



Hepatoprotective Effect of *Spinacia oleracea* L. Ethanolic Extract Against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Male Rats

Azita Khodayari¹, Akram Eidi², Pejman Mortazavi³

¹ Graduated from the Department of Biology, SR.C, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Biology, SR.C, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³ Department of Veterinary Pathobiology, SR.C, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 26 Apr 2025, Reciver in revised from: 23 Jun 2025, Accepted: 28 Jun 2025, Available online: 13 Sep 2025

doi 10.22059/jvr.2024.369702.3417

J Vet Res, Volume 80, Number 3, 2025, 135-148

Abstract

BACKGROUND: Spinach (*Spinacia oleracea* L.), which is cultivated worldwide, is an important dietary vegetable and a common raw material in the food processing industry. Spinach is rich in flavonoids, phenolic components, carotenoids, vitamins, and minerals, and is an antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer herb.

OBJECTIVES: This study aims to investigate the hepatoprotective effect of the ethanolic extract of spinach leaves against liver poisoning induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in adult male Wistar rats.

METHODS: Animals were divided into eight groups of 6 including healthy control, liver damage control (CCl₄ at doses of 1 ml/kg, i.p., twice a week), healthy experimental (spinach ethanolic extract at doses of 50, 100, 200 mg/kg, b.w.), liver damage experimental (CCl₄ + spinach ethanolic extract at doses of 50, 100, 200 mg/kg, b.w.). The treatment took 28 days. Then, animals were anesthetized and their blood samples were collected from their hearts. Levels of alkaline phosphatase (ALP) and gamma-glutamyl transferase (GGT) were measured in serum. Activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) enzymes and the malondialdehyde (MDA) level were measured in the liver homogenate. The structure of liver tissue was also investigated.

RESULTS: The spinach extract at doses of 100 and 200 mg/kg reduced the levels of liver enzymes ALT, AST and ALP, increased the activities of SOD and GPX, and reduced the MDA levels. Also, administration of spinach extract improved the structure of the liver.

CONCLUSIONS: The spinach ethanolic extract at doses of 100 and 200 mg/kg acts as a potent antioxidative agent against CCl₄-induced liver damage in male rats.

Keywords: Antioxidant, Carbon tetrachloride, Liver enzymes, Oxidative stress, Spinach

Copyright © The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Akram Eidi, Tel/Fax: +9821-44865323 / +9821-44865777



How to cite this article:

Khodayari A, Eidi A, Mortazavi P. Hepatoprotective effect of *Spinacia oleracea* L. ethanolic extract against carbon tetrachloride-induced liver injury in male rats. Journal of Veterinary Research, 2025; 80(3): 135-148.
doi: 10.22059/jvr.2024.369702.3417

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The effect of spinach ethanolic extract on the study parameters in the study groups. *** $P < 0.001$, significant compared to the healthy control group; ** $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$, significant compared to the liver damage control group.

Graph 1. Effect of spinach ethanolic extract on the ALP level in the experimental groups. *** $P < 0.001$, significant compared to the healthy control group; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, significant compared to liver damage control group.

Graph 2. Effect of spinach ethanolic extract on the GGT level in the experimental groups. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$, significant compared to the healthy control group; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, significant compared to the liver damage control group.

Graph 3. Effect of spinach ethanolic extract on the SOD activity in the experimental groups. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$, significant compared to the healthy control group; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, significant compared to the liver damage control group.

Graph 4. Effect of spinach ethanolic extract on the GPX activity in the experimental groups. *** $P < 0.001$, significant compared to the healthy control group; *** $P < 0.001$, significant compared to the liver damage control group.

Graph 5. Effect of spinach ethanolic extract on the MDA level in the experimental groups. *** $P < 0.001$, significant compared to the healthy control group; *** $P < 0.001$, significant compared to the liver damage control group.

Figure 1. Microscopic structure of liver tissue. (A1): healthy control group: Normal hepatocytes (arrow) are seen around the central vein (arrowhead) (black line 200 μ m); (B1): Liver damage control group: Hepatocytes with severe fatty degeneration (arrow) and inflammatory cell infiltration (arrowhead) are seen (black line 100 μ m); (C1-C3): Healthy experimental groups treated with the doses of 50, 100 and 200 mg/kg: Normal hepatocytes (arrow) can be seen around the central vein (black line 50 μ m); (D1-D3): Liver damage experimental groups treated with CCl₄ + spinach leaf extract with doses of 50, 100 and 200 mg/kg: Hepatocytes with fatty degeneration (arrow) and infiltration of inflammatory cells (arrowhead) can be seen (black line 200 μ m).



اثر محافظتی عصاره برگ اسفناج (*Spinacia oleracea*) در مسمومیت کبدی ناشی از تتراکلرید کربن در موش‌های صحرایی نر

آریتا خدایاری^۱، اکرم عیدی^۲، پژمان مرتضوی^۳

^۱ دانش آموخته واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳ گروه پاتوبیولوژی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۶ اردیبهشت ۱۴۰۴، تاریخ بازنگری: ۲ تیر ۱۴۰۴، تاریخ پذیرش: ۷ تیر ۱۴۰۴، تاریخ انتشار: ۲۲ شهریور ۱۴۰۴

doi: 10.22059/jvr.2024.369702.3417

دوره ۸۰، شماره ۳، ۱۴۰۴، ۱۴۸-۱۳۵

چکیده

زمینه مطالعه: اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) یک سبزی رژیمی است که در سطح جهانی کشت می‌شود و در صنایع فرآوری مواد غذایی کاربرد دارد. اسفناج سرشار از فلاونوئیدها، اجزای فنولی، کاروتنوئیدها، ویتامین‌ها و مواد معدنی است و به‌عنوان یک گیاه آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطان استفاده می‌شود.

هدف: به‌منظور بررسی نقش برگ گیاه اسفناج به‌عنوان یک عامل محافظت‌کننده کبد، در مطالعه حاضر اثر محافظتی عصاره اتانولی برگ اسفناج در برابر مسمومیت کبدی ناشی از تتراکلریدکربن در موش‌های صحرایی نر بالغ و پستار بررسی گردید.

روش کار: حیوانات به ۸ گروه کنترل سالم، کنترل آسیب کبدی (تتراکلریدکربن در دُز ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن، ۲ بار در هفته)، تجربی سالم (عصاره اتانولی برگ اسفناج در دُزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، تجربی آسیب کبدی (تتراکلریدکربن + عصاره اتانولی برگ اسفناج در دُزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند و به‌مدت ۲۸ روز تحت درمان قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۸ روز، حیوانات بیهوش شدند و خون از قلب جمع‌آوری شد. سطح آلکالین فسفاتاز (ALP) و گاما گلوتامیل ترانسفراز (GGT) در سرم اندازه‌گیری شد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتیون پراکسیداز (GPX) و سطح مالون دی‌آلدئید (MDA) در هموژنات بافت کبد اندازه‌گیری شد. همچنین ساختار بافت کبد بررسی گردید.

نتایج: تیمار عصاره اسفناج در دُزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش سطح آنزیم‌های کبدی GGT و ALP شد. همچنین تیمار عصاره اسفناج باعث افزایش SOD، GPX و کاهش سطح MDA شد. تیمار عصاره اسفناج باعث بهبود ساختار کبد گردید.

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج نشان می‌دهد عصاره اسفناج در دُزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در محافظت در برابر آسیب کبدی و استرس اکسیداتیو ناشی از تتراکلرید کربن مؤثر است.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان، آنزیم‌های کبدی، استرس اکسیداتیو، برگ اسفناج، تتراکلرید کربن

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

کپی‌رایت © نویسندگان.



نویسنده مسئول: اکرم عیدی، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مقدمه

کبد، هومئوستازی سیستم‌های مختلف بدن را تنظیم می‌کند و در پردازش مواد غذایی، دفع سموم و تولید اسیدهای صفراوی نقش دارد (۱). علاوه بر این سم‌زدایی انواع داروها و گزنوبیوتیک‌ها در کبد رخ می‌دهد. بیماری‌های کبدی از طریق در معرض بودن با مواد شیمیایی سمی، مصرف الکل، عفونت‌ها و اختلالات خودایمنی ایجاد می‌شوند (۲). بیماری‌های مزمن کبدی یکی از مشکلات بزرگ سلامتی و از عوامل عمده مرگ‌ومیر در دنیا می‌باشد. بیماری‌های مزمن کبدی در اثر عوامل ویروسی مثل هپاتیت B و C، کبد چرب و آسیب‌های کبدی (بر اثر مصرف الکل و سموم) ایجاد می‌شوند (۳). یکی از اختلالات کبدی، فیبروز کبدی است که بر اثر تجمع بیش‌از حد پروتئین‌های

ماتریکس خارج سلولی، مثل کلاژن اتفاق می افتد. عوامل شیمیایی مختلفی می توانند موجب بروز فیبروز کبدی شوند (۴). به دنبال بروز فیبروز، آسیب های بیشتری در بافت کبد ایجاد می گردد که شامل سیروز همراه با زخم های بافتی، از دست دادن ساختار پارانشیمی، اختلال جریان خون کبدی و نارسایی اندام می باشد (۵). یکی از مهم ترین این مواد تتراکلرید کربن است. تتراکلرید کربن به عنوان حلال برای حذف ترکیبات غیرقطبی، مانند چربی ها و روغن ها در صنعت از جمله خشک شویی استفاده می شود. حلال های آلی به صورت گسترده در صنایع مختلف کاربرد دارند (۶). تتراکلرید کربن یک ماده شیمیایی مصنوعی است و به طور طبیعی در محیط وجود ندارد و معمولاً برای ایجاد فیبروز یا سیروز کبدی در حیوانات آزمایشگاهی استفاده می شود (۷-۱۰). با وجود این کاربردهای صنعتی زیادی دارد. این ماده عمدتاً برای ساختن کلروفلوئوروکربن های مورد استفاده در سیستم سرمایش یخچال ها استفاده می شود. علاوه بر این، به عنوان یک ماده تمیزکننده و خاموش کننده آتش استفاده می گردد. به دلیل خطرات بهداشتی و آسیب زیست محیطی قابل توجه ناشی از کلروفلوئوروکربن ها، استفاده از آن ها توسط کشورهای پیشرفته کنار گذاشته شده است. همچنین از تتراکلرید کربن در تولید لامپ های گدازه ای استفاده می شود (۱۱). تتراکلرید کربن، یکی از شناخته شده ترین سموم کبدی است که عملکرد آن بر پایه اکسیداسیون لیپیدهای غشایی است (۱۲) و در صورت مواجهه با آن آسیب های کبدی جدی ایجاد می شود. این آسیب ها در ابتدا عمدتاً به صورت پراکسیداسیون لیپیدی، کاهش سطوح آنتی اکسیدان های طبیعی بدن (به خصوص گلووتاتیون) و افزایش سطح آنزیم های کبدی نمایان می شود (۱۳). تتراکلرید کربن از طریق ایجاد متابولیت های رادیکالی سمی باعث بروز سمیت کبدی می شود. این رادیکال های فعال از مهم ترین دلایل پدیده پراکسیداسیون غشای لیپیدی می باشند. ترکیبات آنتی اکسیدانی، مهم ترین سد مقابله با اثرات مخرب این رادیکال های سمی در بدن می باشند (۱۴).

مهم ترین استراتژی مقابله با آسیب های کبدی ناشی از سموم کبدی، استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدانی و به خصوص آنتی اکسیدان های گیاهی و طبیعی است. آنتی اکسیدان ها و ترکیبات فنولی موجود در گیاهان دارویی می توانند از آثار سمی داروها بر کبد جلوگیری کنند و باعث کاهش آزاد شدن آنزیم های کبدی به داخل خون شوند. آنتی اکسیدان ها ترکیباتی می باشند که برای پیشگیری و یا کند کردن آسیب های ناشی از واکنش های اکسیداسیون در بدن به کار می روند و به عنوان خنثی کننده رادیکال های آزاد عمل می کنند (۱۵)؛ بنابراین امروزه تلاش هایی در جهت استفاده از گیاهان دارویی برای کاهش علائم ناشی از سموم انجام می شود. گیاهان دارویی همواره به عنوان منبع مناسبی در جهت پیشگیری از بیماری های مرتبط با استرس اکسیداتیو در نظر گرفته شده اند (۱۶). گیاهان دارویی مواد پلی فنولی و فلاونوئیدی دارند که خاصیت آنتی اکسیدانی داشته و می توانند اثرات حفاظتی در برابر رادیکال های آزاد داشته باشند (۱۷).

اسفناج (*spinach*) با نام علمی *Spinacia oleracea* L. سرشار از مواد مغذی ضروری است. اسفناج غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی، همچون بتاکاروتن و لوتئین است. این دو ترکیب خواص آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی دارند. ترکیبات مؤثر در گیاه اسفناج املاح کلسیم، سدیم، پتاسیم، مس، آرسنیک، منیزیم، آهن، لیسیتین، ساپونین (به خصوص در ریشه)، پرو ویتامین و اسید فولیک می باشند (۱۸).

از آنجایی که گیاه اسفناج دارای اثرات آنتی اکسیدانی است و عصاره اتانولی گیاه دارای مواد مؤثره، خصوصاً ترکیبات فلاونوئیدی با خواص آنتی اکسیدانی می باشد (۱۹)، در مطالعه حاضر اثر عصاره هیدروالکلی گیاه اسفناج بر میزان فعالیت آنزیم های کبدی به دنبال مسمومیت ناشی از تتراکلرید کربن در موش صحرایی نر بالغ بررسی شد.

مواد و روش کار

تهیه عصاره برگ اسفناج: برگ گیاه اسفناج خریداری و در شرایط مناسب و دور از آفتاب خشک شد. با استفاده از آسیاب برقی برگ های گیاه به صورت پودر درآورده شد و با استفاده از اتانول ۸۰ درصد و به روش خیساندن (*maceration*) عصاره گیری انجام گردید. محلول به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد بر روی دستگاه شیکر با سرعت ۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد. عصاره به دست آمده به کمک دستگاه پمپ خلأ از فیلتر کاغذی واتمن عبور داده شده و سپس با استفاده از دستگاه تبخیر کننده دوار (*Rotary Evaporator*)

تحت شرایط خلأ و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخشی ۷۰ دور در دقیقه تغلیظ شد. نهایتاً عصاره خشک‌شده در پلیت ریخته شد تا کاملاً خشک شود. عصاره خشک‌شده با سرم فیزیولوژی جهت تهیه دزهای موردنظر رقیق گردید (۲۰).

حیوانات آزمایشگاهی: در مطالعه تجربی حاضر، ۴۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با محدوده وزنی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. رت‌ها در اتاق حیوانات (واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی) نگهداری شدند. در تمام مدت آزمایش رت‌ها طی دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰ درصد و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و آب و غذای کافی همواره در دسترس آن‌ها قرار داشت. مراحل آزمایش در تمام گروه‌های موردبررسی در شرایط کاملاً یکسان انجام شد.

گروه‌بندی و نحوه تیمار حیوانات موردآزمایش: حیوانات تتراکلرید کربن ۵۰ درصد (به نسبت ۱:۱ رقیق‌شده با روغن زیتون) را به میزان ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن ۲ بار در هفته (شنبه و چهارشنبه) طی ۲۸ روز به‌صورت تزریق درون‌صفاقی دریافت کردند (۲۱). عصاره برگ اسفناج روزانه به‌صورت خوراکی از طریق لوله intragastric (درون‌مده‌ای) تیمار گردید. حجم ماده تیمارشده در تمام گروه‌ها ۰/۵ میلی‌لیتر و مدت‌زمان تیمار ۲۸ روز بود. حیوانات به‌طور تصادفی به ۸ گروه تقسیم شدند که هر گروه شامل ۶ سر رت بود.

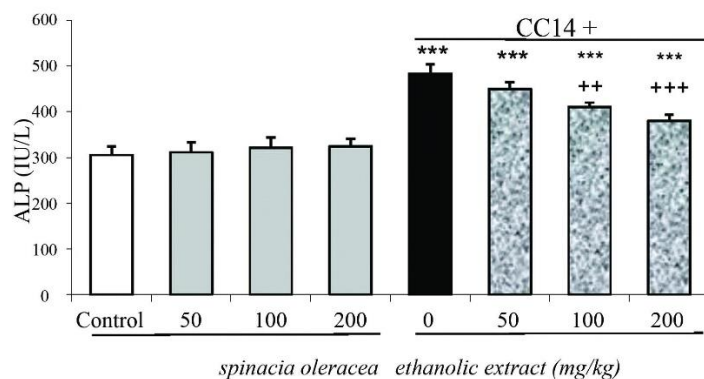
گروه اول (کنترل سالم): حیوانات سالم و فاقد مسمومیت کبدی می‌باشند.

گروه‌های دوم الی چهارم (تجربی سالم): حیوانات به‌مدت ۲۸ روز، عصاره برگ اسفناج را در دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر روزانه به‌صورت گاواژ دریافت کردند.

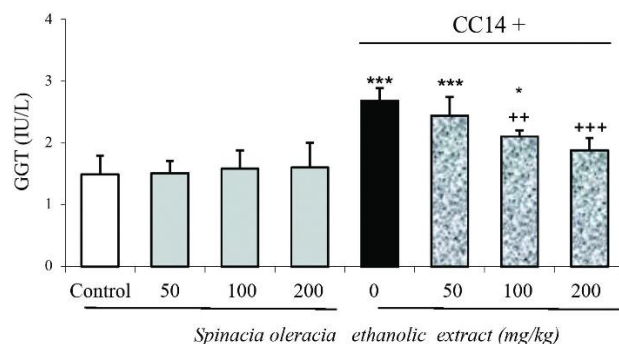
جدول ۱. اثر عصاره اتانولی اسفناج بر شاخص‌های بافت کبد در گروه‌های آزمایش.

شاخص	معیار ارزیابی	امتیاز	کنترل/سالم	تجربی سالم دریافت‌کننده عصاره اسفناج میلی گرم وزن بدن			کنترل آسیب کبدی	تجربی آسیب کبدی دریافت‌کننده عصاره اسفناج میلی گرم وزن بدن		
				۵۰	۱۰۰	۲۰۰		۵۰	۱۰۰	۲۰۰
دژنراسانس چربی	عدم دژنراسانس	۰	۰	۰	۰	۰	***۳/۸ ± ۰/۰۳	***۳/۱ ± ۰/۰۴	***۲/۸ ± ۰/۰۳	***+۱/۴ ± ۰/۰۱
	کانونی کمتر از ۲۵ درصد	۱								
	کانونی ۲۵-۵۰ درصد	۲								
	وسیع ولی کانونی	۳								
تورم سلولی	گسترده	۴								
	عدم تورم	۰	۰	۰	۰	۰	***۳/۹ ± ۰/۰۲	***۳/۷ ± ۰/۰۱	***+۳/۱ ± ۰/۰۲	***++۲/۵ ± ۰/۰۴
	کانونی کمتر از ۲۵ درصد	۱								
	کانونی ۲۵-۵۰ درصد	۲								
نکروز	وسیع ولی کانونی	۳								
	گسترده	۴								
	عدم نکروز	۰	۰	۰	۰	۰	***۳/۹ ± ۰/۰۳	***۳/۲ ± ۰/۰۲	***++۱/۵ ± ۰/۰۱	***++۱/۳ ± ۰/۰۳
	کانونی کمتر از ۲۵ درصد	۱								
التهاب	کانونی ۲۵-۵۰ درصد	۲								
	وسیع ولی کانونی	۳								
	گسترده	۴								
	عدم التهاب	۰	۰	۰	۰	۰	***۳/۸ ± ۰/۰۲	***۲/۹ ± ۰/۰۱	***++۱/۹ ± ۰/۰۳	***++۱/۶ ± ۰/۰۶
جمع	کانونی کمتر از ۲۵ درصد	۱								
	کانونی ۲۵-۵۰ درصد	۲								
	وسیع ولی کانونی	۳								
	گسترده	۴								
		۰-۱۶	۰	۰	۰	۱۵/۴	۱۲/۹	۹/۳	۶/۸	

*** $P < 0.001$ اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. ++ $P < 0.01$ و + $P < 0.05$ اختلاف از گروه کنترل آسیب کبدی را نشان می‌دهد.



نمودار ۱. بررسی اثر عصاره اتانولی برگ اسفناج بر فعالیت آنزیم ALP در گروه‌های آزمایش. $P < 0.001^{***}$ اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $P < 0.001^{+++}$ و $P < 0.01^{++}$ اختلاف از گروه کنترل آسیب کبدی را نشان می‌دهد.



نمودار ۲. بررسی اثر عصاره اتانولی برگ اسفناج بر فعالیت آنزیم GGT در گروه‌های آزمایش. $P < 0.001^{***}$ و $P < 0.05^*$ اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $P < 0.001^{+++}$ و $P < 0.01^{++}$ اختلاف از گروه کنترل آسیب کبدی را نشان می‌دهد.

گروه پنجم (کنترل مسموم): حیوانات تتراکلرید کربن ۵۰ درصد به میزان ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن را ۲ بار در هفته به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند (۲۱) و روزانه به آن‌ها ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به صورت گاواژ خوراندند. این گروه در مجموع ۸ مرحله تزریق تتراکلرید کربن (CCl₄) داشتند و دارای مسمومیت حاد کبدی شدند.

گروه ششم الی هشتم (تجربی مسموم): حیوانات به مدت ۲۸ روز، عصاره برگ اسفناج را در دُزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن هر روز به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به صورت گاواژ دریافت کردند و تتراکلرید کربن ۵۰ درصد که به نسبت ۱:۱ با روغن زیتون رقیق شده را با دُز ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن رت‌ها به صورت تزریق درون صفاقی ۲ بار در هفته و در مجموع ۸ بار دریافت کردند.

نمونه‌برداری: در پایان دوره آزمایش، حیوانات پنتوباربیتال (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، درون صفاقی) دریافت کردند و خون‌گیری از ناحیه بطن چپ قلب انجام گرفت. نمونه‌های خونی به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شدند تا سرم جدا شود. بافت کبد از بدن موش خارج و هموژنات بافتی با استفاده از دستگاه هموژنایزر تهیه شد.

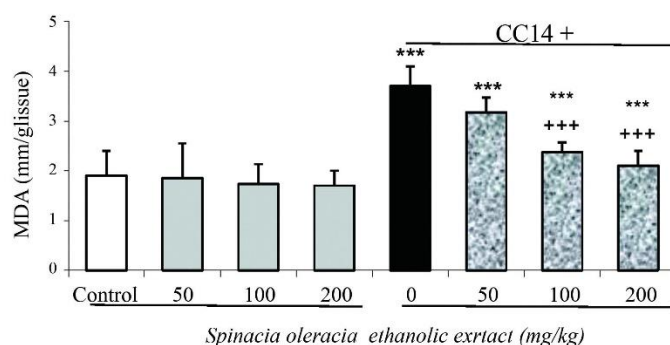
بررسی پارامترهای سرمی: فعالیت آنزیم‌های کبدی، شامل سطح آلکالین فسفاتاز (ALP) و گاما گلوتامیل ترانسفراز (GGT) سنجیده شد. اندازه‌گیری ALP و GGT به روش IFCC براساس واکنش کینتیک و با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر BT1500 و کیت شرکت پارس‌آزمون (ساخت کشور ایران) اندازه‌گیری شد. اختلاف جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر تعیین شد (۲۲).

سنجش پارامترهای استرس اکسیداتیو: سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase, SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase, GPX) و سنجش میزان مالون دی‌آلدئید (Malondialdehyde, MDA) از بافت کبد انجام گردید. بافت کبد از بدن حیوانات خارج شد و داخل پلیت با سرم فیزیولوژی شست‌وشو

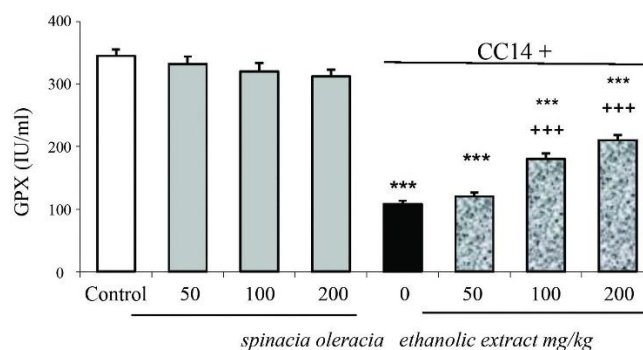
داده شد و سپس توسط کاغذ فیلتر آب‌گیری شد. حدود ۱۰۰ میلی گرم از بافت کبد طبق دستورالعمل کیت شرکت طب پژوهان رازی وزن شد و با KCl بافت شست‌وشو داده شد تا هرگونه گلبول قرمز و لخته از بین برود. ۱ میلی لیتر از محلول سرد KCl به عنوان بافر به نمونه بافت اضافه شد و نمونه با استفاده از هموژنایزر به مدت ۱۵ ثانیه بر روی یخ هموژنیزه شد. سوپرناتانت جهت آنالیز طبق دستورالعمل کیت استفاده گردید. با استفاده از دستگاه اسپکترومتر و طبق روش استاندارد و کیت شرکت پارس‌آزمون، ساخت کشور ایران، فعالیت آنزیم‌های GPX و SOD براساس فرمول ارائه شده در دستورالعمل کیت و در طول موج ۳۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و محاسبه شد (۲۳، ۲۴). سنجش میزان مالون دی‌آلدئید در بافت کبد براساس غلظت MDA با دستگاه اسپکتروفتومتر طبق دستورالعمل استاندارد کیت در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۵).

ارزیابی هیستولوژی: پس از کالبدشکافی حیوانات، کبد حیوانات از بدن خارج و در بافر فرمالین ۱۰ درصد تثبیت و طبق روش مرسوم رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-آئوزین (H&E) مراحل انجام شد. آماده‌سازی و تهیه مقاطع بافتی مراحل تثبیت، آب‌گیری، شفاف کردن، قالب‌گیری، رنگ‌آمیزی، شفاف‌سازی و چسباندن نمونه بر روی لام به ترتیب انجام شد. مقاطع تهیه شده از بافت کبد توسط میکروسکوپ نوری (Olympus) بررسی شد. لام‌ها از نظر پارامترهای دژنراسانس چربی، تورم سلولی، نکروز و التهاب مورد ارزیابی قرار گرفتند (۲۶).

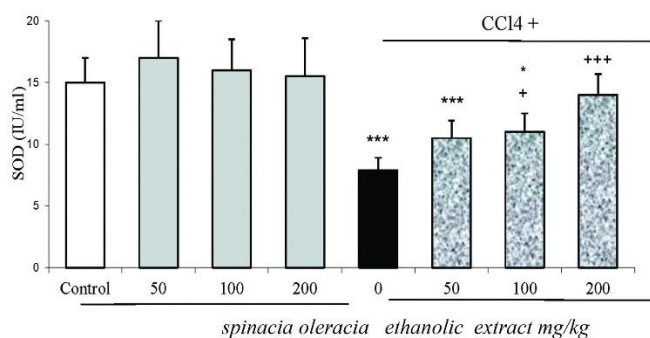
آنالیز آماری داده‌ها: آنالیز تمام داده‌ها از نظر آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون توکی Tukey صورت گرفت. نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار (Mean+SEM) ارائه گردید. $P < 0.05$ ملاک استنتاج آماری در نظر گرفته شد.



نمودار ۳. بررسی اثر عصاره اتانولی برگ اسفناج بر فعالیت آنزیم SOD در گروه‌های آزمایش. $P < 0.001^{***}$ و $P < 0.05^*$ اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد. $P < 0.001^{+++}$ و $P < 0.01^+$ اختلاف از گروه کنترل آسیب کبدی را نشان می‌دهد.



نمودار ۴. بررسی اثر عصاره اتانولی برگ اسفناج بر فعالیت آنزیم GPX در گروه‌های آزمایش. $P < 0.001^{***}$ اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد، $P < 0.001^{+++}$ اختلاف از گروه کنترل آسیب کبدی را نشان می‌دهد.



نمودار ۵. بررسی اثر عصاره اتانولی برگ اسفناج بر میزان MDA در گروه‌های آزمایش. $P < 0.001$ *** اختلاف از گروه کنترل سالم را نشان می‌دهد، $P < 0.001$ *** اختلاف از گروه کنترل آسیب کبدی را نشان می‌دهد.

نتایج

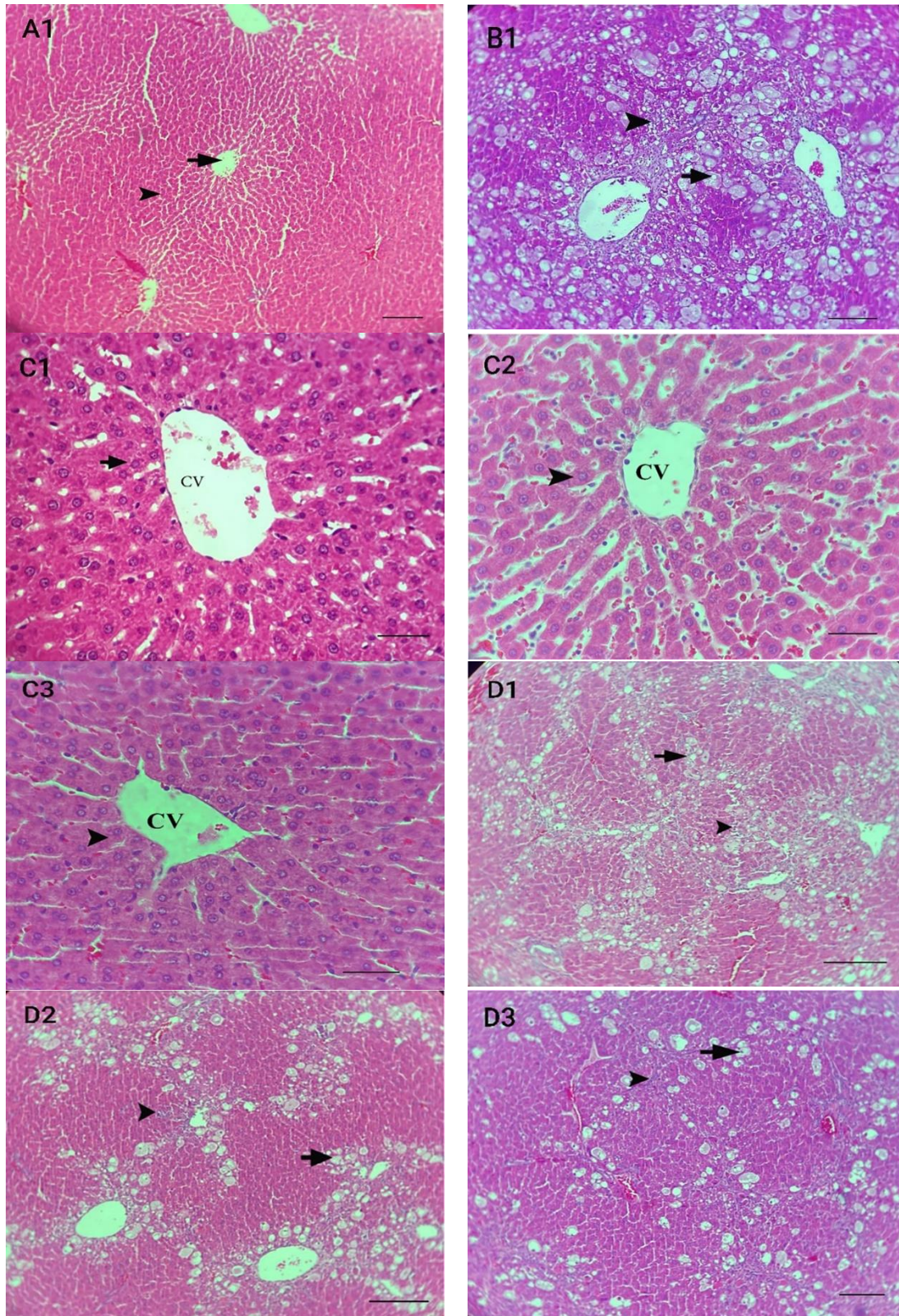
براساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، گروه کنترل آسیب کبدی افزایش معنی‌داری را در میزان فعالیت آنزیم‌های ALP و GGT نسبت به گروه کنترل سالم نشان داد ($P < 0.001$). تیمار حیوانات گروه آزمایش سالم با عصاره اتانولی برگ اسفناج در دُزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، تغییر معنی‌داری را در میزان فعالیت آنزیم‌های ALP و GGT در مقایسه با گروه کنترل سالم ایجاد نکرد. تیمار حیوانات گروه آزمایش آسیب کبدی با عصاره اتانولی برگ اسفناج در دُزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، به‌صورت وابسته به دُز، کاهش معنی‌داری ($P < 0.001$) را در فعالیت آنزیم‌های ALP و GGT در مقایسه با گروه کنترل آسیب کبدی ایجاد کرد (نمودار ۱، ۲).

همچنین نتایج نشان داد گروه کنترل آسیب کبدی کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX و افزایش معنی‌داری در میزان MDA نسبت به گروه کنترل سالم نشان داد ($P < 0.001$). تیمار حیوانات گروه آزمایش سالم با عصاره اتانولی برگ اسفناج در دُزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، تغییر معنی‌داری را در میزان فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX و میزان MDA در مقایسه با گروه کنترل سالم ایجاد نکرد. تیمار حیوانات گروه آزمایش آسیب کبدی با عصاره برگ اسفناج در دُزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، به‌صورت وابسته به دُز، افزایش معنی‌داری ($P < 0.001$) در فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX و کاهش معنی‌داری در میزان MDA در مقایسه با گروه کنترل آسیب کبدی ایجاد کرد (نمودار ۳، ۴، ۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تیمار عصاره اتانولی برگ اسفناج در دُزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تغییر معنی‌داری در ساختار بافت کبد ایجاد نکرد و بافت کبد در گروه‌های کنترل سالم و تجربی سالم کاملاً طبیعی بود. تیمار تتراکلرید کربن در گروه کنترل آسیب کبدی موجب آسیب بافتی معنی‌دار شامل دژنراسانس چربی، تورم سلولی، نکروز و التهاب در مقایسه با کنترل سالم گردیده است. تیمار حیوانات گروه آزمایش آسیب کبدی با عصاره برگ اسفناج در دُزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، به‌صورت وابسته به دُز، کاهش معنی‌داری را در شاخص‌های بافتی ایجاد کرد و بهبود در ساختار بافت کبد ایجاد گردید (جدول ۱) (تصویر ۱).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تزریق درون‌صفاقی تتراکلرید کربن در موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار موجب ایجاد مسمومیت کبدی شده است، به‌طوری‌که موجب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های ALP و GTT در سرم، کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX، افزایش میزان MDA و آسیب در ساختار بافت کبد (دژنراسانس چربی، تورم سلولی، نکروز و التهاب) در حیوانات کنترل آسیب کبدی نسبت به کنترل سالم به‌صورت معنی‌داری شده است. همچنین تیمار عصاره اتانولی برگ اسفناج موجب بهبود پارامترهای مذکور در گروه‌های تجربی آسیب کبدی نسبت به گروه کنترل آسیب کبدی شده است.



تصویر ۱. ساختار میکروسکوپی بافت کبد. A₁، گروه کنترل سالم: هپاتوسیت‌های سالم (پیکان) در اطراف سیاهرگ مرکزی (نوک پیکان) دیده می‌شوند (خط مشکی ۲۰۰ میکرومتر). B₁، گروه کنترل مسموم: هپاتوسیت‌های دارای دژنراسیون شدید چربی (پیکان) و نفوذ سلول‌های التهابی (نوک پیکان) دیده می‌شود (خط مشکی ۱۰۰ میکرومتر). C₁-C₃، تجربی سالم (حیوانات سالم تیمار شده با عصاره برگ اسفناج با دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن): اطراف سیاهرگ مرکزی (Central vein, cv) هپاتوسیت‌های سالم (پیکان) دیده می‌شوند. (خط مشکی ۵۰ میکرومتر). D₁-D₃، گروه تجربی مسموم تیمار شده با عصاره برگ اسفناج با دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن: هپاتوسیت‌های دارای دژنراسیون چربی (پیکان) و نفوذ سلول‌های التهابی (نوک پیکان) دیده می‌شود. (خط مشکی ۲۰۰ میکرومتر).

مطابق با نتایج مطالعه حاضر، Ojo و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان دادند تتراکلرید کربن باعث کاهش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX در گروه مسموم با تتراکلرید کربن نسبت به گروه کنترل سالم شده است. دلیل این کاهش را وجود استرس اکسیداتیو ناشی از تتراکلرید کربن در کبد دانستند، زیرا آنزیم‌های SOD و GPX نشانگرهای استرس اکسیداتیو در کبد می‌باشند. همچنین تتراکلرید کربن باعث افزایش MDA در گروه مسموم نسبت به گروه کنترل سالم شد. MDA یک محصول نهایی از تجزیه اسیدهای چرب اشباع‌نشده و استرس‌های مرتبط با آن است و به‌عنوان یک شاخص پراکسیداسیون چربی و افزایش MDA به‌دلیل افزایش پراکسیداسیون چربی هموژنات بافت کبد است (۲۷). تتراکلرید کربن بعد از ورود به بدن، توسط سیتوکروم P450 متابولیزه شده و به رادیکال‌های آزادتری کلرومتیل (CCl_3) و پراکسی تری‌کلرومتیل (OCCl_3) تبدیل می‌شود. اولین و مهم‌ترین اندام هدف برای این ماده کبد است. رادیکال‌های آزاد تولیدشده باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و ایجاد سمیت کبدی می‌گردند (۲۸، ۲۹).

Li و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر تتراکلرید کربن را در کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اثبات کردند. تتراکلرید کربن باعث کاهش آنزیم‌های SOD و GPX شده است. GPX و SOD آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که می‌توانند رادیکال‌های آزاد و لیپیدپراکسیدازها را از بین ببرند. MDA یک محصول نهایی از تجزیه اسیدهای چرب اشباع‌شده و استرس‌های مرتبط با آن و به‌عنوان شاخص اکسیداسیون چربی است. افزایش MDA به‌دلیل افزایش پراکسیداسیون چربی در هموژنات بافت کبد است (۳۰). مسمومیت کبد با تتراکلرید کربن باعث تخریب هیپاتوسیت‌ها، نکروز، التهاب و فیبروز می‌شود. سیستم عروقی، مسئولیت تغذیه و خون‌رسانی به سینوزوئیدهای کبد را دارد که در اثر تیمار تتراکلرید کربن دچار آسیب و در عملکرد آن‌ها اختلال ایجاد می‌شود. در این مسیر، ابتدا عروق باب و بعد شبکه عروق مرکزی درگیر می‌شود. سمیت کبدی ناشی از تتراکلرید کربن، برحسب دُز استفاده‌شده و مدت‌زمان قرار گرفتن در معرض آن متفاوت است. تیمار حیوانات با تتراکلرید کربن، باعث القای هیپاتیت حاد در محل پری ونولار می‌شود. تیمار پی‌درپی دُزهای بالاتر تتراکلرید کربن موجب افزایش میزان نکروز سلول‌های کبدی در مقایسه با زایش و ترمیم کبد می‌شود و به دنبال آن آسیب، تخریب کبد و سیروز کبدی اتفاق می‌افتد (۳۱).

گیاهان بسیاری در درمان مسمومیت و بیماری‌های کبدی در طب سنتی استفاده می‌شوند که بسیاری از آن‌ها حاوی ترکیبات پلی‌فنولی و فلاونوئیدها می‌باشند. گیاهان دارویی به‌دلیل سهولت دسترسی، عوارض جانبی کمتر، سمیت اندک و قیمت ارزان به‌عنوان جایگزین‌های شیمیایی همواره مورد توجه بوده‌اند. فنیل پروپانوئیدها یا ترکیبات فنولی دسته‌ای از ترکیبات شیمیایی گیاهی می‌باشند که اثرات درمانی و حفاظتی بسیاری به آن‌ها نسبت داده شده است و ازجمله آنتی‌اکسیدان‌های شناخته‌شده می‌باشند. این ترکیبات در درمان و حفاظت سلول‌های کبدی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو نیز مورد توجه می‌باشند. آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات فنولی در گیاهان دارویی می‌توانند از آثار سمی داروها بر کبد جلوگیری کنند و باعث کاهش آزاد شدن آنزیم‌های کبدی به داخل خون شوند (۳۲).

اسفناج سرشار از مواد مغذی ضروری است. عصاره اسفناج حاوی ترکیبات مهم با فعالیت فارماکولوژیکی است. ترکیبات پلی‌فنولی جداشده از گیاه اسفناج، شامل ارتوکوماریک اسید، پاراکوماریک اسید و فرولیک اسید می‌باشد (۳۳). در بین سبزیجات پرمصرف برگ‌ی، اسفناج ترکیبات فنولی بیشتری از کلم و کاهو دارد. اسفناج حاوی مقادیر ناچیزی از فلاونوئیدهای کوئرستین و کامفرول است، اما حاوی فلاونوئیدهای دیگری، ازجمله پاتولتین اسپیناستین، اسپیناتوزوئید و فلاون است (۳۴). مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در اسفناج شامل کاروتنوئیدها، بتا کاروتن، لوتئین و زاگزانتین همراه با ترکیبات فنولی می‌باشند. سایر ترکیبات شیمیایی شامل کلروفیل، گلوکاتیون، اسید لیپوئیک و بتائین می‌باشند. کاروتنوئیدها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. این ترکیبات به‌ویژه در حذف رادیکال‌های اکسیژن و پراکسیل مؤثر می‌باشند. آن‌ها با سایر کاروتنوئیدها و سایر آنتی‌اکسیدان‌ها به‌صورت هم‌افزایی عمل می‌کنند (۳۵). برگ اسفناج حاوی مقادیر زیادی اگزالات می‌باشد. فراوانی اگزالات در افرادی که دچار نارسایی کلیه می‌باشند، مضراست، زیرا اگزالات باعث جذب کلسیم می‌باشد. توصیه شده است افراد مبتلا به بیماری کلیوی در مصرف اسفناج زیاده‌روی نکنند (۳۶).

ترکیبات آنتی‌اکسیدان، ازجمله کمپلکس وانادیوم - روی، سلنیوم و پروبیوتیک‌ها با جaro کردن رادیکال‌های آزاد می‌توانند کبد را در برابر آسیب محافظت کنند (۳۷-۳۹). عصاره‌های گیاهی، ازجمله اسفناج با داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدان قادر به بهبود عملکرد کبد می‌باشند. Issazadeh و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند عصاره الکلی گونه اسفناج ایرانی به‌دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی، اسیدهای چرب غیراشباع، اسیدهای آمینه، ترپن‌ها، آلکالوئیدها و ... دارای خواص ضد میکروبی بوده و از این رو می‌توان از آن به‌عنوان آنتی‌بیوتیک

استفاده کرد (۴۰). گزارش شده است تیمار اسفناج التهاب عصبی را در هیپوکامپ موش‌های تحت استرس کاهش می‌دهد که ممکن است به دلیل وجود مواد شیمیایی گیاهی ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی فراوان باشد. اسفناج احتمالاً در پیشگیری و درمان بیماری‌های عصبی مؤثر می‌باشد (۴۱، ۴۲). اسفناج با کاهش میزان کورتیکوسترون و افزایش سطح گلوتامات و گلوتامین در کورتکس پری فرونتال، دارای خواص ضد استرس و ضد افسردگی است (۴۳). اسفناج احتمالاً در بازسازی زخم‌های دیابتی مؤثر بوده و بر ساختار و سرعت زخم تأثیر می‌گذارد و مدت زمان بهبودی را کاهش می‌دهد (۴۴). گزارشات نشان می‌دهد مکمل تیلاکوئید مشتق شده از اسفناج در مقایسه با محدودیت کالری به‌تنهایی به بهبود مطلوب‌تری در شاخص‌های تن‌سنجی و حساسیت به انسولین منجر شده است (۴۵).

در موش‌های مبتلا به استئاتوز، مصرف اسفناج و تجمع کاروتنوئیدها در کبد باعث کاهش محتوای اسیدهای چرب اشباع، نسبت اسیدهای چرب ۳-ω/۶-ω و کلسترول شده است. مکمل اسفناج، بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ التهابی را بهبود بخشید. اسفناج را می‌توان بخشی از یک استراتژی غذایی در کنترل و درمان کبد چرب به‌عنوان منبع طبیعی و ایمن کاروتنوئیدها در نظر گرفت (۴۶). نتایج مطالعات نشان می‌دهد اسفناج بر روی ROS اثر می‌گذارد و آسیب اکسیداتیو را کاهش می‌دهد. ترکیبات مشتق شده از عصاره اسفناج دارای اثرات ضدسرطانی می‌باشند (۴۷). عصاره اسفناج، اثر محافظتی بر دژنراسیون شبکه در موش‌های مبتلا به دیابت دارد (۴۸).

گزارشات نشان داد مصرف عصاره اسفناج، اثرات مفیدی بر پارامترهای بیوشیمیایی و استریولوژیک در موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک دارد. به‌صورتی‌که موجب بهبود میزان قند خون ناشتا، فاکتور نکروز تومور آلفا، سطح مالون دی‌آلدئید، مقاومت به انسولین و وزن بدن می‌شود (۴۹). عصاره اسفناج اثرات مفیدی در پیشگیری و درمان بیماری کبد چرب غیرالکلی نشان داد (۵۰). مصرف اسفناج باعث کاهش استئاتوز کبد و بهبود پروفایل گلوکز و چربی در مدل حیوانی بیماری کبد چرب غیرالکلی شد (۵۱). تیمار عصاره اسفناج در موش‌های مبتلا به انفارکتوس میوکارد به‌دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی، موجب بهبود شده و دارای اثر محافظت‌کننده قلبی است (۵۲). تیمار عصاره اسفناج در موش‌های تغذیه‌شده با رژیم غذای پرچرب به‌صورت معنی‌داری موجب کاهش مصرف غذا، افزایش وزن، فعالیت لیپاز پانکراس و پراکسیداسیون لیپیدی شد و پروفایل چربی و سطوح آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشید. عصاره اسفناج دارای اثر ضدهیپرلیپیدمیک است و با اثر مهاری خود بر لیپاز پانکراس نشان‌دهنده نقش مصرف غذاهای غنی از آنتی اکسیدان در حفظ پروفایل چربی طبیعی و کنترل چاقی است (۵۳). گزارش شده است محتوای پلی‌فنولی عصاره اسفناج، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنتی‌ژنوتوکسیک معنی‌داری را نشان می‌دهد. عصاره اسفناج کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (مانند Mn-SOD) را بهبود می‌بخشد. عصاره اسفناج منبع بالقوه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است و مصرف آن باعث بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود (۵۴). اسفناج که سرشار از فلاونوئیدها، اجزای فنولی، کاروتنوئیدها، ویتامین‌ها و مواد معدنی است به‌عنوان یک گیاه آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، محافظ کبد و عامل ضدسرطان استفاده می‌شود (۵۵). اثرات استخوان‌زایی و ترمیم شکستگی عصاره اسفناج در شرایط پس از یائسگی نشان داده شده است (۵۶). تیمار عصاره اسفناج در شرایط درون تن (in vitro) و برون تن (in vivo) موجب بهبود استئوآرتریت گردید (۵۷).

سبزیجات برگ‌سبز دارای خواص بسیاری برای ارتقای سلامتی می‌باشند که به خواص عملکردی مواد مغذی و ترکیبات شیمیایی غیرضروری آن‌ها نسبت داده می‌شود (۳۳). اسفناج به‌دلیل ترکیبات تغذیه‌ای متنوع که شامل ویتامین‌ها و مواد معدنی است و همچنین فیتوکمیکال‌ها و بیواکتیوهای آن که سلامتی را فراتر از تغذیه اولیه ارتقا می‌دهند، به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک غذای کاربردی در نظر گرفته می‌شود (۳۴، ۳۵). فیتوکمیکال‌ها و بیواکتیوهای مشتق شده از اسفناج می‌توانند: ۱. گونه‌های فعال اکسیژن را از بین ببرند و از آسیب اکسیداتیو ماکرومولکولی جلوگیری کنند، ۲. بیان و فعالیت ژن‌های دخیل در متابولیسم، تکثیر، التهاب و دفاع آنتی‌اکسیدانی را تعدیل کنند.

این فعالیت‌های بیولوژیکی به خواص ضدسرطانی، ضدچاقی، کاهش قند خون و کاهش چربی خون کمک می‌کنند (۳۵). اسفناج شامل مواد مغذی فراوانی می‌باشد. اسفناج یک منبع عالی ویتامین K، ویتامین A، منگنز، منیزیم، اسید فولیک آهن، ویتامین C ویتامین B₂ و پتاسیم است و فیبرهای غذایی فراوانی دارد. همچنین شامل ویتامین B₆ و ویتامین E است که برای حفظ و تنظیم بافت‌های بدن انسان ضروری می‌باشند. عصاره‌های گیاهی، از جمله اسفناج با دارا بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدان قادر به بهبود عملکرد کبد می‌باشند (۳۶).

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد تتراکلرید کربن موجب آسیب سلول‌های کبدی شده است. استفاده از عصاره الکلی اسفناج، کبد را در برابر مسمومیت کبدی ناشی از مصرف تتراکلرید کربن محافظت می‌کند. عصاره الکلی برگ اسفناج به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند کبد را در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از تتراکلرید کربن محافظت کند و با مهار برهم‌کنش‌های شیمیایی رادیکال‌های آزاد ناشی از تتراکلرید کربن که آغازکننده استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشند و همچنین با سرکوب روند التهاب بافتی در کبد، اثر حفاظت‌کنندگی خود در کبد را اعمال کند. البته مطالعات بیشتری در این زمینه لازم است.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر مطابق اصول اخلاقی مورد تأیید کمیته بین‌المللی حمایت از حقوق حیوانات آزمایشگاهی با کد مصوبه اخلاق (IR.IAU.SRB.REC.1400.184) انجام شده است.

سپاسگزاری

نویسندگان از واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی جهت حمایت از مطالعه حاضر، تقدیر و تشکر می‌کنند.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافی در ارتباط با این مطالعه وجود ندارد.

References

1. Budden KF, Gellatly SL, Wood DL, Cooper MA, Morrison M, Hugenholtz P, et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(1):51.5-63. doi: 10.1038/nrmicro.2016.142 PMID: 27694885
2. Ohimain EI, Ofongo RTS. The effect of probiotic and prebiotic feed supplementation on chicken health and gut microflora: A Review. *Int J Anim Vet Adv*. 2012;4(2):135-43.
3. Hume M. Food safety symposium: potential impact of reduced antibiotic use and the roles of prebiotics, probiotics, and other alternatives in antibiotic-free broiler production. *Poult Sci*. 2011;90(11):2663-9. doi: 10.3382/ps.2010-01030
4. Abd-El-Rahman AH, Kamel H, Ahmed WM, Mogoda OS, Mohamed AH. Effect of bacto-cell® and revitilyte-plus as probiotic food supplements on the growth performance, Hematological, Biochemical parameters and humoral immune response of broiler chickens. *World Appl Sci J*. 2012;18(3):305-16. doi: 10.5829/idosi.wasj.2012.18.03.63247
5. Jadhav K, Sharma K, Katoch S, Sharma V, Mane B. Probiotics in broiler poultry feeds: A review. *Int J Vet Sci*. 2015;1:4-16.
6. Flores C, Williams M, Pieniazek J, Dersjant-Li Y, Awati A, Lee JT. Direct-fed microbial and its combination with xylanase, amylase, and protease enzymes in comparison with AGPs on broiler growth performance and foot-pad lesion development. *J Appl Poult Res*. 2016;25(3):328-37. doi: 10.3382/japr/pfw016
7. Buckley A, Turner JR. Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(1):a029314. doi: 10.1101/cshperspect.a029314 PMID: 28507021
8. Bai SP, Wu AM, Ding XM, Lei Y, Bai J, Zhang KY, et al. Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poult Sci*. 2013;92(3):663-70. doi: 10.3382/ps.2012-02813 PMID: 234365171
9. Nakphaichit M, Thanomwongwattana S, Phraephaisarn C, Sakamoto N, Keawsompong S, Nakayama J, et al. The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. *Poult Sci*. 2011;90(12):2753-65. doi: 10.3382/ps.2011-01637 PMID: 22080014
10. Olnood CG, Beski SSM, Choct M, Iji PA. Novel probiotics: Their effects on growth performance, gut development, microbial community and activity of broiler chickens. *Anim Nut*. 2015;1(3):184-91. doi: 10.1016/j.aninu.2015.07.003 PMID: 29767136

11. 1Mehdi GJ, Vahid RP, Mehdi MZN, Mohammad RT, Naser D. The effect of novel probiotic on blood parameters and performance in broiler chickens. *J Cell Anim Biol*. 2009;3(8):141-4.
12. Anonymous, Arian line chicken education. Arian Broiler Breeding Guide. 1st ed. Tehran, Iran; 2020.
13. Zhang ZF, Kim IH. Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. *Poult Sci*. 2014;93(2):364-70. doi: [10.3382/ps.2013-03314](https://doi.org/10.3382/ps.2013-03314) PMID: 24570458
14. Khaksefidi A, Ghoorchi T. Effect of probiotic on performance and immunocompetence in broiler chicks. *J Poult Sci*. 2006;43(3):296-300. doi: [10.2141/jpsa.43.296](https://doi.org/10.2141/jpsa.43.296)
15. Gunal M, Yayli G, Kaya O, Karahan N, Sulak O. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. *Int J Poult*. 2006;5(2):149-55. doi: [10.3923/ijps.2006.149.155](https://doi.org/10.3923/ijps.2006.149.155)
16. Mnisi C, Matshogo T, Van Niekerk R, Mlambo V. Growth performance, haemo-biochemical parameters and meat quality characteristics of male Japanese quails fed a Lippia javanica-based diet. *S Afr J Anim Sci*. 2017;47(5):661-72. doi: [10.4314/sajas.v47i5.9](https://doi.org/10.4314/sajas.v47i5.9)
17. Biswas A, Dev K, Tyagi PK, Mandal A. The effect of multi-strain probiotics as feed additives on performance, immunity, expression of nutrient transporter genes and gut morphometry in broiler chickens. *Anim Biosci*. 2022;35(1):64-74. doi: [10.5713%2Fab.20.0749](https://doi.org/10.5713%2Fab.20.0749) PMID: 33677909
18. Awad W, Ghareeb K, Abdel-Raheem S, Böhm J. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poult Sci*. 2009;88(1):49-56. doi: [10.3382/ps.2008-00244](https://doi.org/10.3382/ps.2008-00244)
19. Patterson JA, Burkholder KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci*. 2003;82(4):627-31. doi: [10.1093/ps/82.4.627](https://doi.org/10.1093/ps/82.4.627) PMID: 12710484
20. Hu Z, Ni J, Cao Y, Liu X. Newcastle disease virus as a vaccine vector for 20 years: a focus on maternally derived antibody interference. *Vaccines*. 2020;8(2):222. doi: [10.3390/vaccines8020222](https://doi.org/10.3390/vaccines8020222) PMID: 32422944
21. Gadde U, Kim W, Oh S, Lillehoj HS. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Anim Health Res*. 2017;18(1):26-45. doi: [10.1017/S1466252316000207](https://doi.org/10.1017/S1466252316000207) PMID: 28485263
22. Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap Adv Gastroenterol*. 2013;6(1):39-51. doi: [10.1177/1756283X12459294](https://doi.org/10.1177/1756283X12459294) PMID: 23320049
23. Abd El-Moneim AE, Sabic EM. Beneficial effect of feeding olive pulp and *Aspergillus awamori* on productive performance, egg quality, serum/yolk cholesterol and oxidative status in laying Japanese quails. *J Anim Feed Sci*. 2019;28(1):52-61. doi: [10.1038/nrmicro.2016.142](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.142)
24. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70(1):158-69. PMID: 6066618
25. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993;57(5):715S-24S. doi: [10-1093/ajcn/57-5-715S](https://doi.org/10-1093/ajcn/57-5-715S) PMID: 8475889
26. French SW, Miyamoto K, Ohta Y, Geoffrion Y. Pathogenesis of experimental alcoholic liver disease in the rat. *Methods Achiev Exp Pathol*. 2000;13:181-207.
27. Ojo OA, Ojo AB, Ajiboye B, Fadaka A, Imiere OD, Adeyolu O, Olayide I. Protective influence of Ficus asperifolia Miq leaf extract on carbon tetrachloride (CCl4)-induced testicular toxicity in rat's testes. *J App Pharm Sci*. 2016;6(6):37-41. doi: [10.7324/JAPS.2016.60607](https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60607)
28. Hirschfield GM, Dyson JK, Alexander GJM, Chapman MH, Collier J, Hübscher S, et al. The British society of gastroenterology/UK-PBC primary biliary cholangitis treatment and management guidelines. *Gut*. 2018;67(9):1568-94. doi: [10.1136/gutjnl-2017-315259](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315259) PMID: 29593060
29. Anand KV, Anandhi R, Pakkiyaraj M, Geraldine P. Protective effect of chrysin on carbon tetrachloride (CCl4)-induced tissue injury in male Wistar rats. *Toxicol Ind Health*. 2011;27(10):923-33. doi: [10.1177/0748233711399324](https://doi.org/10.1177/0748233711399324) PMID: 21511893
30. Li GY, Gao HY, Huang J, Lu J, Gu JK, Wang JH. Hepatoprotective effect of Cichorium intybus L., a traditional Uighur medicine, against carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *World J Gastroenterol*. 2014;20(16):4753-60. doi: [10.3748/wjg.v20.i16.4753](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i16.4753) PMID: 24782629

31. Harris TR, Bettaieb A, Kodani S, Dong H, Myers R, Chiamvimonvat N, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates hepatic fibrosis and endoplasmic reticulum stress induced by carbon tetrachloride in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015;286(2):102-11. [doi: 10.1016/j.taap.2015.03.022](#) PMID: 25827057
32. Noguchi N, Niki E. Phenolic antioxidants: a rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2000;2v8(10):1538-46. [doi: 10.1016/s0891-5849\(00\)00256-2](#) PMID: 10927179
33. Bunea A, Andjelkovic M, Socaciu C, Bobis O, Neacsu M, Verhé R, et al. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chem*. 2008;108(2):649-5. [doi: 10.1016/j.foodchem.2007.11.056](#) PMID: 26059144
34. Koh E, Charoenprasert S, Mitchell AE. Effect of organic and conventional cropping systems on ascorbic acid, vitamin C, flavonoids, nitrate, and oxalate in 27 varieties of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *J Agric Food Chem*. 2012;60(12):3144-50. [doi: 10.1021/jf300051f](#) PMID: 22393895
35. Hedges LJ, Lister CE. Nutritional Attributes of Spinach, Silverbeet and Eggplant. Christchurch: New Zealand Institute Crop Food Res Limited. 2007; p.1982.
36. Wang JF, Zhou Y, Dong CX, Shen QR, Putheti R. Effects of NH₄⁺-N/ NO₃⁻-N ratios on growth, nitrate uptake and organic acid levels of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *AJB*. 2009;8(15):3597-602.
37. Soltanpour M, Banan Khojasteh SM, Hamidian G, Nahali S, Morovvati H. Evaluation of the effect of vanadium-zinc complex on the changes in histological and stereological structure, functional enzymes, and oxidative stress indices of liver tissue in adult male rats with Type 2 diabetes. *J Vet Res*. 2022;77(3):177-86. (In Persian). [doi: 1022059/jvr20223256473167](#)
38. Hashemi S, Ganjkanloo M, Rezayazdi K, Zali A, Rafipour R, Amini M. Study of selenium nanoparticles synthesis and investigation of its effect compared with other selenium sources on the blood parameters associated with the liver functional index of holstein dairy cow. *J Vet Res*. 2020;75(1):17-25. (In Persian). [doi: 1022059/JVR20182372372661](#)
39. Mohammadian T, Jangaran Nejad A, Badii E, Momeni H, Tabandeh M, et al. Effect of atutochthonous probiotics, isolated from fish intestine on biochemical parameters and hepatic enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Vet Res*. 2021;76(1):22-30. (In Persian). [doi: 1022059/JVR20202966083018](#)
40. Issazadeh SA, Hatami S, Yavarmanesh M. In vitro investigation of chemical composition and antibacterial activity of alcoholic, hydroalcoholic extracts, and essential oil of (*Spinacia oleracea* L.) leaves from Iran. *J Food Saf*. 2021;41:e12891. [doi: 101111/jfs12891](#)
41. Olasupo AD, Aborisade AB, Olagoke OV. Phytochemical analysis and antibacterial activities of spinach leaf. *Am J Phytomed Clin Ther* 2018;6(2):8. [doi: 1021767/2321-2748100344](#)
42. Pezeshki-Nia S, Asle-Rousta M, Mahmazi S. (*Spinacia oleracea* L.) extract attenuates hippocampal expression of TNF- α and IL-1 β in rats exposed to chronic restraint stress. *Med J Islam Repub Iran*. 2020;34:10. [doi: 10.34171/mjiri.34.10](#) PMID: 32284934
43. Son H, Jung S, Shin JH, Kang MJ, Kim HJ. Anti-stress and anti-depressive effects of spinach extracts on a chronic stress-induced depression mouse model through lowering blood corticosterone and increasing brain glutamate and glutamine levels. *J Clin Med*. 2018;7:406. [doi: 10.3390/jcm7110406](#) PMID: 30384468
44. Rahati S, Kamalinezhad M, Ebrahimi A, Eshraghian M, Pishva H. Accelerated wound healing induced by spinach extract in experimental model diabetic rats with streptozotocin. *Sci Rep*. 2023;13(1):14933. [doi: 101038/s41598-023-42033-0](#) PMID: 37696865
45. Tabrizi FPF, Farhangi MA, Vaezi M, Hemmati S. The effects of spinach-derived thylakoid supplementation in combination with calorie restriction on anthropometric parameters and metabolic profiles in obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Nutr J*. 2020;19(1):82. [doi: 101186/s12937-020-00601-4](#) PMID: 32782010
46. Elvira-Torales LI, Martín-Pozuelo G, González-Barrio R, Navarro-González I, Pallarés FJ, Santaella M, et al. Ameliorative effect of spinach on non-alcoholic fatty liver disease induced in rats by a high-fat diet. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1662. [doi: 10.3390/ijms20071662](#) PMID: 30987167
47. Arru L, Mussi F, Forti L, Buschini A. Biological effect of different spinach extracts in comparison with the individual components of the phytocomplex. *Foods*. 2021;10(2):382. [doi: 10.3390/foods10020382](#) PMID: 33572474
48. Bautista-Pérez R, Cano-Martínez A, Gutiérrez-Velázquez E, Martínez-Rosas M, Pérez-Gutiérrez RM, Jiménez-Gómez F, et al. Spinach methanolic extract attenuates the retinal degeneration in diabetic rats. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(5):717. [doi: 103390/antiox10050717](#) PMID: 34063668

49. Sherafatmanesh S, Ekramzadeh M, Tanideh N, Golmakani MT, Koohpeyma F. The effects of thylakoid-rich spinach extract and aqueous extract of caraway (*Carum carvi* L.) in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome rats. BMC Complement Med Ther. 2020;20(1):249. doi: [10.1186/s12906-020-03044-w](https://doi.org/10.1186/s12906-020-03044-w) PMID: [32787839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32787839/)
50. Amirinejad A, Hekmatdoost A, Ebrahimi A, Ranjbaran F, Shidfar F. The effects of hydroalcoholic extract of spinach on prevention and treatment of some metabolic and histologic features in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease. J Sci Food Agric. 2020;100(4):1787-96. doi: [10.1002/jsfa10215](https://doi.org/10.1002/jsfa10215) PMID: [31849065](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31849065/)
51. Elvira-Torales LI, Periago MJ, Gonzalez-Barrio R, Hidalgo N, Navarro-Gonzalez I, Gomez-Gallego C, et al. Spinach consumption ameliorates the gut microbiota and dislipaemia in rats with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Food Funct. 2019;10(4):2148-60. doi: [10.1039/C8FO01630E](https://doi.org/10.1039/C8FO01630E) PMID: [30938723](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30938723/)
52. Panda V, Bhandare N, Mistry K, S S, Dande P. Cardioprotective potential of (*Spinacia oleracea* L.) (Spinach) against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. Arch Physiol Biochem. 2022;128(1):101-10. doi: [10.1080/13813455.2018.1502323](https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1502323) PMID: [20191665074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20191665074/) PMID: [31522557](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31522557/)
53. Panda V, Shinde P, Dande P. Consumption of (*Spinacia Oleracea* L.) (spinach) and aerobic exercise controls obesity in rats by an inhibitory action on pancreatic lipase. Arch Physiol Biochem. 2020;126(3):187-95. doi: [10.1080/13813455.2018.1502323](https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1502323) PMID: [30270679](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30270679/)
54. Ko SH, Park JH, Kim SY, Lee SW, Chun SS, Park E. Antioxidant effects of spinach (*Spinacia oleracea* L.) supplementation in hyperlipidemic rats. Prev Nutr Food Sci. 2014;19(1):19-26. doi: [10.3746/pnf2014191019](https://doi.org/10.3746/pnf2014191019) PMID: [24772405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24772405/)
55. Roberts JL, Moreau R. Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives. Food Funct. 2016;7(8):3337-53. doi: [10.1039/c6fo00051g](https://doi.org/10.1039/c6fo00051g) PMID: [27353735](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27353735/)
56. Adhikary S, Choudhary D, Ahmad N, Kumar S, Dev K, Mittapelly N, et al. Dried and free flowing granules of (*Spinacia oleracea* L.) accelerate bone regeneration and alleviate postmenopausal osteoporosis. Menopause. 2017;24(6):686-98. doi: [10.1097/GME.0809](https://doi.org/10.1097/GME.0809) PMID: [28118295](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28118295/)
57. Choudhary D, Kothari P, Tripathi AK, Singh S, Adhikary S, Ahmad N, et al. (*Spinacia oleracea* L.) extract attenuates disease progression and sub-chondral bone changes in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. BMC Complement Altern Med. 2018;18(1):69. doi: [10.1186/s12906-018-2117-9](https://doi.org/10.1186/s12906-018-2117-9) PMID: [29463254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29463254/)