بررسی اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی پوست دارچین بر مهار آسیب های کبدی القا شده ناشی از داروی ریفامپین در موش های صحرایی نر ویستار

جواد قاسمیان یادگاری[۱]، حمیدرضا محمدی[۲*]، گلسا حیدری[۳]، احمد آدینه[۲]، کورش قنادی[۴]، علی غفاریان بهرمان[۵]، مهرنوش محمدیان[۳]، امیرمحمد دستجردی[۳]، زهرا صارمی[۳]

۱- استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۲-استادیار، گروه سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۳-کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۴-دانشیار بیماری های گوارش و کبد بالغین، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات هپاتیت، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۵-استادیار، گروه سم شناسیف دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات محیط کار، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، کرمان، ایران

یافته / دوره ۲۴ / شماره ۳ / پاییز ۱۴۰۱ / مسلسل ۹۳

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۳/۱۷ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۷/۲۳

مقدمه: ریفامپین، یکی از داروهای رایج جهت درمان بیماری سل مورد استفاده قرار می‌گیرد و یک عامل توکسیک قوی برای کبد به شمار می‌رود. هدف از این مطالعه بررسی اثرات تجویز عصاره دارچین در سمیت کبدی ناشی از داروی ریفامپین در موش صحرایی می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۶۰ رت نر از نژاد ویستار در ۶ گروه به صورت تصادفی قرار گرفت. آسیب کبدی و القا استرس اکسیداتیو با تجویز mg/kg/day ۸۰ریفامپین ایجاد شد. دوزهای مختلف عصاره دارچین (۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در سه گروه آزمایشی به صورت گاواژ روزانه به موش های بیمار تجویز شد. آسیب کبدی ناشی از ریفامپین با بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی سرمی و همچنین میزان گونه های فعال اکسیژن، گلوتاتیون، ظرفیت آنتی اکسیدانی، پراکسیداسیون لیپیدی و تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت کبد مورد ارزیابی قرارگرفت. تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار Prism نسخه ۶ و آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی انجام شد.

یافته‌ها: تجویز داروی ریفامپین به میزان mg/kg ۸۰ برای مدت ۲۱روز متوالی باعث ایجاد آسیب کبدی گردید ($P<0/05$). از سوی دیگر تجویز دوزهای مختلف عصاره دارچین، توانست به طور معنی داری آسیب های کبدی ناشی از مصرف ریفامپین را بهبود بخشید ($P<0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری: طبق نتایج این مطالعه، عصاره دارچین با خواص آنتی اکسیدانی، کبد را در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از ریفامپین محافظت می کند. که این اثرات بهبوددهندگی، به صورت کاهش مارکرهای آسیب کبدی در سرم، کاهش مارکرهای استرس اکسیداتیو و بهبود آسیب بافتی کبد نمایان گردید.

واژه‌های کلیدی: عصاره دارچین، سمیت کبدی، ریفامپین، استرس اکسیداتیو .

*آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی-توکسیکولوژی.

پست الکترونیک: hamidrezamohammadi65@yahoo.com

مقدمه

نارسایی حاد کبد در اثر عوامل متعددی از جمله هپاتیت های ویروسی، آسیب های توکسیک ناشی از سموم و داروها و همچنین ایسکمی ایجاد می شود (۱). کبد اولین سد دفاعی بدن را در برابر آسیب ناشی از مواد بیولوژیک برونزاد (Xenobiotics) تشکیل می دهد که خود ممکن است به نکروز سلول های کبدی بی‌انجامد. در آسیب های توکسیک کبد، استرس های اکسیداتیو نقشی اساسی را بر عهده دارند. آنتی اکسیدان های موجود در مواد غذایی و بدن، حتی در مقادیر ناچیز، می توانند بدن را در مقابل انواع مختلف آسیب های اکسیداتیو ناشی از رادیکال های آزاد اکسیژن محافظت کنند (۲). بیماری سل به عنوان یک مسئله بهداشت عمومی در سراسر جهان مطرح می باشد و با شیوع بیماری ایدز، سل یکی از عوامل عمده منجر به فوت در مبتلایان بزرگسال می باشد. ریفامپین (Rifampin) یک آنتی بیوتیک است که به طور معمول برای درمان بیماری سل مورد استفاده قرار می گیرد، تحقیقات اخیر نشان داده اند که این دارو یک عامل توکسیک قوی برای کبد به شمار می رود (۳) به طوری که گزارش شده است در ۱/۱ درصد از افراد مسنی که به صورت مزمن با ریفامپین مصرف کرده اند هپاتیت بالینی گزارش شده است (۴). مکانیسم دقیق آسیب کبدی ناشی از مصرف داروی ریفامپین هنوز به طور کامل مشخص نشده است. برخی از مطالعات نشان داده اند که ریفامپین از طریق آسیب اکسیداتیو منجر به پراکسیداسیون لیپیدها و تخلیه آنتی اکسیدان تری پپتید گلوتاتیون (GSH) و آنزیم های زداینده رادیکال های آزاد می شود (۵،۶). در نتیجه می توان گفت که ریفامپین به عنوان یک القاء کننده قوی سیستم اکسیداز مختلط شناخته شده است. از اینرو جستجو برای یافتن دارویی مفید جهت پیشگیری از سمیت کبدی ناشی از داروی ریفامپین ارزشمند بوده و تلاش برای یافتن هر فرآورده طبیعی با اثرات محافظتی در این زمینه از اهمیت کلینیکی خاصی برخوردار است.

گیاهان دارویی به علت سهولت دسترسی، کاهش عوارض جانبی و قیمت مناسب، به عنوان جایگزین های شایسته داروهای صناعی، همواره مورد توجه بوده و در چند دهه اخیر به طور خاص مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته اند (۷). اگر چه عوامل دارویی متنوعی برای درمان انواع بیماری ها وجود دارد، لکن اغلب بیماران قادر به تحمل اثرات جانبی داروهای شیمیایی نیستند و از سوی دیگر اکثر گیاهان اثرات جانبی بسیار اندکی در بیماران به جای می گذارند (۸). دارچین، قطعات خشک شده و نیز کوبیده پوست درختانی از جنس Cinnamomum از تیره برگ بو است که هم در غذاها به عنوان ادویه استفاده می شود. درخت دارچین ۵ تا ۷ متر بلندی دارد و از جمله گیاهان همیشه سبز می باشد. از برگ و شاخه های کوچک این درخت، اسانس دارچین بدست می آید (۹). دارچین دارای ترکیباتی از جمله آمیدون، موسیلاژ، تانن، اکسالات کلسیم، قند، سینامومین، سینامالدئید، اوژنول، اسانس و رزین است (۱۰). ارزش تجاری اسانس دارچین به میزان سینامالدئید آن می باشد. دارچین دارای خواص درمانی ضدمیکروب، آنتی اکسیدان، آنتی دیابت ضد ویروس و ضد اسپاسم ضد نفخ، افزایش دهنده تعریق بدن، گرم کننده و محرک رحم می باشد (۱۰،۱۱). تحقیقات دارو شناسی و سم شناسی خطرات به خصوصی را برای مصرف دارچین در انسان نشان نمی دهند به طوری که در غلظت های پایین نه تنها اثرات سمی نداشته بلکه اثرات آنتی اکسیدانی بالایی دارد (۱۲). خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره پوست دارچین در طی تحقیقات متعددی به اثبات رسیده است (۱۳،۱۴). با توجه به مجموعه فوق الذکر و با در نظر گرفتن خواص مستند آنتی اکسیدانی دارچین فرض بر این است که مصرف دارچین در غلظت پایین می تواند کبد را در برابر اثرات سمی اکسیداتیو داروی

ریفامپین محافظت کند. بنابراین، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات محافظتی عصاره دارچین بر سمیت کبدی ریفامپین در موش صحرایی طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر به روش تجربی سال (۱۴۰۱) در آزمایشگاه گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان انجام شد. تمامی حیوانات با چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه اصول اخلاقی بر اساس دستور العمل جهانی کار با حیوانات آزمایشگاهی پس از تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی لرستان باکد اخلاق IR.LUMS.REC.1400.233 انجام گرفت. برای انجام این مطالعه، تعداد ۶۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۰ ±۲۰۰ گرم، به طور تصادفی به ۶ گروه ۱۰ تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

۱) گروه کنترل سالم که فقط نرمال سالین دریافت کردند.

۲) گروه دریافت کننده ی بالاترین دوز عصاره هیدروالکلی (برای ۱۴ روز متوالی ۲۰۰ mg/kg/day) دریافت نمودند.

۳) گروه کنترل بیمار که فقط ریفامپین (برای ۲۱ روز متوالی ۸۰ mg/kg/day) دریافت می کنند.

۴) گروهی که ریفامپین (برای ۲۱ روز متوالی ۸۰mg/kg/day) + عصاره هیدروالکلی دارچین(برای ۲۱روز متوالی ۵۰ mg/kg/day)

۵) گروهی که ریفامپین (برای ۲۱ روز متوالی ۸۰mg/kg/day) + عصاره هیدروالکلی دارچین(برای ۲۱روز متوالی ۱۰۰ mg/kg/day)

۶)گروهی که ریفامپین (برای ۲۱ روز متوالی ۸۰mg/kg/day)+ عصاره هیدروالکلی دارچین(برای ۲۱ روز متوالی ۲۰۰ mg/kg/day)

در پایان دوره آزمایش و ۲۴ ساعت پس از آخرین گاواژ، جهت اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی شامل: آلانین آمینو ترانسفراز (Alanine Aminotransferase; ALT)، آسپارتات آمینو ترانسفراز (Aspartate Amino Transferase; AST)، بیلی روبین تام (Total Bilirubin; TB) و لاکتات دهیدروژناز Lactate dehydrogenase (LDH)، نمونه خون ناشتا از ناحیه سینه و از سمت چپ بدن حیوان گرفته شد و سرم نمونه های خون با سانتریفوژ (سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد) جدا گردید.

برای تعیین وضعیت آنتی اکسیدانی کبد، همه موش ها همزمان با ایجاد در رفتگی در مهره گرده به راحتی کشته شدند. کبد موش ها سریعا خارج و در نرمال سالین بسیار سرد شستشو داده شد، سپس هموژنات ۱۰ ٪ در ۱/۱۵ ٪(W/V) کلر پتاسیم تهیه گردید. هموژنات با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. از محلول رویی جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لپید از طریق اندازه گیری مقدار مالون دی آلدئید (Malondialdehyde) و همچنین برای اندازه گیری گونه های فعال اکسیژن و ظرفیت آنتی اکسیدانی و میزان گلوتاتیون احیا استفاده گردید.

پراکسیداسیون چربی در کبد با روش رنگ سنجی به وسیله اندازه گیری (Thiobarbituric acid reactive substances) TBARS طبق روش Mariutti و همکاران (سال ۲۰۲۲) انجام شد (۱۵). به طور خلاصه، ۰/۱ میلی لیتر همژنات بافتی با ۲ میلی لیتر معرف TCA-HCL(Trichloro acetic acid)-TBA(Thiobarbituric Acid) (۳۷ درصدTBA، ۰/۲۵ مول HCL و ۱۵ درصد TCA به نسبت ۱:۱:۱) مخلوط شد و پس از ۱۵ دقیقه قرار گیری در بن ماری جوش خنک شده و با سرعت

۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژشد. شدت جذب محلول رویی شفاف در ۵۳۵ نانومتر در مقابل بلانک اندازه گیری شد.

اندازه‌گیری میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در این پژوهش به شرح زیر می باشد، ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت کبد به ۵ میلی‌لیتر بافر خنک تریس -هیدروکلراید (۴۰ میلی‌مولار، pH=۷/۴ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) اضافه، و سپس با دستگاه هموژنایزر هموژن شد.۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط هموژن به ۱ میلی‌لیتر بافر خنک تریس-هیدروکلراید (۴۰ میلی‌مولار، pH= ۷/۴)و ۷٫٬۲-دی کلرو فلورسین دی استات (غلظت نهایی ۱ میکرومولار) اضافه شد. نمونه‌ها، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه و در تاریکی انکوبه شدند. در نهایت شدت فلوروسانس نمونه‌ها در طول موج تحریک ۴۸۵ نانومتر و نشر ۵۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه فلوریمتر اندازه‌گیری شد (۱۶).

برای اندازه‌گیری گلوتاتیون (GSH) در بافت کبد، بافت کبد حیوانات با نسبت 1:10 (w/v) در محلول خنک شده‌ی EDTA ۰/۰۲ مولار، هموژنه شد. ۵ میلی سپس لیتر از مخلوط کبد هموژن شده با ۴ میلی‌لیتر آب و ۱ میلی‌لیتر TCA ٪۵۰ مخلوط شده؛ مخلوط به دست آمده در دور ۳۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته شد و با ۴ میلی‌لیتر از بافر تریس ۰/۴ مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر DTNB ۰/۰۱ مولار مخلوط شد، خوب تکان داده شد و در طی ۵ دقیقه جذب آن در ۴۱۲ نانومتر خوانده شد(۱۷) و برای اندازه گیری ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی (FRAP)، ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط هموژن بافت کبد به ۳ میلی‌لیتر از محلول FRAP (حاوی، ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استات (۳۰۰ mM ; ۳ pH =)، ۰/۲۵ میلی‌لیتر محلول کلریدآهن دو آبه (mM ۲۰) و ۰/۲۵ میلی‌لیتر محلول TPTZ افزوده و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد.

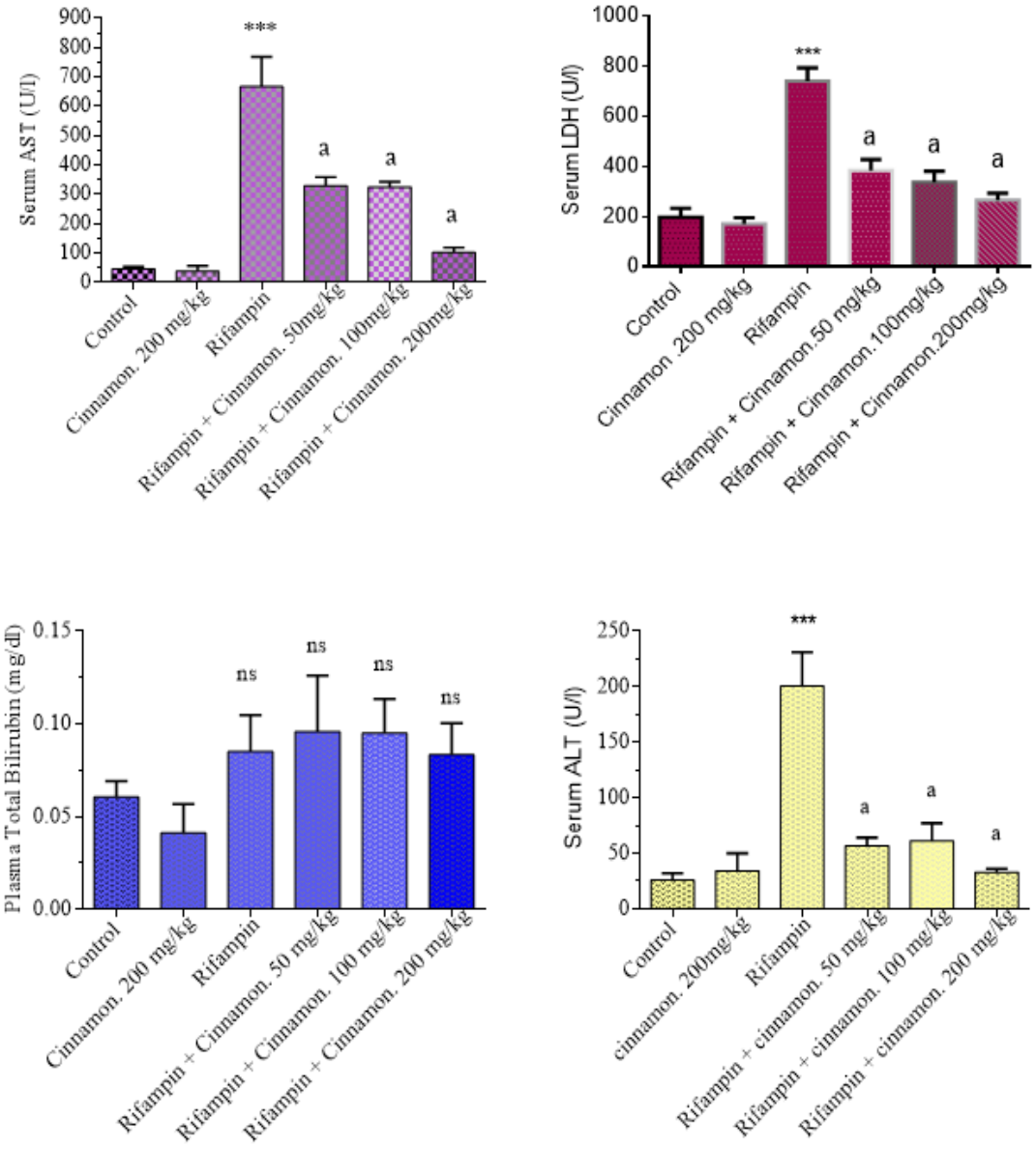
پس از سانتریفیوژ (۱ دقیقه، g ۱۰۰۰۰)، جذب نمونه‌ها با اسپکتروفوتومتر در طول‌موج ۵۹۳ نانومتر ثبت گردید (۱۸). در پایان، یافته‌های حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتری در فرمول منحنی استاندارد گذاشته و با ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی (میکرومولار ویتامین C) محاسبه شد. برای آسیب شناسی بافتی کبد، از سمت دیافراگمی لوب چپ کبد، نمونه گرفته شد. نمونه ها در فرمالین بافری۱۰٪ پایدار شدند، سپس برش هایی با ضخامت ۵ میکرون و با روش رنگ آمیزی معمول هماتوکسیلین - ائوزین از بافت ها تهیه گردید. برش ها با بزرگنمایی ۱۰۰ و در ۵ میدان میکروسکوپی، به طور تصادفی با میکروسکوپ نوری مدل نیکون (ECLIPSE E200، ساخت کشور ژاپن) بررسی شدند (۱۹).

تحلیل آماری

تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار Prism نسخه ۶ و آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی انجام شد.در تمامی موارد $P<0.05$ به عنوان اختلاف معنادار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج حاصل از بررسی بیومارکرهای بیوشیمیایی در این پژوهش نشان داد، در موش های گروه داروی سمی (دریافت کننده ریفامپین)، سطوح سرمی آنزیم های آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) در مقایسه با گروه شاهد، به طور معنی داری ($P <0.05$) بیشتر بود. در گروه درمان با عصاره دارچین سطوح افزایش یافته سرمی آنزیم های AST, ALT و LDH ناشی از ریفامپین را به طور معنی دار (P <۰/۰۵) کمتر بود (نمودار۱).



نمودار ۱. نتایج حاصل از بررسی بیومارکر های بیوشیمیایی در پژوهش حاضر داده ها به عنوان Mean±SEM برای ده حیوان در هر گروه نمایش داده شده است.

*** نشان دهنده ی افزایش معنادار درمقایسه با گروه کنترل (Vehicle-treated) است ($P < 0.05$).

a نشان دهنده ی کاهش معنا دار درمقایسه با گروهی است که تنها ریفامپین را دریافت کرده اند ($P < 0.05$)

ns نشان دهنده ی عدم تفاوت معنادار($P > 0.05$).

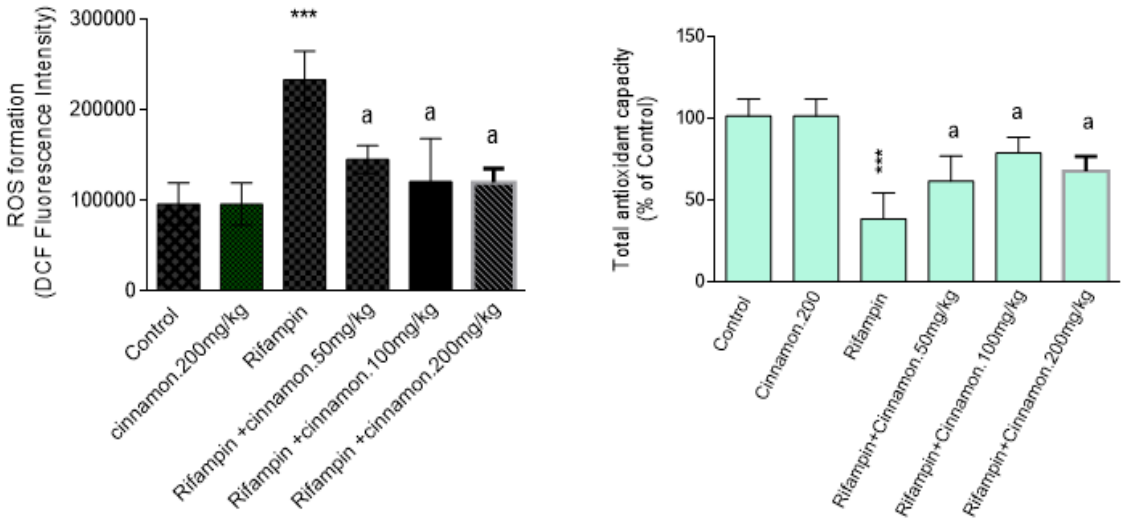
نتایج حاصل از بررسی شاخص های استرس اکسیداتیودر این پژوهش نشان داد، سطح پراکسیداسیون لیپیدی وگونه های فعال اکسیژن (ROS) درحیوانات دریافت کننده ی ریفامپین بالاترازگروه کنترل است. استفاده ازعصاره دارچین باعث تخفیف پراکسیداسیون لیپیدی و گونه های فعال اکسیژن (ROS) درگروه های مختلف مورد مطالعه شد (نمودار ۲-جدول ۱). سطح گلوتاتیون احیا(GSH) و میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی(FRAP) دربافت کبد نیز مورد سنجش قرار گرفت (نمودار۲- جدول ۱).

مشاهده شدکه سطح گلوتاتیون و میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی کبد درگروهی که درمعرض داروی ریفامپین قرارمی گیرند به پایین ترین سطح خود می رسد (نمودار۲-جدول ۱). استفاده ازعصاره دارچین باعث جلوگیری ازتخلیه ی گلوتاتیون درگروه های مختلف مورد مطالعه شد (جدول ۱).

جدول۱. بررسی میزان لیپید پراکسیداسیون و سطح گلوتاتیون بافت کبد در گروه های مختلف مورد مطالعه و بررسی تاثیر تجویز عصاره دارچین بر آن

گروه ها	لیپیدپروکسیداسیون (nmol/mg wet tissue)	گلوتاتیون (µmol/mg wet tissue)
کنترل	۱/۱۹ ± ۰/۱۳	۶۸/۴۵±۸/۱۹
گروه دریافت کننده ی بالاترین دوز عصاره هیدروالکلی(۲۰۰ mg/kg/day)	۱/۱۲±۰/۰۹	۷۹/۳۹ ±۵/۱۱
گروه کنترل بیمار که فقط ریفامپین (۸۰mg/kg/day)	۸/۲۴±۱/۶۳*	۱۹/۳۲±۴/۸۷***
گروهی که ریفامپین (۸۰mg/kg/day) + عصاره هیدروالکلی دارچین(۵۰mg/kg/day)	۳/۶۹±۰/۶۱#	۳۳/۶۷±۶/۲۹ a
گروهی که ریفامپین (۸۰mg/kg/day) + عصاره هیدروالکلی دارچین(۱۰۰mg/kg/day)	۳/۸۴±۰/۱۴#	۴۱/۳۳±۴/۵۱ a
گروهی که ریفامپین (۸۰mg/kg/day)+ عصاره هیدروالکلی دارچین(۲۰۰mg/kg/day)	۳/۰۷±۰/۸۴#	۴۲/۲۳±۴۶/۳۵ a

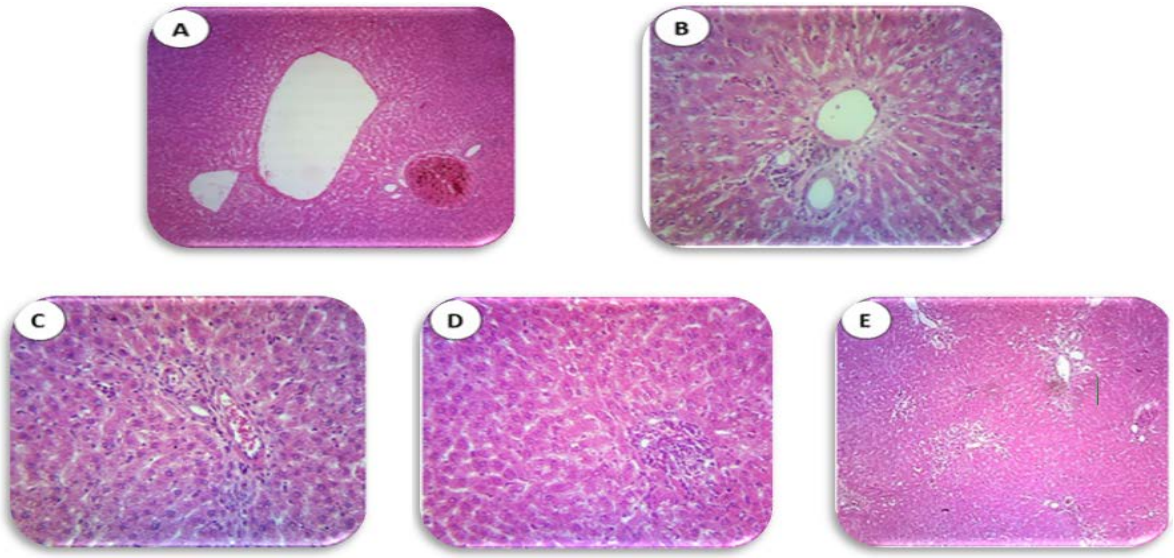
داده ها به عنوان Mean±SEM برای ده حیوان در هر گروه نمایش داده شده است.
***** نشان دهنده ی کاهش معنادار درمقایسه با گروه کنترل (Vehicle-treated) است (P <0.05).**
a بیانگرافزایش معنا دار درمقایسه با گروهی است که تنها ریفامپین را دریافت کرده اند (P <0.05)
*** نشان دهنده ی افزایش معنادار درمقایسه با گروه کنترل (Vehicle-treated) است (P <0.05)**
 # بیانگرکاهش معنا دار درمقایسه با گروهی است که تنها ریفامپین را دریافت کرده اند (P <0.05)



نمودار۲. نتایج حاصل از بررسی شاخص های گونه های فعال اکسیژن(ROS) و ظرفیت کل آنتی اکسیدانی(FRAP)در پژوهش حاضر داده ها به عنوان Mean±SEM برای ده حیوان در هر گروه نمایش داده شده است

***** نشان دهنده ی افزایش معنادار در مقایسه با گروه کنترل (Vehicle-treated) است (P <0.05).**
a بیانگرکاهش معنا دار در مقایسه با گروهی است که تنها ریفامپین را دریافت کرده اند (P <0.05).

تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت کبد حیوانات مورد آزمایش در شکل۱ نمایش داده شده است. هنگامی که داروی ریفامپین به حیوانات تجویز می شود، تغییرات بافت کبد به صورت نکروز، احتقان سینوزوئیدی و التهاب مجاری پورت در بافت کبد بروز می کند در گروه های دریافت کننده‌ی عصاره دارچین با دوزهای مختلف آسیب های بافتی ناشی از تجویز ریفامپین تخفیف یافت (شکل۱).



شکل ۱. تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد در حیوانات تحت درمان با عصاره دارچین.A: کنترل. B: ریفامپین (۸۰mg/kg/day). C: گروه دریافت کننده ی ریفامپین +عصاره دارچین (۵۰mg/kg/day). D: گروه دریافت کننده ی ریفامپین + عصاره دارچین (۱۰۰mg/kg/day). E: گروه دریافت کننده ی ریفامپین + عصاره دارچین (۲۰۰mg/kg/day).

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، تجویز ریفامپین منجر به افزایش معنی دار سطوح سرمی آنزیم های AST,ALT و LDH در مقایسه با گروه شاهد سالم گردید. نتایج بررسی حاضر از این لحاظ با یافته های سایر محققین هم خوانی دارد (۲۰). در این مطالعه، عصاره دارچین تاثیر بسیار خوبی را بر تغییرات آنزیم های شاخص کبدی ناشی از ریفامپین، از لحاظ برگشت به اندازه طبیعی نشان داد. بررسی حاضر، همان طور که قبلاً نیز به آن اشاره شد، اولین مطالعه ای است که در آن به بررسی اثرات حفاظت کبدی عصاره دارچین در برابر اثرات توکسیک ریفامپین پرداخته شده است. نتایج این مطالعه با نتایج بررسی Khan و همکاران در سال ۲۰۲۱ که اثرات محافظت از کبدی برگ گیاه Vitex negundo را در مقابل اثرات توکسیک ریفامپین مطالعه کرده اند هم خوانی دارد (۲۱). همچنین، یافته های بررسی حاضر با نتایج مطالعه Mohajeri و همکاران در سال ۲۰۱۱ که اثرات محافظت کبدی گیاهCrocus sativus L را در مقابل اثرات توکسیک ریفامپین مطالعه کرده اند نیز همخوانی دارد (۲۲). به طور کلی برای ارزیابی آسیب کبد سنجش سطوح آنزیم هایی نظیر AST،ALT وALP به طور وسیع مورد استفاده قرارمی گیرد. همچنین وقوع نکروزیا آسیب غشاء سلول باعث رها شدن این آنزیم ها به گردش خون می شود. افزایش سطح AST در سرم، آسیب کبد ناشی از هپاتیت های ویروسی، انفارکتوس قلبی و صدمات عضلانی را نشان می دهد. ALT که تبدیل آلانین به پیرووات و گلوتامات را کاتالیز می کند، برای کبد اختصاصی‌تر بوده و پارامتر مناسب تری برای تشخیص آسیب کبد می باشد. سطوح افزایش یافته آنزیم های سرمی فوق حاکی از نشت سلولی بوده و نشانگر آسیب ساختار و اختلال عملکرد غشاهای سلولی در کبد می باشد (۲۳،۲۴). بازگشت سطوح افزایش یافته آنزیم های سرمی به حالت طبیعی توسط عصاره دارچین، متعاقب آسیب کبدی در اثر ریفامپین، می تواند در اثر ممانعت از نشت آنزیم های داخل سلولی به دلیل ابقاء تمامیت و پایداری سلامت غشاء سلول و یا نوزایش سلول های آسیب دیده کبد باشد. کنترل موثر

سطوح ALP، بیلی روبین و پروتئین تام، بهبود زود هنگام مکانیسم های عملکردی و ترشحی سلول های کبدی را نشان می دهد.

در مطالعه حاضر، مصرف ریفامپین افزایش قابل توجه میزان مالون دی آلدئید را به همراه داشت. نتایج بررسی حاضر از این لحاظ با یافته های بررسی های دیگر نیز همخوانی داشت (۲۵). ریفامپین یک القا کننده قوی سیستم سیتوکروم P450 است که تولید متابولیت های سمی از داروها و اتصال کووالان آنها به ماکرومولکول های کبدی را سبب می شود (۲۶). بنابراین، تبدیل ریفامپین به متابولیت های فعال که قادربه اتصال به ماکرومولکول های موجود درهپاتوسیت ها هستند، منجربه آسیب کبد می شود (۲۷). تحقیقات نشان داده است استرس اکسیداتیو، مکانیسم اصلی ریفامپین درایجاد اثرات سمی درکبد موش های صحرایی است (۲۸). یافته های مطالعه حاضر مکانیسم فوق را مورد تأیید قرار داد؛ چرا که در بافت کبد موش های دریافت کننده ریفامپین، افزایش معنی داری درمیزان پراکسیداسیون لیپیدی مشاهده گردید که خود به موازات کاهش قابل ملاحظه آنزیم های آنتی اکسیدانی بررسی شد.

به نظرمی رسد رادیکال های آزاد حاصل از واکنش متابولیت های ریفامپین با اکسیژن باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی شده که خود منجر به تشکیل پراکسیدهای لیپیدی (مالون دی آلدئید) و در نهایت از بین رفتن یک پارچگی غشای هپاتوسیت ها و آسیب کبد می شود. افزایش میزان مالون دی آلدئید در موش های دریافت کننده ریفامپین، نشان دهنده افزایش واکنش های پراکسیداسیونی است که به ضعف مکانیسم های تدافعی آنتی اکسیدانی منجرمی شود و بدین ترتیب ممانعت از تشکیل مفرط رادیکال های آزاد مقدور نخواهد بود (۲۹). به عبارتی دیگر، افزایش میزان مالون دی آلدئید در کبد در اثر ریفامپین، نشان دهنده افزایش پراکسیداسیون لیپیدی است که منجر به آسیب بافت کبد، همچنین بی کفایتی مکانیسم های تدافعی آنتی اکسیدانی در ممانعت از تشکیل بی رویه رادیکال های آزاد می شود. سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز؛ آنزیم های آنتی اکسیدانی هستند که یک سیستم تدافعی را علیه گونه های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) تشکیل داده اند (۳۰). کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شاخصی حساس درآسیب سلول های کبدی به شمار می رود (۳۱). این آنزیم یکی از مهم ترین عوامل در سیستم تدافعی آنتی اکسیدانی آنزیمی است. سوپراکسید دیسموتاز، آنیون سوپراکسید را با تبدیل به پراکسید هیدروژن پاکسازی نموده و بدین ترتیب اثرات سمی آن را کاهش می دهد (۳۲).که در مطالعه ما پس از تجویز ریفامپین گونه های فعال اکسیژن افزایش یافت و با تجویز عصاره دارچین از مقدار گونه های فعال اکسیژن به طور معناداری کاهش یافت.

گلوتاتیون ردوکتاز یک آنزیم سیتوزولی در سلول های کبدی است که در کاهش گلوتاتیون اکسید (GSSG)، به عنوان محصول نهایی فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز برگلوتاتیون احیا (GSH) دخالت دارد. در مطالعه حاضر متعاقب مصرف ریفامپین، کاهش قابل توجهی در فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز کبد حاصل شد که این امر می‌تواند منجر به دسترسی گلوتاتیون ردوکتاز به سوبسترا شده و بدین ترتیب فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز کاهش یابد. مصرف عصاره دارچین در کنار ریفامپین فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز را مجددا برقرار می سازد که مصرف گلوتاتیون اکسید جهت تشکیل گلوتاتیون احیا و افزایش سم زدایی متابولیت های فعال به وسیله کونژوگاسیون با گلوتاتیون احیا برقرار می شود.

در این بررسی، تغییرات دژنراتیو گسترده و نکروز نواحی مرکز لوبولی توسط ریفامپین ایجاد گردید. وقوع تغییرات دژنراتیو و نکروز در اطراف ورید چه مرکزی می تواند در اثر مواجه با سموم اتفاق بیافتد (۳۳). بنابراین، یافته های هیستوپاتولوژی در مورد کبد در این مطالعه، اثرات مستقیم و بارز توکسیک ریفامپین را منعکس می گرداند که با نتایج بررسی Khan و همکاران در سال ۲۰۲۱ هم خوانی دارد (۲۱). با تجویز عصاره دارچین، در کنار ریفامپین، فقط تغییرات دژنراتیو خفیف مشاهده گردید و اثری از نکروز دیده نشد که این خود اثرات حفاظتی عصاره دارچین در مقابل سمیت کبدی ریفامپین را نشان می دهد. اثرات مفید فوق را می توان به اثرات آنتی اکسیدانی و کاهش استرس های اکسیداتیو ترکیبات موجود درعصاره مربوط دانست. در هر صورت، یافته های آسیب شناسی این مطالعه در توافق با نشانی ها و شواهد، با نتایج بیوشیمیایی به دست آمده هم خوانی داشته و آنها را مورد تائید قرار می دهد. در مجموع، نتایج به دست آمده نقش محافظتی عصاره دارچین بر سمیت کبدی ریفامپین را تصدیق می کند. بنابراین می توان بعد از انجام کارآزمایی های بالینی تصادفی، عصاره دارچین را در انسان هایی که داروی ریفامپین را مصرف می کنند، جهت پیشگیری از آسیب های جبران ناپذیر کبد مورد استفاده قرار داد. لکن، شناخت دقیق ماده با مواد موثر اصلی این عصاره، تعیین دقیق مکان و مکانیسم یا مکانیسم های مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن در این مورد نیاز به مطالعات آتی دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از همکاران محترم آزمایشگاه سم شناسی دانشکده داروسازی و تمامی افراد شرکت کننده در این تحقیق که ما را یاری رساندند اعلام می نماییم.

References

1. Arroyo V, Moreau R, Jalan R. Acute-on-chronic liver failure. New England Journal of Medicine. 2020;382(22):2137-45.
2. Chen Z, Tian R, She Z, Cai J, Li H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. Free Radical Biology and Medicine. 2020;152:116-41.
3. Suárez I, Fünger SM, Kröger S, Rademacher J, Fätkenheuer G, Rybniker J. The diagnosis and treatment of tuberculosis. Deutsches Aerzteblatt International. 2019;116(43).
4. Lui GC, Wong N-S, Wong RY, Tse Y-K, Wong VW, Leung C-C, et al. Antiviral therapy for hepatitis B prevents liver injury in patients with tuberculosis and hepatitis B coinfection. Clinical Infectious Diseases. 2020;70(4):660-6.
5. Shastri MD, Shukla SD, Chong WC, Dua K, Peterson GM, Patel RP, et al. Role of oxidative stress in the pathology and management of human tuberculosis. Oxidative medicine and cellular longevity. 2018;2018.
6. Sarkar R, Mdladla C, Macingwana L, Pietersen R-D, Ngwane A, Tabb D, et al. Proteomic analysis reveals that sulfamethoxazole induces oxidative stress in M. tuberculosis. Tuberculosis. 2018;111:78-85.
7. Regassa H, Sourirajan A, Kumar V, Pandey S, Kumar D, Dev K. A Review of Medicinal Plants of the Himalayas with Anti-Proliferative Activity for the Treatment of Various Cancers. Cancers. 2022;14(16):3898.
8. Maher T, Ahmad Raus R, Daddiouaissa D, Ahmad F, Adzhar NS, Latif ES, et al. Medicinal Plants with anti-leukemic effects: A review. Molecules. 2021;26(9):2741.
9. Cava-Roda R, Taboada-Rodríguez A, López-Gómez A, Martínez-Hernández GB, Marín-Iniesta F. Synergistic antimicrobial activities of combinations of vanillin and essential oils of cinnamon bark, cinnamon leaves, and cloves. Foods. 2021;10(6):1406.
10. Mohamed AE, Abdur R, MM SA. Cinnamon bark as antibacterial agent: A mini-review. GSC Biological and Pharmaceutical Sciences. 2020;10(1):103-8.
11. Błaszczyk N, Rosiak A, Kałużna-Czaplińska J. The potential role of cinnamon in human health. Forests. 2021;12(5):648.
12. Almatroodi SA, Alsahli MA, Almatroudi A, Anwar S, Verma AK, Dev K, et al. Cinnamon and its active compounds: A potential candidate in disease and tumour management through modulating various genes activity. Gene Reports. 2020;21:100966.
13. He S, Wang Y. Antimicrobial and Antioxidant Effects of Kappa-Carrageenan Coatings Enriched with Cinnamon Essential Oil in Pork Meat. Foods. 2022;11(18):2885.
14. Ali A, Ponnampalam EN, Pushpakumara G, Cottrell JJ, Suleria HA, Dunshea FR. Cinnamon: A natural feed additive for poultry health and production—A review. Animals. 2021;11(7):2026. (In Persian)

15. Mariutti LRB. Lipid Peroxidation (TBARS) in Biological Samples. Basic Protocols in Foods and Nutrition: Springer; 2022. p. 107-13.
16. Murphy MP, Bayir H, Belousov V, Chang CJ, Davies KJ, Davies MJ, et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. Nature Metabolism. 2022;4(6):651-62.
17. Alshukri HA, Kzar MH, Abdaun AK. Measurement of GSH, SOD and MDA some Antioxidant level after Excises Athletes. Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology. 2021;15(1).
18. Butz M. Use of the Ferric Reducing/Antioxidant Power Test (FRAP) Assay as a Measurement of Antioxidant Power of Plant Phenylpropanoids. 2021.
19. Simeon-Lancelot DD, Okolie NJC, Mac-Fiberesima G, Onyije FM. Histopathology and Anticolon Cancer Effects of Turmeric Ethanolic Extracts in Wistar Rats. Euro Sci J. 2021;17:147.
20. Abulfathi AA, Decloedt EH, Svensson EM, Diacon AH, Donald P, Reuter H. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of rifampicin in human tuberculosis. Clinical pharmacokinetics. 2019;58(9):1103-29. (In Persian)
21. Khan MF, Arora P, Dhobi M. A prospective review on phyto-pharmacological aspects of Vitex negundo Linn. Current Traditional Medicine. 2021;7(1):138-50.
22. Mohajeri D, Doustar Y, Rezaei A, Mesgari-Abbasi M. Hepatoprotective effect of ethanolic extract of Crocus sativus L.(Saffron) stigma in comparison with silymarin against rifampin induced hepatotoxicity in rats. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2011;12(5). (In Persian)
23. ArAGon G, Younossi ZM. When and how to evaluate mildly elevated liver enzymes in apparently healthy patients. Cleve Clin J Med. 2010;77(3):195-204.
24. Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. Cmaj. 2005;172(3):367-79.
25. Uduman TS, Sundarapandian R, Muthumanikkam A, Kalimuthu G, Parameswari S, Vasanthi Srinivas T, et al. Protective effect of methanolic extract of Annona squamosa Linn in isoniazid-rifampicin induced hepatotoxicity in rats. Pak J Pharm Sci. 2011;24(2):129-34.
26. Baciewicz AM, Chrisman CR, Finch CK, Self TH. Update on rifampin, rifabutin, and rifapentine drug interactions. Current medical research and opinion. 2013;29(1):1-12.
27. Ramappa V, Aithal GP. Hepatotoxicity related to anti-tuberculosis drugs: mechanisms and management. Journal of clinical and experimental hepatology. 2013;3(1):37-49.
28. Kim J-H, Nam WS, Kim SJ, Kwon OK, Seung EJ, Jo JJ, et al. Mechanism investigation of rifampicin-induced liver injury using comparative toxicoproteomics in mice. International journal of molecular sciences. 2017;18(7):1417.
29. Swamy AV, Kulkarni RV, Koti B, Gadad P, Thippeswamy A, Gore A. Hepatoprotective effect of Cissus

quadrangularis stem extract against rifampicin-induced hepatotoxicity in rats. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012;74(2):183.
30. Kapoor D, Singh S, Kumar V, Romero R, Prasad R, Singh J. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). Plant Gene. 2019;19:100182.
31. Surai PF. Antioxidant systems in poultry biology: superoxide dismutase. Journal of Animal Research and Nutrition. 2016;1(1):8.
32. Carillon J, Rouanet J-M, Cristol J-P, Brion R. Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action. Pharmaceutical research. 2013;30(11):2718-28.
33. Cattley RC, Popp JA, Vonderfecht SL. Liver, gallbladder, and exocrine pancreas. Toxicologic Pathology: CRC press; 2018. p. 451-514.

Investigating the protective effects of cinnamon bark hydroalcoholic extract on the inhibition of liver damage induced by rifampin in male Wistar rats

Ghasemian Yadegari J[1], Mohammadi HR[2*], Heidari G[3], Adineh A[2], Ghanadi K[4] , Ghaffarian Bahraman A[5] , Mohammadian M[3], Dastjerdi AM[3], Saremi Z[3]

1. Assistant professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

2. Assistant professor, Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran, hamidrezamohammadi65@yahoo.com

3. Student Research Committee, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

4. Associate Professor of Gastrointestinal and Liver Diseases in Adults, Department of internal medicine, hepatitis Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

5. Assistant Professor of Toxicology, Department of Community Medicine, School of Medicine Occupational Environment Research Center Rafsanjan University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Received: *2022/06/7* Accepted: *2022/10/15*

Abstract

Introduction: Rifampin is one of the common drugs used to treat tuberculosis and is considered a strong toxic agent for the liver. The aim of this study is to investigate the effects of cinnamon extract administration on rifampin-induced hepatotoxicity in rats.

Materials and methods: In this experimental study, 60 male Wistar rats were randomly divided into 6 groups. Liver damage and induction of oxidative stress were caused by administration of 80 mg/kg/day rifampin. Different doses of cinnamon extract (50, 100 and 200 mg/kg) were administered to sick mice by daily gavage in three experimental groups. Liver damage caused by rifampin was evaluated by examining serum biochemical factors as well as the amount of reactive oxygen species, glutathione, antioxidant capacity, lipid peroxidation and histopathological changes in liver tissue. Data analysis was done using Prism version 6 software and one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test.

Results: The administration of rifampin at the rate of 80 mg/kg for 21 consecutive days caused liver damage ($P<0.05$). On the other hand, administration of different doses of cinnamon extract could significantly improve the liver damage caused by rifampin consumption ($P<0.05$)

Discussion and conclusion: According to the results of this study, cinnamon extract with antioxidant properties protects the liver against oxidative damage caused by rifampin. These healing effects were shown in the form of reduction of liver damage markers in serum, reduction of oxidative stress markers and improvement of liver tissue damage.

Keywords: Cinnamon extract, Hepatotoxicity, Rifampin, Oxidative stress.

Citation: Ghasemian Yadegari J, Mohammadi HR, Heidari G, Adineh A, Ghanadi K, Ghaffarian Bahraman A, Mohammadian M, Dastjerdi AM, Saremi Z. Investigating the protective effects of cinnamon bark hydroalcoholic extract on the inhibition of liver damage induced by rifampin in male Wistar rats. Yafte. 2022; 24(3):59-71.