روری هم مشخص می‌باشد [۲۲].

مطالعات Mahmoud و همکاران نیز حاکی از متسع شدن ورید مرکزی، تکثیر سلول‌های کوپفر و خروج و انتشار این سلول‌ها از داخل سینوزوئیدها و بی‌نظمی در صفحات سلول‌های کبدی می‌باشد [۲٦].

در این پژوهش در گروه کنترل دیابتی التهاب به‌صورت ارتشاح تک هسته‌ای‌ها و پرولیفراسیون سلول‌های کوپفر در اطراف ورید مرکزی در ساختار لبول کبدی و فضای پورت مشاهده شد و همچنین التهاب به‌صورت تجمع لنفوسیت‌ها در بافت کبد گروه کنترل دیابتی مشاهده گردید. حضور سلول‌های کوپفر در بافت پارانشیم کبد و اطراف ورید مرکزی و فضای پورت، نشان دهنده خروج سلول‌های کوپفر از جدار سینوزوئیدها و تکثیر یا پرولیفراسیون آنها می‌باشد.

در پژوهشی که Asgary و همکاران انجام دادند، مشاهده کردند که در گروه کنترل دیابتی سلول‌های التهابی فضای پورت را به طور کامل در بر گرفته، به‌نحوی که سلول‌های التهابی از فضای پورت سرازیر شده و سلول‌های کبدی را نیز احاطه کرده است [۳].

همچنین تحقیقات رحیمی و همکاران نشان داد که در گروه دیابتی، التهاب در فضای پورت به‌طور متوسط و با نفوذ به داخل لوبول (التهاب فضای پورت) و نکروز خفیف داخل لوبولی هم مشاهده گردید [۲۷].

همچنان نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد در گروه دیابتی علاوه بر افزایش سطح آنزیم‌های کبدی، تغییرات بافتی کبدی نیز در مقایسه با گروه کنترل سالم، با شدت بیشتری رخ داده است. در حالی که در گروه‌های تیمار شده با عصاره‌ی گیاه رزماری، علاوه برکاهش سطح آنزیم‌های کبدی، بسیاری از تغییرات بافتی ناشی از دیابت بهبود یافته است.

افزایش سطح آمینوترانسفرازها (ALT, AST, ALP) به داخل خون به‌دلیل آسیب کبدی و در نتیجه نشت این آنزیم‌ها از سیتوزول به داخل پلاسمای خون می‌باشد [۲۸].

تحقیقات بافت شناسی نشان می‌دهد که در بیماری دیابت، التهاب ملایم در پارانشیم کبد (هپاتوسیت‌های کبد) به‌صورت مجموعه‌ای از سلول‌های التهابی مانند لنفوسیت‌ها و سلول‌های کوپفر وجود دارد که در نتیجه آن تشکیل رادیکال‌های آزاد و پاسخ التهابی مشاهده می‌شود [۲۲]. زیرا همان‌طور که Taheri و همکاران بیان کردند، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و تغییر فعالیت آنزیم‌های انتی اکسیدانی نقش مهمی در بروز عوارض دیابت و تشدید مقاومت به انسولین در این بیماران دارد [۲۹].

به عبارتی می‌توان گفت که ترکیبات طبیعی موجود در برگ و سرشاخه‌های گلدار رزماری شامل فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی،

برخی املاح و ویتامین‌ها می‌باشد که چون موجب سهولت ترشح و دفع صفرا می‌شود از این جهت از رزماری در بیماری‌های یرقان و نارسائی اعمال کبد استفاده می‌کنند [۲۰، ۱۹، ۱۷].

التهاب کبدی باعث پیشرفت بیماری از طریق فعال سازی سلول‌های استلات کبدی HSC می‌شود که نقش مهمی در ایجاد فیبروزکبدی ایفا می‌کنند [۳۰] و در صورت عدم درمان به سمت سیروز و سرطان سلول‌های کبدی پیشرفت می کند که البته با کنترل بیماری و عدم ایجاد سیروز، سرطان قابل پیشگیری است [۳۱].

همان‌طور که Harach و همکارانش بیان کردند، عصاره‌ی برگ گیاه رزماری باعث مهار فعالیت لیپاز پانکراس می‌شود و همچنین از استئاتوز، فیبروز و در نهایت سیروز کبدی جلوگیری می‌کند [۳۲].

با توجه به مطالب بیان شده و تطابق نتایج مطالعات بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژی این مطالعه‌ی تجربی، احتمالاً عصاره‌ی هیدروالکلی برگ رزماری به‌دلیل داشتن فلاونوئیدها با کاهش کلسترول و تری‌گلیسرید و به‌دنبال آن کاهش سطح لیپیدها [۳۲]، کاهش قندخون، جلوگیری از هیپرگلیسمی به‌دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی بالا، تعامل با آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، جلوگیری از تولید رادیکال‌های آزاد و واکنش با آنها، کاهش انتشار سایتوکاین های التهابی [۳۳] و نیز با کاهش فعالیت سلول‌های التهابی از ایجاد تخریب بافتی و پیشرفت آن به فیبروز، سیروز و سرطان کبد در افراد دیابتی جلوگیری می‌کند [۲۲].

در نتیجه، در این پژوهش مشخص شد که گیاه رزماری با کاهش آسیب‌های بافتی، عملکرد این اندام را در موش‌های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان بهبود بخشیده و این پدیده احتمالاً از طریق فعالیت هایپوگلیسمیک و آنتی اکسیدانی عصاره‌ی اعمال می‌شود. در واقع رزماری می‌تواند در پیشگیری و درمان آسیب های کبدی مؤثر واقع شود. بنابراین استفاده از گیاه رزماری به دلیل داشتن مواد فنلی با خاصیت آنتی اکسیدانی بالا برای بهبود عملکرد کبد در افراد دیابتی توصیه می‌گردد. ولی لازم به ذکر است که در این زمینه باید تحقیقات بیوشیمیایی و فارماکولوژی بیشتری انجام شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کلیه‌ی افرادی که در تدوین مقاله، گردآوری مطالب، کمک‌های مالی و یا تکنیکی همکاری نموده‌اند، قدردانی می‌گردد.

مآخذ

1. Tiwarim BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *Journal of Biomarkers* 2013; 1-8.
2. Ojewole J, Adewole, S, Olayiwola, G. Hypoglycemic and Hypertensive Effects of Momordica Charantia Linn. (Cucurbitaceae) Whole-Plant Aqueous Extract in Rats. *Cardiovasc. Journal Science* 2006; 17(5), 227-232.
3. Asgary S, Kazemi S, Moshtaghian SJ, Rafieian M, Bahrami M, Adelnia A. The protective effect of Cucurbita pepo L. on liver damage in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences* 2009; P. 65-59.
4. Dey L, Attele AS, Yuan CS. Alternative Therapies for Type 2 Diabetes. *Altern Med Rev* 2002; 7(1), 45-58.
5. Mayfield J. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: New Criteria. *Am J Family Physician* 1998; 55(6), 1355-1362.
6. Tanaka K, Nanbara S, Tanaka T, Koide H, Hayashi, T. Aminotransferase Activity in the Liver of the Diabetic Mice. *Diabetes Res Clin Pract* 1988; 5(1), 71-5.
7. Rojhan MS. *Basic Histological or Medical Histological. 1th Edition*. Tehran. Chehr Press. 2005. P. 378-388. [In Persian].
8. Cotran Ramzi S; Kumar Vinay; Fausto Nelson; Nelso Fausto; Robbins, Stanley L.; Abbas, Abul K. Robbins and Cotran. *Pathologic Basis of Disease* (7th Ed.). St. Louis, MO: Elsevier Saunders 2005; p. 878. ISBN 0-7216-0187-1.
9. Soochan D, Keough V, Wanless I, Molinari, M. Intra and Extra Hepatic Cystadenoma of the Biliary Duct. Review if Literature and Radiological and Pathological Characteristics of a very rare case. *BMJ Case Rep* 2012; 10, 1-5.
10. Harris E. Elevated Liver Function Tests in Type 2 Diabetes. *Clinical Diabetes* 2005; 23, 115-119.
11. Sharma P, Subhash, LB, Prasad AT. Protective Effect of Aqueous Extract of Feronia Elephantum Correa leaves on Thioacetamide Induced Liver Necrosis in Diabetic Rats. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2(9), 691-695.
12. Haji-Agha-Mohammadi A, Mohammadikebar Y, Ziaei A, Mohammadi N, Javadi A. Comparison of fasting glucose and oral glucose tolerance tests in

diagnosis of diabetes mellitus in liver cirrhosis. J Qazvin Univ Med Sci. 2011; 14 (4):12-16. [In Persian].
13. Sherlock Sh. *Hepatobiliary Diseases* (Translation with: Hosssini SH. And Keyhanian MS.). Danesh Pajooh Press. 1992.
14. Amouoghli Tabrizi B, Mohajeri D. Protective effect of edible turmeric (Curcuma longa Linn.) powder on early hepatic injury in diabetic rats. *Feyz* 2010; 14 (3):190-199. [Persian].
15. Ahmadi L, Mirza M, Shahmir F. The Volatile constituents of Artemisia Marschaliana Springer and its Secretory Elements. *Flavour Fragr J* 2002; 17,141-43.
16. Salehi Sourmaghi MH. *Medicinal Herbs and Herbal Therap*. Donyaye Taqziye and Salamat Press. 2006; 1: P. 72-74. [Persian].
17. Zargari A. *Medicinal Plants*. 4th Edition. Tehran. Tehran University Press. 1990; P. 71-76. [In Persian].
18. Tavaafi M, Ahmadvand H, Khalatbari A, Tamjidipoor, A. (2011). Rosmarinic Acid Ameliorates Diabetic Nephropathy in Uninephrrectomized Diabetic Rats. *Iranian Journal, Basic Science*. 14(3), 275-283.
19. Mozaffarian, VA. *Culture Names of Plants*. Contemporary Culture Publication, Tehran, Farhange Moaser Press. 1996. P. 463.
20. Zahedi A. *Dictionary of Plants*. Tehran. Tehran University Press. 1994. P. 158. [In Persian].
21. Ashraf H, Zare S, Farnad N. The effect of aqueous extract of barberry fruit on liver damage in streptozotocin - induced diabetic rats. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2013; 15 (6):1-9. [In Persian].
22. Cheraghi J, Krishchi P, Nasri S, Boorboor M. The Effect of Ethanolic Extracts of Petroselinum crispum Leaves on Histopathological and Activity of Liver Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *sjimu* 2016; 23 (7):190-202. [In Persian].
23. Sotelo-Félix, JI, Martinez-Fong, D, Muriel, P, Santillán, Rl, Castillo, D, Yahuaca, P. Evaluation of the Effectiveness of Rosmarinus Officinalis (Lamiaceae) In the Alleviation of Carbon Tetrachloride-Induced Acute Hepatotoxicity in the Rat. *J. Ethnopharmacol* 2002; 81(2), 145-154.
24. Masjedi F, Gol A, Dabiri Sh, Javadi A.The protective effect of garlic on histopathology markers of liver damage in rats with streptozotocin. *Iranian Journal of Endocrinology & Metabolism* 2009; 11(4). P. 433-441.
25. Das AV, Padayatti PS, Paulose CS. Effect of Leaf Extract of Aegle Marmelose (L.). Correa ex Roxb. On Histological and Ultra Structural Changes in Tissues of Stereptozotocin Induced Diabetic Rats. *Indian J. Exp. Biol* 1996; 34, 341-345.
26. Mahmoud MF, Sakr SM. Hepatoprotective Effect of Bee Propolis in Rat Model of Streptozotocin-Induced Diabetic Hepatotoxicity Light and Electron Microscopic Study. *Life Sci J*, 2013; 10: 2048-2054.
27. Rahimi P, Madani H, Mahzooni P. The Effects of Juglans regia Leaf Hydroalcoholic Extract on Enzymes Activity of Liver in Alloxan Induced Diabetic Rats. *Uijs J* 2008; 35 (6): 103-110. [In Persian].
28. Mansour HA, Newairy AA, Yousef MI, Sheweita, SA. Biochemical study on the effects of some Egyptian herbs in alloxan-induced diabetic rats. *Toxicology*, 2002; 170(3), 221–228.
29. Taheri A, Jalali M, Saedi A, Ghorbani M, Madani MR. Comparison of antioxidant enzymes superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase red blood cells in patients with type 2 diabetes compared to healthy subjects. Iranian *Journal of Diabetes and Lipid Disorders* 2012; 11(5): P. 464-473.
30. Fujii H, Kawada N. Inflammation and Fibrogenesis in Steatohepatitis. *J Gastroenterol* 2012; 47(3), 215-225.
31. AmirHamidi Z, Ejtahed HS, Bahadoran Z, Mirmiran P, Azizi F. Association between Food Intakes and Non-Alcoholic Fatty. *Ijdld J*. 2015; 14 (4):235-246. [In Persian].
32. Harach T, Aprikian O, Monnard I, Moulin J, Membrez M, Béolor JC, Raab T, Macé K, Darimont, Ch. Rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) Leaf Extract Limits Weight Gain and Liver Steatosis in Mice Fed a High-Fat Diet. *Planta Med*, 2010; 76(6), 566-571.
33. Lucchesi AN, Freitas NT, Cassettari LL, Fernando S, Marques G, Spadella CT. Diabetes Mellitus Triggers Oxidative Stress in the Liver of Alloxan-treated Rats: A Mechanism for Diabetic Chronic Liver Disease. *Acta Cirurgica Brasileira Journal* 2013; 28: 502-508.

THE EFFECTS OF ROMARINUS OFFICINALIS LEAF HYDROALCOHOLIC EXTRACT ON HISTOPATHOLOGY AND ENZYMES ACTIVITY OF LIVER IN ALLOXAN INDUCED DIABETIC RATS

Hanieh sadat Bagherieh hagh[1], Sima Nasri[1], Parisa Kerishchi Khiabani[2*]

1. *Department of Biology of Animal Science, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran*
2. *Department of Biology of Animal Science, Islamic Azad University, Ghods Unit, Department of Biology, Tehran, Iran*

ABSTRACT

Background: Diabetes produces free radicals and damages the liver. The aim of this study was to investigate the effects of *Rosmarinus Officinalis* leaf hydroalcoholic extract on histopathology and enzymes activity of liver in alloxan induced diabetic rats.

Methods: In this study, 50 adult male Wistar rats weighing 200 to 250 grams, were divided randomly into 5 groups of 10; non-diabetic control, diabetic control and 3 experimental groups (diabetic rats treated with the dosage of 50mg/kg, 100mg/kg and 200mg/kg rosemary leaf extract intraperitoneally for 14 days).

Diabetes was induced in rats by intraperitoneal injection of a single dose 120 mg/kg alloxan was done. At the end of the treatment period, blood samples were taken from the left ventricular heart of mice and aspartate aminotransferase (AST / SGOT), alanine aminotransferase (ALT / SGPT) and alkaline phosphatase (ALP) in serum were measured. Immediately liver was removed and histological samples were fixed in 10% formalin and then stained with hematoxylin-eosin technique (H & E).

Results: In diabetic rats, unlike control mice, the liver enzymes (AST, ALT and ALP) increases, because of damage of liver tissue ($p<0.01$).

The level of liver enzymes (AST, ALT and ALP) in rats treated with doses 50mg/kg, 100mg/kg and 200mg/kg of rosemary leaf extract showed a significant reduction in these enzymes compared to control diabetes ($p<0.01$).

Conclusion: Histological studies showed reduced inflammation in the liver lobule and the port in the experimental groups. The third experimental group had greatest impact on reducing liver inflammation and space ports showed lobule. Histologically, tissue changes were in line with biochemical changes.

The effects of *Rosmarinus Officinalis* leaf hydroalcoholic extract because of its high antioxidant properties, reduce free radicals and inflammation of the liver damage caused by diabetes by inhibiting the enzyme is reduced.

Keywords: Rosmarinus Officinalis, Hydroalcoholic Extract, Alloxan, Liver, Diabetes, Aspartate Aminotransferase (AST), Alanine Aminotransferase (ALT), Alkaline Phosphatase (ALP), Male Rats

* No. 3, 15 Metri Shirazi Street, Water Organization, Hakimiyeh Ave. Tehran, Iran. Post code: 1659639884, Tel: +982177318581, Email: parisakerishchi@yahoo.com