

بررسی اثر محافظتی عصاره اتانولی و آبی دانه گیاه انیسون *Pimpinella anisum L.* در آسیب کبدی ناشی از داروی شیمی درمانی L-آسپاراژیناز در موش‌های صحرایی با استفاده از رادیوداروی کبدی ^{99m}Tc -فیتیت

سمیه شاهانی^۱ (Ph.D)، میثم صحرانورد^۲ (Pharm D)، فرشته طالب‌پور امیری^۳ (Ph.D)، سید محمد عابدی^۴ (Nuclear Medicine Specialist)، زهره نوع‌پرست^{۲*} (Ph.D)

۱- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، گروه فارماکولوژی و بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲- گروه داروسازی هسته‌ای، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳- گروه آناتومی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴- گروه رادیولوژی، مرکز تحقیقات قلب و عروق، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱-۳۳۵۴۲۲۷۲ و z_noparast@yahoo.com و z_noparast@mazums.ac.ir تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۶

چکیده

هدف: در این مطالعه به بررسی اثر محافظتی عصاره اتانولی و آبی دانه گیاه انیسون در آسیب کبدی ناشی از داروی شیمی‌درمانی L-آسپاراژیناز در موش صحرایی با استفاده از رادیوداروی کبدی نشاندار با ^{99m}Tc پرداخته شده است. مواد و روش‌ها: ۶۰ موش صحرایی ماده به ۹ گروه تداخل شامل گروه L-آسپاراژیناز، دو گروه عصاره آبی ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg، دو گروه عصاره اتانولی ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg، گروه عصاره آبی ۱۰۰ mg/kg + L-آسپاراژیناز، گروه عصاره آبی ۲۰۰ mg/kg + L-آسپاراژیناز، گروه عصاره اتانولی ۱۰۰ mg/kg + L-آسپاراژیناز و گروه عصاره اتانولی ۲۰۰ mg/kg + L-آسپاراژیناز و یک گروه شاهد تقسیم شدند. رت‌ها L-آسپاراژیناز را به میزان ۱۰۰۰ IU/Kg در حلال نرمال سالین به صورت داخل صفاقی و یک روز در میان طی دوره ۷ روزه و عصاره آبی و اتانولی دانه گیاه انیسون به مدت ۷ روز متوالی به صورت گاوژ دریافت کردند. ۲۴ ساعت پس از دریافت آخرین دوز عصاره و دارو، رت‌ها ۲۰ دقیقه پس از تزریق رادیوداروی ^{99m}Tc -Phytate با دوز کشنده کتامین/زایلازین کشته و ارگان‌های حیاتی از پیکره آن‌ها جدا و اکتیویته آن‌ها با دستگاه گاماکانتر اندازه‌گیری شد. تصویربرداری با گاماکامرا و ارزیابی‌های پاتولوژیکی و خونی جهت بررسی‌های بیش‌تر انجام شد.

یافته‌ها: آسیب کبدی ناشی از داروی L-آسپاراژیناز در رت‌های تیمار شده با عصاره دانه انیسون به ویژه عصاره اتانولی به طور قابل توجهی کاهش یافت. لازم به ذکر است که عصاره دانه انیسون به ویژه عصاره آبی به تنهایی منجر به آسیب کبدی گردید ($P < 0.05$) که احتمال می‌رود عمدتاً ناشی از آلودگی گیاه به ترکیبات سمی پیرولیزیدین آلکالوئید باشد.

نتیجه‌گیری: عصاره اتانولی دانه انیسون به دلیل وجود ترکیباتی هم‌چون آنتول و ترکیبات فنولیک می‌تواند باعث کاهش سمیت کبدی ناشی از داروی شیمی‌درمانی L-آسپاراژیناز در موش‌های صحرایی شود.

واژه‌های کلیدی: L-آسپاراژیناز، عصاره دانه انیسون، سمیت کبدی، رادیوداروی ^{99m}Tc -فیتیت، کبد، موش‌های صحرایی

مقدمه

سرطان خون یا لوکمی یک بیماری پیش‌رونده و بدخیم اعضای خون‌ساز بدن است که از جمله سرطان‌های شایع در کودکان به حساب می‌آید. این بیماری در اثر تکثیر و تکامل ناقص گویچه‌های سفید خون و پیش‌سازهای آن در خون و مغز استخوان ایجاد می‌شود. در افراد مبتلا به ALL لنفوبلاست‌ها در مغز استخوان به طور مداوم تولید و تکثیر شده و باعث مرگ و مهار تولید سلول‌های طبیعی مانند گلبول‌های قرمز، گلبول‌های

سفید و پلاکت‌ها می‌گردند [۱]. درمان لوکمی حاد لنفوئیدی شامل شیمی‌درمانی، درمان با استروئیدها، رادیوتراپی، درمان ترکیبی فشرده (از جمله پیوند مغز استخوان یا پیوند سلول‌های بنیادی)، و عوامل رشد می‌باشد [۲]. کموتراپی خط اول درمان ALL بوده و از جمله داروهای به کار گرفته در کاهش روند بیماری می‌توان به داروی آسپاراژیناز اشاره نمود که آسیب حاد کبدی از مشکلات مهم در حین شیمی‌درمانی می‌باشد [۳، ۴]. L-آسپاراژیناز هیدرولیز L-آسپاراژین به L-آسپاراتیک اسید

بررسی مقالات نشان می‌دهد که در دانه گیاه انیسون به غیر از ترکیبات فرار که عمده آن را ترکیب آنتول تشکیل می‌دهد، حاوی ترکیبات فنولیک از جمله مشتقات کلروژنیک اسید بوده که می‌تواند در بروز اثرات محافظتی این گیاه نقش داشته باشد. عصاره آبی به دست آمده از دانه‌های این گیاه حاوی مقادیر بالایی ترکیبات پلی‌فنولی است که خواص آنتی‌اکسیداتی این گیاه را سبب می‌شود. از سوی دیگر مطالعات نشان داده است که ترانس آنتول که جزء عمده در اسانس انیس می‌باشد فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل مقایسه‌ای نسبت به ترکیبات استاندارد مشابه مانند آسکوربیک اسید و BHT از خود نشان می‌دهد [۱۱-۱۶]. هم‌چنین گزارش شده است که عصاره روغنی این گیاه می‌تواند استئاتوز کبدی را به دلیل کاهش قابل توجه ماکرو و میکرو و زیکولار استئاتوز به بهبود ببخشد [۱۷]. با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی مناسب گیاه انیسون و هم‌چنین کاربرد مردمی این گیاه، بر آن شدیم میزان اثربخشی عصاره الکلی و آبی دانه گیاه انیسون در جلوگیری و کاهش آسیب کبدی ناشی از داروی شیمی‌درمانی L-آسپاراژیناز را در رت‌های تیمار شده از طریق اندازه‌گیری کمی میزان تجمع رادیوداروی کبدی ^{99m}Tc -Phytate و آنالیزهای هیستوپاتولوژی و خونی تعیین کنیم. رادیو داروی ^{99m}Tc -Phytate به عنوان یک عامل تصویربرداری به طور گسترده برای تشخیص و ارزیابی بیماری‌های کبدی از قبیل استئاتوز در پزشکی هسته‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آن‌جا که این رادیو دارو به واسطه خاصیت فاگوسیتوزکنندگی سلول‌های کوپفر در کبد تجمع می‌یابد تخریب عملکرد سلول‌های کوپفر در کبد سبب می‌شود که این سلول‌ها نتوانند رادیو دارو را جذب کنند. بنابراین چگونگی توزیع رادیودارو در سیستم رتیکولاندوتلیال می‌تواند شاخص مناسبی در ارزیابی عملکرد کبدی باشد [۱۸]. لذا کاهش جذب رادیو دارو در گروه‌های دریافت‌کننده داروی شیمی‌درمانی نشان از آسیب کبدی است و بهبود جذب کبدی در گروه‌هایی که به طور هم‌زمان عصاره آبی و یا اتانولی دانه انیسون را دریافت کرده‌اند نشان‌دهنده اثرات محافظتی کبدی عصاره و به عبارتی کاهش عوارض کبدی داروی شیمی‌درمانی است. لازم به ذکر است که به دلیل حلالیت ترکیب آنتول در حلال اتانول و هم‌چنین وجود دسته‌ای از ترکیبات فنولیک در دانه گیاه که به راحتی وارد فاز مایعی می‌شوند و با توجه به این‌که در کاربرد مردمی نیز به نوعی از آب استفاده می‌شود، لذا حلال‌های اتانول و آب جهت عصاره‌گیری انتخاب شدند.

و آمونیاک را کاتالیز کرده و در پی کاهش این اسیدآمینه ضروری مهار پرولیفریشن سلول‌های بدخیم لنفوی را که برخلاف سلول‌های نرمال قادر به سنتز مجدد L-آسپاراژین نیستند سبب می‌شود. در نتیجه این عملکرد امکان مشاهده هیپر آمونمی نیز در بیماران وجود خواهد داشت. مکانیسم دقیق آسیب کبدی آن مشخص نبوده اما به کاهش آسپاراژین و سنتز پروتئین‌های غیر طبیعی و استئاتوز شدید کبدی نسبت داده می‌شود که سبب تغییرات زیاد بیوشیمیایی و هیستولوژیکی در کبد می‌گردند. در مطالعات دیگر نشان داده شده است که استئاتوز کبدی در اتویسی ۸۷-۴۲٪ از بیماران مشاهده شده است [۴،۵]. از سوی دیگر تصور می‌شود مکانیسم آسیب کبدی ناشی از داروهای شیمی‌درمانی به تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) نسبت داده می‌شود که منجر به القاء آپوپتوز سلول تومور می‌گردند [۶]. یافته‌ها بیانگر آن است که ROS منجر به آسیب بافتی از طریق اتصال کووالانسی و اکسیداسیون چربی شده و هم‌چنین منجر به تقویت فیروز و افزایش سنتز کلاژن می‌گردد [۷]. استفاده از مهارکننده‌های رادیکال آزاد می‌تواند منجر به کاهش آسیب بافتی در ارگان‌ها شود. بحث‌های زیادی در استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدان در بیماران تحت شیمی‌درمانی مبنی بر تداخل اثر آنتی‌اکسیدان‌ها با مکانیسم عمل دارو و کاهش اثربخشی شیمی‌درمانی وجود دارد. از سوی دیگر استدلال‌هایی مبتنی بر اهمیت استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدان در بیماران تحت شیمی‌درمانی وجود دارد که افزایش اثرات درمان و کاهش عوارض جانبی داروهای شیمی‌درمانی را دلیل اصلی دانسته که می‌تواند منجر به افزایش تحمل بیماران نسبت به یک دوره کامل درمان و نیاز کم‌تر به کاهش دوز دارو می‌شود [۸،۹]. مطالعات زیادی بیانگر این واقعیت است که ترکیبات طبیعی با فعالیت بیوزیستی توانایی حفاظت از کبد در مقابل آسیب‌های ناشی از ترکیبات شیمیایی همانند الکل و داروهای شیمی‌درمانی را دارا می‌باشند [۱۰]. انیسون با نام علمی *Pimpinella anisum L.* گیاهی با گل‌های سفید و دانه‌های سبز و زرد کوچک، معطر و شیرین از خانواده چتریان می‌باشد. این گیاه دارای خاصیت آنتی‌باکتریایی قوی است و در کشورهای ترکیه، ایران، هند و مصر و بسیاری از نقاط گرم جهان می‌روید. مطالعات فیتوشیمیایی نشان داده است که گیاه انیسون حاوی درصد بالایی آنتول (Anethole) و هم‌چنین ترکیبات دیگری هم‌چون استراگول (Estragole)، اوژنول (Eugenol)، لیمونن (Limonene) و غیره بوده و دارای اثرات درمانی در سیستم گوارشی، بیماری‌های تنفسی و نورولوژیک، ضدباکتری و شل‌کنندگی عضلانی می‌باشد. هم‌چنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی انیسون نیز در مطالعات مختلف مورد تایید قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد: دانه گیاه انیسون از بازار گیاهان دارویی از اطراف شهر تبریز خریداری و سپس نمونه هر باریومی تهیه شده از آن پس از تایید توسط متخصص سیستماتیک گیاهی در هر باریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، به شماره A-E1-218-2121 نگهداری شد. داروی L-آسپاراژیناز تولیدی از شرکت Biochem هند و کیت فیتیت با نام تجاری Technephyte (کلسیم فیتیت کلوتید) از مرکز پزشکی فاطمه الزهرا (ساری، ایران) تهیه و رادیو داروی ^{99m}Tc -phytate colloid مطابق با دستورالعمل سازندگان تهیه گردید. رت‌های ماده از حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی مازندران با محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم تهیه و در محیط مناسب در حیوان‌خانه دانشکده (دمای ۲۵ سانتی‌گراد و سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعت و با دسترسی به آب و غذا کافی) قرار داده شدند. مسائل اخلاقی حیوانات با کد IR.MAZUMS.REC.95.2252 مورد تایید کمیته تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی مازندران (ساری، ایران) قرار گرفت.

عصاره‌گیری از گیاه انیسون: دانه خشک گیاه انیسون با استفاده از آسیاب برقی خرد شد و از یک کیلوگرم دانه خرد شده، به روش خیساندن با حلال‌های اتانول ۹۶٪ و آب مقطر به‌طور جداگانه عصاره‌گیری گردید. عمل عصاره‌گیری ۳ بار و با فواصل زمانی ۴۸ ساعت انجام شد و به منظور تغلیظ عصاره، از دستگاه روتاری اوپراتور (تقطیر در خلاء) استفاده گردید. عصاره نهایی به دست آمده توسط دستگاه فریز درایر، کاملاً خشک شد و بازده عصاره‌گیری محاسبه گردید.

تعیین میزان فنول و فلاونوئید تام عصاره اتانولی و آبی دانه گیاه انیسون: میزان فنول تام موجود در عصاره‌ها با استفاده از روش فولین سیکالتو با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV در طول موج ۷۶۵ نانومتر محاسبه گردید. برای رسم منحنی استاندارد از گالیک اسید در غلظت‌های مختلف (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد و میزان فنول تام موجود در عصاره‌ها به صورت "معادل میلی‌گرم گالیک اسید در یک گرم عصاره خشک" گزارش گردید [۱۹]. برای محاسبه میزان تام فلاونوئید موجود در عصاره‌ها از روش رنگ‌سنجی آلومینیم کلراید استفاده گردید و جذب محلول‌های استاندارد و عصاره‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. از غلظت‌های مختلف کوئرستین (۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد و میزان فلاونوئید تام موجود در عصاره‌ها به صورت "معادل میلی‌گرم کوئرستین در یک گرم عصاره خشک" گزارش گردید [۲۰].

بررسی توزیع بیولوژیکی رادیوداروی ^{99m}Tc -Phytate

در رت: رت‌ها به‌طور تصادفی به ده گروه ۶ تایی طبقه‌بندی شدند: گروه اول: گروه شاهد (نرمال سالین). گروه دوم: L-آسپاراژیناز (۱۰۰ IU/kg) در حلال نرمال سالین). گروه سوم: عصاره آبی (۱۰۰ mg/Kg). گروه چهارم: عصاره الکلی (۱۰۰ mg/Kg). گروه پنجم: عصاره آبی (۲۰۰ mg/Kg). گروه ششم: عصاره الکلی (۲۰۰ mg/Kg). گروه هفتم: عصاره آبی (۱۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز (۱۰۰۰ IU/kg). گروه هشتم: عصاره الکلی (۱۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز (۱۰۰۰ IU/kg). گروه نهم: عصاره آبی (۲۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز (۱۰۰۰ IU/kg). گروه دهم: عصاره الکلی (۲۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز (۱۰۰۰ IU/kg). لازم به ذکر است که عصاره آبی و الکلی از طریق گاواژ در هفت روز متوالی و داروی L-آسپاراژیناز در روزهای دوم و چهارم و ششم در گروه‌های ۲، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ به صورت داخل صفاقی تزریق شد [۱۷، ۲۱، ۲۲]. پس از گذشت ۲۴ ساعت از آخرین گاواژ، رادیوداروی ^{99m}Tc -Phytate طبق دستورالعمل موجود در کیت تجاری تهیه گردید. به هر ویال حاوی پودر لیوفیلیزه میزان ۱۰ mCi سدیم پرتکتنتات-۹۹m در ۴ ml نرمال سالین اضافه و بعد از تکان دادن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری تا فرایند نشاندارسازی تکمیل و کمپلکس ^{99m}Tc -Phytate تشکیل شود سپس ۱۰ MBq از رادیودارو در حجم ۰/۱ ml از طریق ورید دم به تمامی رت‌ها تزریق و پس از گذشت ۲۰ دقیقه رت‌ها با تزریق داخل صفاقی از دوز کشته مخلوط کتامین و زایلازین بی‌هوش و کشتن موش‌ها با کشیدن مستقیم خون از قلب پس از بی‌هوشی کامل انجام شد. سپس اعضا و جوارحی از قبیل قلب، ریه، تیروئید و غدد بزاقی، طحال، معده، ماهیچه، استخوان، کلیه‌ها و کبد از جسد رت‌ها خارج و پس از انتقال به لوله‌های شمارش گر گاما میزان اکتیویته آن‌ها توسط دستگاه شمارش گر گاما اندازه‌گیری و میزان دوز جمعی هر ارگان به صورت ID/gf (%) بیان شد. نتایج عددی به صورت میانگین داده‌ها \pm انحراف استاندارد گزارش و برای بررسی تفاوت آماری بین گروه شاهد و سایر گروه‌ها از آزمون ANOVA استفاده و $P < 0/05$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

تصویربرداری هسته‌ای: جهت تایید نتایج توزیع بیولوژیکی

یک رت به‌طور تصادفی از گروه‌های فوق‌الذکر انتخاب و سپس ۱۰ MBq از رادیوداروی ^{99m}Tc -Phytate در حجم ۰/۱ ml راز طریق ورید دم به رت‌ها تزریق شد. رت‌ها به مرکز پزشکی هسته‌ای بیمارستان فاطمه‌الزهرا منتقل و پس از گذشت ۲۰ از زمان تزریق رادیودارو به وسیله تزریق داخل صفاقی دوز کشته از مخلوط کتامین و زایلازین بی‌هوش و تصاویر استاتیک خلفی

محاسبه شد. لازم به ذکر است، معادله خط حاصل از منحنی استاندارد گالیک اسید و کوئرستین به ترتیب به صورت $y=0.0016x-0.0021$ و $y=0.0134x+0.1553$ ($R^2=0.9978$) ($R^2=0.9993$) به دست آمد.

نتایج توزیع بیولوژیکی رادیوداروی ^{99m}Tc -Phytate در موش‌های صحرایی:

نتایج حاصل از توزیع بیولوژیکی رادیوداروی ^{99m}Tc -Phytate به صورت درصد دوز تجمعی ارگان‌های حیاتی ID/gf (%) در جدول ۱ گزارش شده است. نتایج عددی به صورت میانگین داده‌ها \pm انحراف استاندارد گزارش و برای بررسی تفاوت آماری بین گروه شاهد و سایر گروه‌ها از آزمون ANOVA استفاده و $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد (جدول ۲ و ۳). نتایج داده‌های توزیع بیولوژیکی نشان داد که داروی شیمی‌درمانی L-آسپاراژیناز منجر به کاهش چشمگیر جذب کبدی رادیوداروی ^{99m}Tc -Phytate در مقایسه با گروه کنترل شده است. جذب بافت کبد و طحال در گروه دریافت‌کننده L-آسپاراژیناز و کنترل به ترتیب $2/72 \pm 9/73$ و $31/3 \pm 89/81$ ، $31/98 \pm 2/89$ و $13/1 \pm 24/8$ بوده که تفاوت آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار بوده ($P < 0.05$) و سمیت کبدی ناشی از داروی شیمی‌درمانی L-آسپاراژیناز را نشان می‌دهد که منجر به تغییر توزیع رادیو دارو از کبد به سمت طحال در مقایسه با گروه کنترل شده است. از سوی دیگر میزان جذب رادیوکتیویته در ارگان کبد در موش‌های صحرایی که روزانه دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/Kg از عصاره آبی انیسون را به تنهایی دریافت کرده‌اند به ترتیب $12/48 \pm 1$ و $14/11 \pm 1/46$ بوده که نظر آماری کاهش قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل داشته است ($P < 0.05$). این در حالی است که میزان جذب در طحال در مقایسه با گروه کنترل تا حدی کاهش یافته اما از لحاظ آماری معنادار نمی‌باشد. در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره اتانولی انیسون نیز در دوزهای دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/Kg، میزان جذب رادیودارو در ارگان‌های کبد و طحال به ترتیب $19/1 \pm 78/66$ ، $24/44 \pm 1/02$ و $21/1 \pm 17/96$ ، $26/21 \pm 2/51$ بوده است. کاهش در میزان جذب کبدی رادیو دارو و افزایش جذب در طحال در مقایسه با گروه کنترل از لحاظ آماری معنادار بوده است ($P < 0.05$) و می‌تواند گویای تغییر توزیع رادیودارو از کبد به سمت طحال به دلیل آسیب کبدی ناشی از عصاره باشد. این در حالی است که کاهش در میزان جذب کبدی رادیو دارو در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره آبی در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده عصاره اتانولی چشمگیرتر بوده که نشان از آسیب کبدی بالاتر عصاره آبی است ($P < 0.05$). در بررسی اثرات حفاظتی عصاره آبی و الکلی

با دوربین گاما دوسر مجهز به یک کولیماتور با وضوح بالا با انرژی کم گرفته شد. لازم به ذکر است هیچ ارگانی از موش‌ها برای تصویربرداری جدا یا خارج نشد.

ارزیابی بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژی: حیوانات با استفاده از مخلوط کنامین و زایلازین بی‌هوش شدند. سپس نمونه‌های خون و بافت کبد برای ارزیابی تست‌های بیوشیمی سرمی و هیستوپاتولوژی جداسازی شدند. نمونه‌های کبد به بخش پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و نمونه خونی به آزمایشگاه بیمارستان فاطمه زهرا جهت بررسی آنزیم‌های ALT، AST، LDH منتقل شدند. برای بررسی هیستوپاتولوژیک و تعیین اثر L-آسپاراژیناز و انیسون بر روی بافت کبد، نمونه‌ها در فرمالین ۱۰٪ برای مدت ۲۴ ساعت تثبیت و پس از پردازش بافتی و غوطه‌ور شدن در پارافین با استفاده از پروتکل استاندارد، مقاطع با ضخامت ۵ μm با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ‌آمیزی شدند. سپس نمونه‌ها برای ارزیابی آسیب‌های کبدی با میکروسکوپ نوری و با استفاده از لنز ۴۰× توسط یک متخصص هیستولوژیست که نسبت به گروه‌های درمان بی‌اطلاع بود، مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای تجزیه و تحلیل کمی، فتومیکروگراف‌های بافتی با استفاده از سیستم امتیازدهی بررسی شدند. با توجه به میزان اتساع سینوزوئیدهای کبدی، ارتشاح سلول‌های التهابی، احتقان، دژنراسیون و واکنش‌ها شدن سیتوپلاسمی سلول‌های کبدی و تعداد سلول‌های کوپفر، امتیاز ۰ (طبیعی)، + (خفیف)، ++ (متوسط) و +++ (شدید) به نمونه‌ها داده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) نمایش داده شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون ANOVA برای تعیین تفاوت بین گروه کنترل و تیمار انجام شد. تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد که مقادیر $P < 0.05$ کم‌تر باشد.

نتایج

بازده عصاره‌گیری و میزان فنول و فلاونوئید تام عصاره اتانولی و آبی دانه گیاه انیسون
از میزان ۱ کیلوگرم دانه خشک گیاه، میزان ۷۰ گرم عصاره اتانولی و ۱۲۵ گرم عصاره آبی به دست آمد و بر این اساس مقدار بازده عصاره گیاه به ترتیب ۷ و ۱۲/۵٪ محاسبه گردید. فنول تام موجود در عصاره‌های الکلی و آبی دانه انیسون به ترتیب به میزان $30 \pm 0/7$ و $29/3 \pm 0/75$ میلی‌گرم گالیک اسید در یک گرم عصاره خشک و هم‌چنین میزان فلاونوئید تام عصاره‌های الکلی و آبی، به ترتیب $33/6 \pm 0/36$ و $15/1 \pm 48/38$ میلی‌گرم کوئرستین در یک گرم عصاره خشک

در مقایسه با عصاره آبی چشمگیرتر بوده و بیانگر کاهش سمیت کبدی ناشی از داروی شیمی درمانی می باشد. لازم به ذکر است که افزایش دوز عصاره از ۱۰۰ به ۲۰۰ mg/Kg تفاوت قابل توجهی از لحاظ آماری در نتایج به همراه نداشته است.

انیسون، افزایش جذب کبدی رادیودارو در موش های صحرايي که علاوه بر داروی L-آسپاراژیناز عصاره آبی و اتانولی انیسون را در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/Kg دریافت کردند در مقایسه با گروه L-آسپاراژیناز دیده شد که این افزایش در عصاره اتانولی

جدول ۱. درصد دوز جمعی ارگان های حیاتی به صورت ID (%)/gr در گروه های شاهد، گروه L-آسپاراژیناز (۱۰۰۰ IU/kg)، عصاره آبی (۱۰۰ mg/Kg)، عصاره الکلی (۱۰۰ mg/Kg)، عصاره آبی (۲۰۰ mg/Kg)، عصاره الکلی (۲۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز، عصاره الکلی (۲۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز، عصاره الکلی (۲۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز، عصاره الکلی (۲۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز در ۲۰ دقیقه پس از تزریق رادیودارو با استفاده از دستگاه گاما کانتر

ارگان ها	شاهد	آسپاراژیناز	انیسون آبی/۱۰۰	انیسون آبی/۲۰۰	انیسون اتانولی/۱۰۰	انیسون اتانولی/۲۰۰	انیسون آبی/۱۰۰ + آسپاراژیناز	انیسون آبی/۲۰۰ + آسپاراژیناز	انیسون اتانولی/۱۰۰ + آسپاراژیناز	انیسون اتانولی/۲۰۰ + آسپاراژیناز
خون	۰/۰۶±۰/۴۳	۰/۲±۰/۴۲	۰/۰۲±۰/۱۹	۰/۰۲±۰/۱۴	۰/۱۷±۰/۴	۰/۰۲±۰/۳	۰/۱±۰/۲۷	۰/۰۸±۰/۲۶	۰/۰۶±۰/۲۶	۰/۰۷±۰/۳۶
قلب	۰/۰۹±۰/۲۵	۰/۰۹±۰/۱۹	۰/۰۳±۰/۰۷	۰/۰۳±۰/۰۷	۰/۲±۰/۲۸	۰/۰۳±۰/۲۶	۰/۰۵±۰/۰۶	۰/۰۲±۰/۰۶	۰/۱۱±۰/۱۹	۰/۰۸±۰/۳۷
ریه	۰/۱±۰/۶۵	۰/۱±۰/۶۵	۰/۳۳±۰/۳۹	۰/۰۵±۰/۲	۰/۲۱±۰/۸۵	۰/۴۸±۱/۱۶	۰/۰۹±۰/۲۱	۰/۱۱±۰/۲۳	۰/۲۶±۰/۷۴	۰/۳۶±۰/۹۵
تیروئید	۰/۰۴±۰/۲	۰/۰۳±۰/۱۳	۰/۰۱±۰/۰۳	۰/۰۲±۰/۰۳	۰/۰۳±۰/۱۳	۰/۰۹±۰/۲۵	۰/۰۳±۰/۰۴	۰/۰۱±۰/۰۴	۰/۰۵±۰/۱۲	۰/۱۸±۰/۲۶
کبد	۲/۸۹±۳۱/۹۸	۲/۷۲±۹/۷۳	۱/۱۲±۴/۸	۱/۴۶±۱۴/۱۱	۱/۶۶±۱۹/۷۸	۱/۹۶±۲۱/۱۷	۱/۸۱±۱۲/۰۶	۲/۹±۱۵/۰۸	۱/۷۷±۲۰/۰۶	۰/۹۱±۲۲/۹۸
طحال	۱/۸±۱۳/۲۴	۳/۸۱±۳۱/۸۹	۲/۴۷±۹/۳	۰/۸۹±۱۱/۳۵	۱/۰۲±۲۴/۴۴	۲/۵۱±۲۶/۲۱	۲/۶۴±۱۰/۷۲	۱/۶±۱۲/۸۸	۳/۴۳±۲۰/۳۵	۱/۴۷±۱۹/۴۷
کلیه	۰/۳±۱/۳۵	۰/۱۲±۰/۳۷	۰/۰۵±۰/۱۳	۰/۱±۰/۱۳	۰/۰۸±۰/۲۳	۰/۰۵±۰/۲۴	۰/۰۲±۰/۱۲	۰/۰۱±۰/۱۷	۰/۰۵±۰/۲	۰/۰۷±۰/۲۸
معدده	۹/۰/۱±۰/۲۲	۰/۱۵±۱/۱۳	۰/۲۷±۰/۹۷	۰/۰۹±۰/۹۹	۰/۱۵±۱/۹۹	۰/۶۴±۲/۸۱	۰/۲۲±۱/۰۸	۰/۵۸±۱/۶۷	۰/۲۸±۱/۷۱	۰/۴۹±۲/۵۵
ماهیچه	۰/۱۷±۰/۲۶	۰/۱۷±۰/۴۵	۰/۱۳±۰/۲۸	۰/۰۲±۰/۱۶	۰/۱۳±۰/۳۸	۰/۲۷±۰/۶۱	۰/۱۱±۰/۱۹	۰/۱۲±۰/۱۳	۰/۲۲±۰/۴۸	۰/۰۴±۰/۴۲
استخوان	۰/۲۷±۰/۶۴	۰/۰۳±۰/۰۷	۰/۰۳±۰/۰۴	۰/۰۱±۰/۰۲	۰/۰۳±۰/۰۹	۰/۱۳±۰/۲	۰/۰۲±۰/۰۳	۰/۰۱±۰/۰۲	۰/۰۳±۰/۰۷	۰/۰۳±۰/۱

انیسون آبی/۱۰۰: مقدار ۱۰۰ mg/kg از عصاره آبی گیاه انیسون را به صورت گاوژ به مدت هفت روز متوالی انیسون آبی/۲۰۰: گروهی از رت ها که مقدار ۲۰۰ mg/kg عصاره آبی گیاه انیسون را دریافت کردند. انیسون اتانولی/۱۰۰: گروهی از رت ها که مقدار ۱۰۰ mg/kg عصاره اتانولی گیاه انیسون را دریافت کردند. انیسون اتانولی/۲۰۰: گروهی از رت ها که مقدار ۲۰۰ mg/kg عصاره اتانولی گیاه انیسون را به صورت گاوژ به مدت هفت روز متوالی انیسون آبی/۱۰۰ + L-آسپاراژیناز: گروهی از رت ها که عصاره آبی گیاه انیسون ۱۰۰ mg/Kg + داروی L-آسپاراژیناز ۱۰۰۰ IU/kg را دریافت کردند. انیسون آبی/۲۰۰ + L-آسپاراژیناز: گروهی از رت ها که عصاره آبی گیاه انیسون ۲۰۰ mg/Kg + داروی L-آسپاراژیناز ۱۰۰۰ IU/kg را دریافت کردند. انیسون اتانولی/۱۰۰ + L-آسپاراژیناز: گروهی از رت ها که عصاره اتانولی گیاه انیسون ۱۰۰ mg/Kg + داروی L-آسپاراژیناز ۱۰۰۰ IU/kg را دریافت کردند. انیسون اتانولی/۲۰۰ + L-آسپاراژیناز: گروهی از رت ها که عصاره اتانولی گیاه انیسون ۲۰۰ mg/Kg + داروی L-آسپاراژیناز ۱۰۰۰ IU/kg را دریافت کردند.

جدول ۲. مقایسه آماری گروه های دریافت کننده L-آسپاراژیناز، عصاره آبی و اتانولی دانه انیسون به تنهایی در مقایسه با گروه شاهد

گروه	کبد (%ID/gr)	P.value	طحال (%ID/gr)	P.value
شاهد	۲/۸۹±۳۱/۹۸		۱/۸±۱۳/۲۴	
L-آسپاراژیناز	*۲/۷۲±۹/۷۳	۰/۰۰۰۵	*۳/۸۱±۳۱/۸۹	۰/۰۰۲
انیسون آبی/۱۰۰	*۱/۱۲±۴/۸	۰/۰۰۰۴	۲/۴۷±۹/۳	۰/۰۸
انیسون آبی/۲۰۰	*۱/۴۶±۱۴/۱۱	۰/۰۰۰۷	۰/۸۹±۱۱/۳۵	۰/۱
انیسون اتانولی/۱۰۰	*۱/۶۶±۱۹/۷۸	۰/۰۰۳	*۱/۰۲±۲۴/۴۴	۰/۰۰۰۷
انیسون اتانولی/۲۰۰	*۱/۹۶±۲۱/۱۷	۰/۰۰۵	*۲/۵۱±۲۶/۲۱	۰/۰۰۰۷
انیسون آبی/۱۰۰ + L-آسپاراژیناز	*۱/۸۱±۱۲/۰۶	۰/۰۰۰۶	۲/۶۴±۱۰/۷۲	۰/۲
انیسون آبی/۲۰۰ + L-آسپاراژیناز	*۲/۹±۱۵/۰۸	۰/۰۰۲	۱/۶±۱۲/۸۸	۰/۰۸
انیسون اتانولی/۱۰۰ + L-آسپاراژیناز	*۱/۷۷±۲۰/۰۶	۰/۰۰۴	*۳/۴۳±۲۰/۳۵	۰/۰۳
انیسون اتانولی/۲۰۰ + L-آسپاراژیناز	*۰/۹۱±۲۲/۹۸	۰/۰۰۷	*۱/۴۷±۱۹/۴۷	۰/۰۰۹

*سطح معناداری ۰/۰۵ < P-value

جدول ۳. مقایسه آماری گروه های دریافت کننده "عصاره آبی و اتانولی دانه انیسون + L-آسپاراژیناز" در مقایسه با گروه دریافت کننده L-آسپاراژیناز

گروه	کبد (%ID/gr)	P.value	طحال (%ID/gr)	P.value
L-آسپاراژیناز	۲/۷۲±۹/۷۳		۳/۸۱±۳۱/۸۹	
انیسون آبی/۱۰۰ + L-آسپاراژیناز	۱/۸۱±۱۲/۰۶	۰/۱۵	**۲/۶۴±۱۰/۷۲	۰/۰۰۱
انیسون آبی/۲۰۰ + L-آسپاراژیناز	۲/۹±۱۵/۰۸	۰/۰۷	**۱/۶±۱۲/۸۸	۰/۰۰۱
انیسون اتانولی/۱۰۰ + L-آسپاراژیناز	**۱/۷۷±۲۰/۰۶	۰/۰۰۴	**۳/۴۳±۲۰/۳۵	۰/۰۱
انیسون اتانولی/۲۰۰ + L-آسپاراژیناز	**۰/۹۱±۲۲/۹۸	۰/۰۰۰۹	**۱/۴۷±۱۹/۴۷	۰/۰۰۶

**سطح معناداری P-value < ۰/۰۵

آنالیز هیستوپاتولوژیکی و بیولوژیکی:

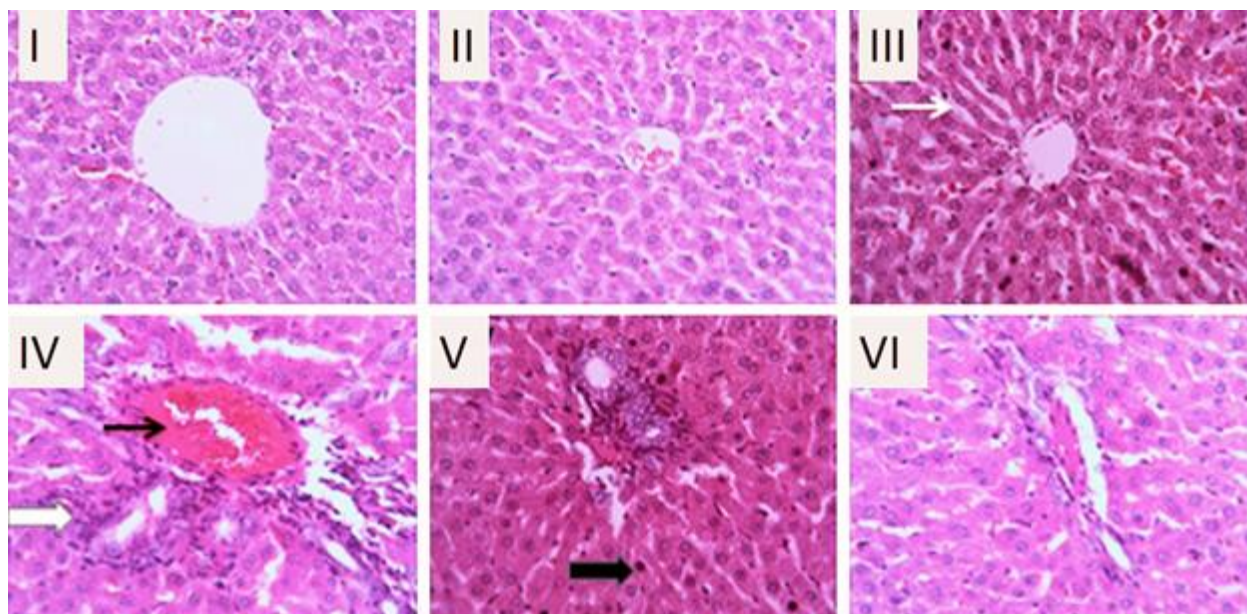
ایجاد اختلال در عملکرد کبد توسط L-آسپاراژیناز با مطالعات هیستوپاتولوژی کبد نیز تایید گردید. ساختار نرمال کبدی در گروه کنترل (شکل (VI)) و همچنین تا حدودی در گروه های دریافت کننده عصاره الکلی انیسون مشاهده گردید (VII,III). این در حالی است که در گروه دریافت کننده L-آسپاراژیناز آسیب شدیدی در ساختار بافتی کبد از قبیل از هم گسیختگی طناب های هیپاتوسیت ها، ادم، احتقان، هسته های پیکنوتیک، واکوئل شدن سیتوپلاسم، هایپرپرولیفراسیون سلول های کویفر، ارتشاح سلول های التهابی در اطراف مجاری صفراوی و در اطراف ناحیه پورتال شناسایی شد ((IV)). آنالیز هیستوپاتولوژی کبدی در رت هایی که داروی شیمی درمانی را به همراه عصاره انیسون دریافت کرده بودند بهبودی نسبی را نشان داده اند (VI, V). نتایج پاتولوژی در جدول ۴ بر اساس شدت آسیب در گروه های مختلف آورده شده است. در ارزیابی نیمه کمی دیده شد رت هایی که L-آسپاراژیناز دریافت کردند نمره بالاتری را نشان داده اند. و حیواناتی که عصاره انیسون را به همراه L-آسپاراژیناز دریافت کردند نمره پایین تری را نشان داده اند.

از سوی دیگر نتایج بیوشیمیایی سرمی جهت بررسی آنزیم های کبدی AST، ALT و LDH نشان داد که در گروه دریافت کننده L-آسپاراژیناز سطح خونی این آنزیم ها نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. مقادیر آنزیم های ALT، AST و LDH در گروه کنترل و L-آسپاراژیناز به ترتیب ۱±۵۵/۲۴، ۲۷±۱/۱۱ U/L، ۲۱۳±۵/۲ U/L و ۲±۷۲/۲۲، ۱±۵۱/۵۱ U/L و ۲۷۴±۶/۶۸ می باشد. در گروه های دریافت کننده از عصاره آبی

و اتانولی انیسون (۱۰۰ mg/kg) میانگین سطح آنزیم ها برابر ۱±۵۴/۱۳ و ۲۱۴±۵/۰۹ U/L، ۳۳±۱/۳۳، ۵۶±۲/۶۸، ۳۱±۱/۰۹ U/L، ۲۱۱±۵/۲ U/L بوده و با افزایش دوز نیز تغییرات قابل توجهی در مقایسه با گروه گروه کنترل مشاهده نشد. اما در گروه هایی که علاوه بر داروی شیمی درمانی L-آسپاراژیناز عصاره های آبی و الکلی انیسون را دریافت کردند کاهش مقادیر آنزیم های مذکور در مقایسه با گروه L-آسپاراژیناز در هر دو دوز مشاهده گردید. در گروه عصاره الکلی (۱۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز مقادیر سطح آنزیم های فوق به ترتیب برابر ۱±۳۵/۷۸، ۲±۵۸/۲۳، ۳۵±۱/۳۵، ۵۸±۲/۲۷ U/L، ۲۱۹±۵/۱ U/L و با افزایش دوز به ۲۰۰ mg/kg مقادیر سرمی به ترتیب به ۲±۵۸/۲۳، ۱±۳۵/۷۸، ۲۲۰±۵/۶۶ U/L کاهش یافت. اثرات مشابه در گروه های عصاره آبی (۱۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز و عصاره آبی (۲۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز مشاهده گردید (جدول ۵).

تصویربرداری با رادیو داروی ^{99m}Tc-Phytate:

نتایج حاصل از تصویربرداری با رادیو داروی کبدی هم راستا با نتایج حاصل از توزیع بیولوژیکی بوده و کاهش تجمع رادیو دارو در کبد در گروه دریافت کننده L-آسپاراژیناز در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید (شکل II). به طور مشابه در گروه هایی که علاوه بر داروی L-آسپاراژیناز عصاره الکلی و آبی انیسون را دریافت کرده بودند جذب کبد در مقایسه با گروه L-آسپاراژیناز تنها افزایش یافت (شکل V، VI، IX، X). تفاوت چشمگیری در جذب کبد و طحال بین گروه هایی که دوز ۲۰۰ mg/kg و ۱۰۰ از عصاره الکلی و آبی انیسون دریافت کرده بودند مشاهده نشد.



شکل ۱. تصاویر هیستوپاتولوژیکی اثر L-آسپاراژیناز و عصاره های آبی و الکلی انیسون را بر روی کبد در تمام گروه ها نشان می دهد. گروههای شاهد (I)، عصاره اتانولی (۱۰۰ mg/Kg) (II)، عصاره اتانولی (۲۰۰ mg/Kg) (III)، گروه L-آسپاراژیناز (IV)، عصاره اتانولی (۱۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز (IU/kg) (۱۰۰۰) (V)، عصاره اتانولی (۲۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز (۱۰۰۰ IU/kg) (VI)، پیکان سفید باریک: اتساع سینوزوئیدها، پیکان مشکی باریک: احتقان عروق، پیکان مشکی ضخیم: سلول کوپفر و پیکان سفید ضخیم تکثیر سلول های التهابی را نشان می دهد. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین و با بزرگنمایی ۴۰ را نشان می دهد.

جدول ۴: میزان شدت آسیب در مطالعات هیستوپاتولوژی کبد در گروه های مختلف

یافته های هیستوپاتولوژی	A	B	C	D	E	F
Disorganization	-	-	-	++	++	+
Necrosis	-	-	-	++	++	+
Picknetic	-	-	-	++	++	+
Cytoplasmic vaculization	-	-	-	++	++	+
Copfer hyperprolifratiion	-	-	+	+++	+++	++
Periportal Infiltration	-	-	+	+++	+++	++

جدول ۵. مقادیر عددی مربوط به سطوح آنزیم های ALT، AST، LDH در خون رت های تیمار شده با عصاره آبی و اتانولی دانه انیسون. نتایج عددی بصورت میانگین داده ها \pm انحراف استاندارد گزارش و برای بررسی تفاوت آماری بین گروه شاهد و سایر گروه ها از آزمون ANOVA استفاده و $p < 0.05$ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

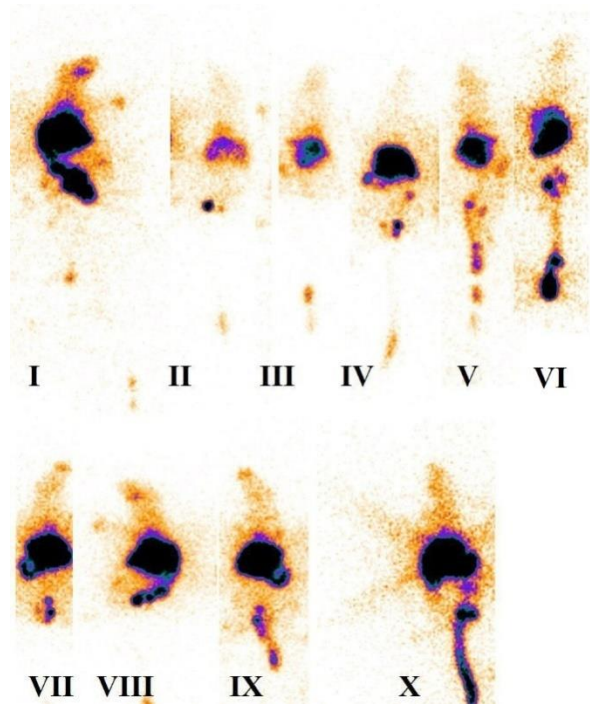
LDH	ALT	AST	گروه ها
۵±۲۱۳/۲	۱±۲۷/۱۱	۱±۵۵/۲۴	شاهد
*۶±۲۷۴/۶۸	*۱±۵۱/۵۱	*۲±۷۲/۲۲	L-آسپاراژیناز
۵±۲۱۴/۰۹	۱±۳۳/۳۳	۲±۵۶/۶۸	عصاره آبی (۱۰۰ mg/Kg)
۴±۲۱۴/۰۲	۱±۳۳/۱۸	۲±۵۷/۴۳	عصاره آبی (۲۰۰ mg/Kg)
۵±۲۱۱/۲	۱±۳۱/۰۹	۱±۵۴/۱۳	عصاره الکلی (۱۰۰ mg/Kg)
۴±۲۱۲/۵	۱±۳۲/۱۲	۱±۵۵/۱۲	عصاره الکلی (۲۰۰ mg/Kg)
**۶±۲۱۹/۱	**۱±۳۸/۳۵	**۲±۵۸/۲۷	عصاره آبی (۱۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز
**۵±۲۲۸/۱۴	**۱±۳۷/۱۱	**۲±۶۲/۷۷	عصاره آبی (۲۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز
**۵±۲۱۹/۱	**۱±۳۵/۳۵	**۲±۵۸/۲۷	عصاره الکلی (۱۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز
**۵±۲۲۰/۶۶	**۱±۳۵/۷۸	**۲±۵۸/۲۳	عصاره الکلی (۲۰۰ mg/Kg) + L-آسپاراژیناز

*سطح معناداری $P < 0.05$ نسبت به گروه کنترل، **سطح معناداری $P < 0.05$ نسبت به گروه کنترل L-آسپاراژیناز

سمیت کبدی L-آسپاراژیناز مشخص نبوده و به کاهش سنتز پروتئین‌ها و استئاتوز شدید کبدی نسبت داده می‌شود [۱۰]. غلظت‌های روتین جهت درمان لوسمی ۲۰۰۰-۵۰ IU/Kg/day بوده که استفاده از دزهای بالای آن علائم واضحی از سمیت کبدی را به ویژه در بالغین با سابقه بیماری‌های کبدی به همراه دارد که از طریق افزایش سطوح سرمی آنزیم‌هایی مانند آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپاراتات ترانسفراز (AST) و افزایش ترکیبات لیپیدی و استئاتوز مشخص می‌گردد. آنالیز داده‌های هیستوپاتولوژی برای بررسی میزان آسیب کبدی ناشی از داروی L-آسپاراژیناز، حضور واکوئل‌ها، نکروز هپاتوسلولار و عکس‌العمل سلول‌های کوپفر را نشان می‌دهد [۲۱-۲۵].

انیسون از جمله گیاهان دارویی متعلق به خانواده چتریان می‌باشد که از زمان‌های قدیم مورد استفاده بوده است. دانه انیسون به دلیل استفاده به عنوان ماده معطر در صنایع غذایی و عطرسازی، ارزش اقتصادی بالایی دارد، از این رو گیاه انیسون در بسیاری از نقاط جهان از جمله مناطقی از آسیا، اروپا، شمال آفریقا و غیره کاشته می‌شود. از کاربردهای سنتی دانه انیسون می‌توان به ضد نفخ، ضد اسپاسم، ضد عفونی‌کننده و موارد دیگر اشاره کرد [۱۱، ۱۰]. همان‌طوری‌که در مقدمه ذکر شد، در مقالات متعددی به اثرات آنتی‌اکسیدانتی قابل توجه اسانس و عصاره‌های مختلف دانه انیسون اشاره شده است که بر همین اساس، این گیاه برای مطالعه انتخاب گردید. از جمله ترکیبات شیمیایی مهمی که از دانه گیاه انیسون گزارش شده است، می‌توان به ترکیبات فرار از جمله آنتول و ترکیبات فنولیک شامل فنولیک اسیدها (کلروژنیک اسید، رزمارینیک اسید)، فلاونوئیدها (نارینجین، آپی‌ژنین، کوئرستین) و همچنین کومارین‌ها اشاره کرد [۲۶].

در مطالعه حاضر، میزان فنول و فلاونوئید تام موجود در عصاره‌های الکلی و آبی دانه گیاه انیسون مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق نتایج حاصل از تست‌های تعیین مقدار، هر دو عصاره حاوی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بودند به طوری‌که میزان این ترکیبات در عصاره الکلی بیش‌تر از عصاره آبی بود. حضور آنتول در عصاره اتانولی نیز بر اساس کتاب واگنر [۲۷] با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) ردیابی و تأیید شد. در مطالعه Martins و همکاران که در سال ۲۰۱۶ بر روی پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی عصاره هیدروالکلی (متانول ۸۰٪) دانه گیاه انیسون و گشنیز منتشر شد، عصاره انیسون دارای اثر آنتی‌اکسیدانتی قابل توجه و بیش‌تری از دانه گشنیز بوده است. هم‌چنین میزان فلاونوئید و فنولیک اسید موجود در عصاره به ترتیب با مقادیر $28/08 \pm 0/17$ و $14/01 \pm 0/06$ میلی‌گرم بر گرم عصاره گزارش گردید [۲۸]. در سال ۲۰۰۸ ثوری و



شکل ۲. تصاویر تهیه شده از رت‌های گروه شاهد (I)، گروه دریافت‌کننده L-آسپاراژیناز (۱۰۰۰ IU/kg) به تنهایی (II)، گروه‌های دریافت‌کننده عصاره آبی (III) و الکلی (IV) گیاه انیسون (۱۰۰ mg/Kg) به تنهایی، گروه دریافت‌کننده L-آسپاراژیناز به همراه عصاره آبی (V) و الکلی (VI) گیاه انیسون (۱۰۰ mg/Kg)، گروه دریافت‌کننده عصاره آبی (VII) و الکلی (VIII) گیاه انیسون (۲۰۰ mg/Kg) به تنهایی و گروه دریافت‌کننده L-آسپاراژیناز به همراه عصاره آبی (IX) و الکلی (X) گیاه انیسون (۲۰۰ mg/Kg)

بحث و نتیجه‌گیری

کبد ارگان اصلی متابولیسم زنوبیوتیک‌ها و بسیاری از داروهای شیمی‌درمانی بوده و آسیب‌های وارده به این ارگان عوارض جدی در پی خواهد داشت. آسیب کبدی به عنوان یک مشکل حاد پزشکی مطرح و استفاده از ترکیبات محافظت‌کننده کبدی به عنوان یک موضوع چالش‌برانگیز مورد توجه بسیاری از محققین می‌باشد. تلاش به منظور یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به صورت تصاعدی در حال افزایش بوده و نامزدهای اصلی در این فرآیند گیاهان دارویی می‌باشند. بنابراین رژیم درمانی ترکیبی با استفاده از ترکیبات طبیعی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌موتازنیک دارند ممکن است در حفاظت از بافت‌ها و سلول‌های نرمال در برابر آسیب ناشی از داروهای شیمی‌درمانی و ترکیبات زنوبیوتیک نقش مؤثری داشته باشد. آنزیم L-آسپاراژیناز باکتریایی یکی از ترکیبات ضروری و موثر در شیمی‌درمانی ترکیبی برای درمان لوسمی لنفوئیدی حاد در کودکان و بسیاری از بالغین می‌باشد که علاوه بر واکنش‌های حساسیتی و پانکراتیت لخته شدن خون، اختلالات گوارشی، نفروپاتی و سمیت کبدی را نیز سبب می‌شود. مکانیسم دقیق

نشان‌دهنده آسیب کبدی داروی L-آسپاراژیناز بوده و منجر به شیفت تجمع رادیو دارو به سمت طحال گردیده است. از سوی دیگر در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره دانه انیسون به ویژه عصاره اتانولی به همراه L-آسپاراژیناز افزایش قابل توجه جذب کبدی رادیو دارو در مقایسه با گروه L-آسپاراژیناز به تنهایی نشان‌دهنده اثرات محافظت کبدی عصاره می‌باشد. لازم به ذکر است افزایش جذب رادیو دارو در کبد در گروه‌هایی که علاوه به L-آسپاراژیناز عصاره آبی انیسون را دریافت کردند در مقایسه با گروه دریافت‌کننده L-آسپاراژیناز مشاهده گردید اما از لحاظ آماری معنادار نبود. ضمن این‌که کاهش قابل توجه جذب کبدی رادیو دارو در گروه‌هایی که عصاره آبی را به تنهایی دریافت کردند در مقایسه با گروه شاهد و گروه عصاره اتانولی، نشان از سمیت کبدی ایجاد شده توسط عصاره آبی دارد. نتایج به‌دست آمده از تصویربرداری به منظور تعیین توزیع رادیو دارو تاییدکننده نتایج حاصل از توزیع بیولوژیکی بوده است. جذب اندک کبد در گروه دریافت‌کننده L-آسپاراژیناز را نسبت به گروه کنترل نشان‌دهنده سمیت کبدی بوده و افزایش جذب در گروه‌هایی که عصاره‌های الکلی و آبی را علاوه بر L-آسپاراژیناز دریافت کردند نسبت به گروه L-آسپاراژیناز تنها نشان‌دهنده کاهش سمیت و اثر محافظتی عصاره انیسون می‌باشد.

در سال ۲۰۱۲ اثرات محافظتی L-کارنیتین بر سمیت کبدی ناشی از داروی شیمی‌درمانی L-آسپاراژیناز مورد ارزیابی قرار گرفت. این ترکیب مشابه ویتامین طبیعی بوده که از لیزین سنتز می‌شود و به عنوان حامل اسید چرب به میتوکندری عمل کرده و برای اکسیداسیون اسیدهای چرب ضروری است. L-کارنیتین می‌تواند آسیب کبدی را در رت‌های مبتلا به کبد چرب غیر الکلی کاهش دهد. هم‌چنین کاهش فشار ورید پورتال و مصرف اکسیژن را سبب شده و در نتیجه آسیب پارانشیمال و میتوکندریایی کبد‌های چرب را کاهش می‌دهد. از سویی این ترکیب به عنوان مهارکننده رادیکال آزاد بوده و میتوکندری را در مدل‌های حیوانی هیپاتوکارسینوزنیز محافظت می‌کند. هم‌چنین مطالعه نشان داد که سطح آنزیم AST و هم‌چنین LDH و GST که بر اثر آسیب پارانشیمال و GLDH که در آسیب هیپاتوسلولار در سطح میتوکندریایی افزایش می‌یابند کاهش یافته است [۲۱].

در مطالعه حاضر بررسی‌های هیستوپاتوزیکی و آنزیم‌های کبدی AST، ALT و LDH نشان داد که L-آسپاراژیناز سبب ایجاد آسیب کبدی قابل توجهی شده و افزایش سطوح بیومارکرهای فوق را سبب می‌شود. در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره آبی و اتانولی سطوح آنزیم‌ها تقریباً مشابه گروه کنترل

همکارانش در ایران به بررسی اثر آنتی‌اکسیدانتی و محتوی ترکیبات فنولیک عصاره متانولی ۲۴ گیاه دارویی پرداختند که در میان آن‌ها عصاره دانه انیسون از لحاظ محتوی فنولیک در ردیف ششم با میزان $353/92 \pm 1/64$ میلی‌گرم گالیک اسید بر ۱۰۰ گرم گیاه خشک قرار گرفت [۲۹]. در مطالعه‌ای که توسط مارکوس و همکارانش در سال ۲۰۰۹ انجام شد وجود کلروژنیک اسید و ترکیبات وابسته به آن در چند گیاه دارویی مورد بررسی قرار گرفت. حضور این دسته ترکیبات هم در عصاره متانولی ۴۰٪ و هم در دم‌کرده حاصل از دانه گیاه انیسون مشاهده گردید [۳۰]. کلروژنیک اسید یک ترکیب فنولیک شناخته شده می‌باشد که در مطالعات متعددی اثرات آنتی‌اکسیدانتی و ضد التهابی آن به اثبات رسیده است. در یک مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۹، این ترکیب در برابر صدمات کبدی مزمن ناشی از لیپوپلی ساکارید در رت اثر محافظتی نشان داد، به طوری‌که پیشنهاد شد که مصرف این ترکیب به صورت رژیم غذایی می‌تواند در برابر سمیت کبدی ناشی از اندوتوکسین و میکروب‌های مضر اثر محافظتی قابل توجهی ایجاد کند [۳۱]. در مطالعه دیگری نیز، اثر محافظتی کلروژنیک اسید بر روی سمیت کبدی حاد ایجاد شده توسط تتراکلرید کربن در رت گزارش شد که اثر مشاهده شده را به خصوصیات آنتی‌اکسیدانتی و به دام‌اندازی رادیکال آزاد این ترکیب نسبت دادند [۳۲].

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ به چاپ رسید، اسانس دانه انیسون اثر آنتی‌اکسیدانتی و به دام‌اندازی رادیکال قابل توجهی در مقایسه با آنتی‌اکسیدانت‌های سنتزی شامل BHT و BHA نشان داد که عمده‌ترین ترکیب اسانس، ترانس آنتول به میزان ۹۰٪/۱ شناسایی شد [۱۵]. در سال ۲۰۱۵ اثرات محافظتی اسانس و عصاره‌های هگزانی و هیدروالکلی دانه انیسون بر روی سمیت کبدی ناشی از تتراکلرید کربن به صورت درون‌تنی و برون‌تنی به‌وسیله‌ی تیم تحقیقاتی جمشیدزاده در دانشگاه شیراز مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، فقط عصاره هگزانی به میزان قابل توجهی اثر محافظت کبدی نشان داد [۳۳].

در مطالعه حاضر که اثر محافظتی عصاره اتانولی و آبی دانه گیاه انیسون در آسیب کبدی ناشی از داروی شیمی‌درمانی L-آسپاراژیناز با استفاده از رادیو داروی کبدی ^{99m}Tc -Phytate در رت‌ها انجام گرفت نتایج حاصل نشان داد مصرف L-آسپاراژیناز به تنهایی باعث سمیت شدید کبدی نسبت به گروه انیسون به ویژه عصاره اتانولی را دریافت کردند در هر دو دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg سمیت کبدی کم‌تری نسبت به گروه L-آسپاراژیناز از خود نشان دادند. کاهش قابل توجه جذب رادیو دارو در کبد در گروه L-آسپاراژیناز در مقایسه با گروه شاهد

هپاتوتوکسیک نشان داد [۴۰] پیرولیزیدین آلکالوئیدها در تعدادی از خانواده‌های گیاهی وجود دارند و به جهت سمیت کبدی، ترکیبات شناخته شده‌ای هستند. این ترکیبات در گیاهان عمدتاً به فرم N-اکسید وجود دارند که حلالیت در آب بالایی دارند [۴۱] و به راحتی وارد خاک می‌شوند و می‌توانند سایر منابع شامل آب و گیاهان دیگر را آلوده کنند [۴۲]. فرم N-اکسید این دسته از آلکالوئیدها نسبت به فرم آزاد سمیت کم‌تری دارد ولی وقتی وارد بدن انسان و جوندگان می‌شود، تبدیل به فرم سمی می‌شود و سمیت کبدی ایجاد می‌کند [۴۳]. بنابراین مشاهده سمیت کبدی از عصاره‌های دانه انیسون در این مطالعه، ممکن است ناشی از آلودگی به فرم N-اکسید پیرولیزیدین آلکالوئیدها باشد که این ترکیبات به راحتی در آب حل می‌شوند و در حلالی مانند اتانول به مقدار کمی وارد می‌شوند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش موضوع پایان‌نامه میثم صحرانورد به عنوان دانشجوی دکتری حرفه‌ای داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران (ساری، ایران) با شماره گرنت ۲۲۵۲ بوده است.

مشارکت و نقش نویسندگان

زهره نوع‌پرست: ایده و طراحی مطالعه، انجام مطالعات حیوانی، آنالیز و تفسیر نتایج، نگارش مقاله، سمیه شاهانی: طراحی مطالعه بر روی نمونه گیاهی، آنالیز و تفسیر نتایج، نگارش مقاله، فرشته طالب‌پور امیری: انجام مطالعات هیستوپاتولوژیکی و تفسیر نتایج، سید محمد عابدی: انجام مطالعات تصویربرداری و تفسیر نتایج، میثم صحرانورد: جمع‌آوری داده‌ها. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

منابع

- [1] Inaba H, Greaves M, Mullighan ChG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2013; 381: 1943-1955. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62187-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62187-4)
- [2] Jabbour E, Thomas D, Cortes J, Kantarjian HM, O'Brien S. Central nervous system prophylaxis in adults with acute lymphoblastic leukemia: current and emerging therapies. *Cancer* 2010; 116: 2290-2300. <https://doi.org/10.1002/cncr.25008> PMID:20209620
- [3] Kondrat'eva NA, Kruglova GV, Lorie Iul, Koshel IV, Kurmashov VI. [L-asparaginase study results (phase II of the clinical trials)]. *Antibiotiki* 1980; 25: 686-689.
- [4] King PD, Perry MC. Hepatotoxicity of chemotherapy. *Oncologist* 2001; 6: 162-176. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.6-2-162> PMID:11306728
- [5] Thatishetty AV, Agresti N, O'Brien ChB. Chemotherapy-Induced Hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* 2013; 17: 671-686. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2013.07.010> PMID:24099024

بوده که می‌تواند به علت حساسیت اندک روش‌های بیوشیمیایی نسبت به روش‌های هسته‌ای باشد. تجویز دوز بالاتر از ۲۰۰ mg/kg از عصاره‌های آبی و اتانولی انیسون نیز تغییر محسوسی در سطوح آنزیم‌ها ایجاد نکردند. اما در گروه‌هایی که علاوه بر داروی شیمی‌درمانی L-آسپاراژیناز عصاره‌های آبی و الکی انیسون را دریافت می‌کردند کاهش مقادیر آنزیم‌های مذکور در مقایسه با گروه L-آسپاراژیناز نشان‌دهنده اثرات محافظتی عصاره می‌باشد. لازم به ذکر است عصاره الکی سبب کاهش سمیت بیش‌تری نسبت به عصاره آبی شده است.

از سویی طبق نتایج به دست آمده، عصاره‌های مورد مطالعه تا حدی اثرات سمیت کبدی نشان دادند که این سمیت، بیش‌تر در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره آبی مشاهده گردید. با توجه به ترکیباتی که از دانه انیسون گزارش شده است، چندین احتمال را می‌توان در نظر گرفت. نکته‌ای که در ابتدا می‌بایست به آن اشاره شود، این است که بررسی مقالات نشان می‌دهد که جنس ماده نسبت به جنس نر، بیش‌تر دچار سمیت کبدی می‌شود [۳۴] و با توجه به این‌که در مطالعه حاضر تمامی موش‌ها ماده بودند نتایج تاییدکننده ادعای فوق می‌باشد. همچنین ترکیب آنتول که جزء اصلی اسانس دانه انیسون را تشکیل می‌دهد، حلالیت خوبی در اتانول دارد و با توجه به این‌که این ترکیب اثر استروژنی دارد و سمیت کبدی از استروژن‌ها گزارش شده است، ممکن است این ترکیب تا حدی در بروز سمیت مشاهده شده از عصاره الکی دخیل باشد [۳۵،۳۶]. اثر سمیت کبدی از ترکیب استراگول که جزء دیگری از ترکیبات موجود در دانه انیسون می‌باشد، نیز گزارش شده است. به طوری‌که در یک مطالعه، تزریق داخل صفاقی استراگول در موش ماده باعث بروز صدمات شدید در کبد گردید، در حالی‌که این اثرات سمی در موش نر مشاهده نشد [۳۷]. کومارین‌ها نیز در دانه انیسون شناسایی شدند که اثرات سمی از این دسته از ترکیبات نیز گزارش شده است [۳۸]. در خصوص سمیت کبدی مشاهده شده از عصاره آبی، ممکن است ترکیبات تاننی وارد شده در عصاره آبی در بروز این اثر دخالت داشته باشند [۳۹] ولی با توجه به این‌که، تصور نمی‌شود که ترکیبات گزارش شده از دانه انیسون، با در نظر گرفتن مقداری که در عصاره آبی وارد می‌شوند، سبب بروز این میزان از سمیت کبدی بشوند، لذا احتمال دارد دانه انیسون مورد مطالعه با ترکیبات سمی دیگری آلوده شده باشد. بر اساس مطالعه‌ای که در کشور آلمان بر روی تعداد زیادی از فراورده‌های گیاهی موجود در بازار این کشور انجام شده است، مشخص شد که تعدادی از نمونه‌های مورد مطالعه، آلودگی قابل توجهی به پیرولیزیدین آلکالوئیدها دارند که در میان داروهای گیاهی، انیسون، بیش‌ترین آلودگی را به این دسته از ترکیبات

- [20] Da Silva MC, Paiva SR. Antioxidant activity and flavonoid content of *Clusia fluminensis* Planch. & Triana. *An Acad Bras Cienc* 2012; 84: 609-616.
<https://doi.org/10.1590/S0001-37652012000300004>
PMid:22886157
- [21] Roesmann A, Afify M, Panse J, Eisert A, Steitz J, Tolba RH. L-carnitine ameliorates L-asparaginase-induced acute liver toxicity in steatotic rat livers. *Chemotherapy* 2013; 59: 167-175.
<https://doi.org/10.1159/000353402>
PMid:24192517
- [22] Celle G, Dodero M, Pannacciulli I. The liver damaging effect of L-asparaginase-An experimental study of chronic toxicity. *Eur J Cancer* 1973; 9: 55-57.
[https://doi.org/10.1016/0014-2964\(73\)90043-1](https://doi.org/10.1016/0014-2964(73)90043-1)
- [23] Sahoo S, Hart J. Histopathological features of L-asparaginase-induced liver disease. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 295-300.
<https://doi.org/10.1055/s-2003-42647>
PMid:14523682
- [24] Haskell C, Canellos GP, Leventhal BG, Carbone PP, Serpick AA, Hansen HH. L-asparaginase toxicity. *Cancer Res* 1969; 29: 974-975.
- [25] Roudsarabi E, Kazemi Nourini S, Faridnouri H, Vaezi Kakhki MR. Effects of methanolic extracts of *Epilobium parviflorum* on growth and function of human liver cells HepG2. *Koomesh* 2021, 23: 801-812. (Persian).
- [26] Rebey IB, Wannas WA, Kaab SB, Bourgou S, Tounsi MS, Ksouri R, Fauconnier ML. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Pimpinella anisum* L. accessions at different ripening stages. *Scient Horticult* 2019; 246: 453-461.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.016>
- [27] Wagner H, Bladt S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2nd Edition, Springer Science & Business Media. 1996.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-00574-9>
- [28] Martins N, Barros L, Santos-Buelga C, Ferreira IC. Antioxidant potential of two Apiaceae plant extracts: A comparative study focused on the phenolic composition. *Indust Crops Product* 2016; 79: 188-194.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.018>
- [29] Souri E, Amin G, Farsam H. Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. *DARU J Pharm Sci* 2008; 16: 83-87.
- [30] Marques V, Farah A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chem* 2009; 113: 1370-1376.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.086>
- [31] Chen Z, Yang Y, Mi S, Fan Q, Sun X, Deng B, et al. Hepatoprotective effect of chlorogenic acid against chronic liver injury in inflammatory rats. *J Funct Food* 2019; 62: 103540.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103540>
- [32] Sun ZX, Liu S, Zhao ZQ, Su RQ. Protective effect of chlorogenic acid against carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Chin Herbal Med* 2014; 6: 36-41.
[https://doi.org/10.1016/S1674-6384\(14\)60004-6](https://doi.org/10.1016/S1674-6384(14)60004-6)
- [33] Jamshidzadeh A, Heidari R, Razmjou M, Karimi F, Moein MR, Farshad O, et al. An in vivo and in vitro investigation on hepatoprotective effects of *Pimpinella anisum* seed essential oil and extracts against carbon tetrachloride-induced toxicity. *Iran J Basic Med Sci* 2015; 18: 205-211.
- [34] Mennecozzi M, Landesmann B, Palosaari T, Harris G, Whelan M. Sex differences in liver toxicity-do female and male human primary hepatocytes react differently to toxicants in vitro. *PLoS One* 2015; 10: e0122786.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122786>
PMid:25849576 PMCID:PMC4388670
- [35] Koriem KM. Approach to pharmacological and clinical applications of *Anisi aetheroleum*. *Asian Pac J Tropical Biomed* 2015; 5: 60-67.
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30172-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30172-6)
- [36] Radzikowska E, Luszczewska-Sierakowska I, Madej B, Burdan F, Mandziuk S, Sokoluk M, et al. Estrogen-induced hepatotoxicity in rats. *J Pre-Clin Clin Res* 2012; 6: 10-13.
- [6] Kapoor S. Ursodeoxycholic acid and its emerging role in attenuation of tumor growth in gastrointestinal malignancies. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2012; 3: 277-278.
<https://doi.org/10.1007/s13539-012-0091-5>
PMid:23150116 PMCID:PMC3505581
- [7] Adesanoye OA, Farombi EO. Hepatoprotective effects of *Vernonia amygdalina* (astereaceae) in rats treated with carbon tetrachloride. *Exp Toxicol Pathol* 2010; 62: 197-206.
<https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.05.008>
PMid:19581077
- [8] Shehab NG, Abu-Gharbieh E, Bayoumi FA. Impact of phenolic composition on hepatoprotective and antioxidant effects of four desert medicinal plants. *BMC Complement Altern Med* 2015; 15: 401-413.
<https://doi.org/10.1186/s12906-015-0919-6>
PMid:26552870 PMCID:PMC4640355
- [9] Taslidere E, Dogan, Z, Elbe H, Vardi N, Cetin A, Turkoz Y. Quercetin protection against ciprofloxacin induced liver damage in rats. *Biotech Histochem* 2015; 91: 116-121.
<https://doi.org/10.3109/10520295.2015.1085093>
PMid:26529398
- [10] Pourgholami MH, Majzoob S, Javadi M, Kamalinejad M, Fanaee GH, Sayyah M. The fruit essential oil of *Pimpinella anisum* exerts anticonvulsant effects in mice. *J Ethnopharmacol* 1999; 66: 211-215.
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00161-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00161-5)
- [11] Tabanca N, Ma G, Pasco DS, Bedir E, Kirimer N, Baser KHC, et al. Effect of essential oils and isolated compounds from *Pimpinella* species on NF-kappaB: a target for antiinflammatory therapy. *Phytother Res* 2007; 21: 741-745.
<https://doi.org/10.1002/ptr.2154>
PMid:17450505
- [12] Gülçin I, Oktay M, Kireççi E, Küfrevioğlu ÖI. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem* 2003; 83: 371-382.
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00098-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00098-0)
- [13] Al-Ismael Kh, Aburjai T. Antioxidant activity of water and alcohol extracts of chamomile flowers, anise seeds and dill seeds. *J Sci Food Agricul* 2004; 84: 173-178.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.1625>
- [14] Tirapelli CR, de Andrade CR, Cassano AO, De Souza FA, Ambrosio SR, da Costa FB, de Oliveira AM. Antispasmodic and relaxant effects of the hidroalcoholic extract of *Pimpinella anisum* (Apiaceae) on rat anococcygeus smooth muscle. *J Ethnopharmacology* 2007; 110: 23-29.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.031>
PMid:17027208
- [15] Singh G, Kapoor IPS, Singh P, de Heluani CS, Catalan CA. Chemical composition and antioxidant potential of essential oil and oleoresins from anise seeds (*Pimpinella anisum* L.). *Int J Essent Oil Therap* 2008; 2: 122-130.
<http://hdl.handle.net/11336/61242>.
- [16] Abdelaaty AS, Ibrahem AY, Hendawy SF, Omer EA, Hammouda FM, Abdel-Rahman FH, Saleh MA. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules* 2011; 16: 1366-1377.
<https://doi.org/10.3390/molecules16021366>
PMid:21285921 PMCID:PMC6259638
- [17] El-Sayed MG, Elkomy A., Samer S, Elbanna AH. Hepatoprotective effect of *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* against Carbon Tetra Chloride Induced Fibrosis in Rats. *World J Pharm Pharm Sci* 2015; 4: 78-88.
- [18] Kikuchi M, Tomita K, Nakahara T, Kitamura N, Teratani T, Irie R, et al. Utility of quantitative 99mTc-phytate scintigraphy to diagnose early-stage non-alcoholic steatohepatitis. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44: 229-236.
<https://doi.org/10.1080/00365520802433249>
PMid:18819037
- [19] Miliauskas G, Venskutonis RP, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem* 2004; 85: 231-237.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.05.007>

- [41] Schramm S, Köhler N, Rozhon W. Pyrrolizidine alkaloids: biosynthesis, biological activities and occurrence in crop plants. *Molecules* 2019; 24: 498.
<https://doi.org/10.3390/molecules24030498>
PMid:30704105 PMCID:PMC6385001
- [42] Kisielius V, Hama JR, Skrbic N, Hansen HC, Strobel BW, Rasmussen LH. The invasive butterbur contaminates stream and seepage water in groundwater wells with toxic pyrrolizidine alkaloids. *Sci Rep* 2020; 10: 1-10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-76586-1>
PMid:33188248 PMCID:PMC7666219
- [43] Yang M, Ma J, Ruan J, Ye Y, Fu PP, Lin G. Intestinal and hepatic biotransformation of pyrrolizidine alkaloid N-oxides to toxic pyrrolizidine alkaloids. *Arch Toxicol* 2019; 93: 2197-2209.
<https://doi.org/10.1007/s00204-019-02499-2>
PMid:31222523
- [37] Vasil'ev ED, Il'nitskaia SI, Nikitenko EV, Kaledin VI. Age- and sex-related differences in sensitivity to hepatotoxic action of estragole in mice. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* 2005; 91: 1066-1070.
- [38] Wang X, Lou YJ, Wang MX, Shi YW, Xu HX, Kong LD. Furocoumarins affect hepatic cytochrome P450 and renal organic ion transporters in mice. *Toxicol Lett* 2012; 209: 67-77.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.030>
PMid:22173200
- [39] Oler A, Neal MW, Mitchell EK. Tannic acid: acute hepatotoxicity following administration by feeding tube. *Food Cosmetic Toxicol* 1976; 14: 565-569.
[https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(76\)80010-7](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(76)80010-7)
- [40] Bodí D, Ronczka S, Gottschalk C, Behr N, Skibba A, Wagner M, et al. These A. Determination of pyrrolizidine alkaloids in tea, herbal drugs and honey. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2014; 31: 1886-1895.
<https://doi.org/10.1080/19440049.2014.964337>
PMid:25222912

Beneficial effects of *Pimpinella anisum* L. ethanol and aqueous extracts on L-asparaginase-associated hepatotoxicity using specific ^{99m}Tc -Phytate biodistribution studies in rats

Somayeh Shahani (Ph.D)¹, Meysam Sahranavard (Pharm.D)², Fereshteh Talebpour Amiri (Ph.D)³, Seyed Mohammad Abedi (Nuclear Medicine Specialist)⁴, Zohreh Noaparast (Ph.D)^{*2}

1 – Dept. of Pharmacognosy and Biotechnology, Medicinal Plants Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

2 – Dept. of Radiopharmacy, Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

3- Dept. of Anatomy, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

4- Dept. of Radiology, Cardiovascular Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

* Corresponding author. +98 11- 33542472

noaparast@yahoo.com

Received: 20 Nov 2021 ; Accepted: 5 Feb 2022

Introduction: The present study aimed to investigate the protective effects of *Pimpinella anisum* L. ethanolic and aqueous extracts on L-asparaginase-associated hepatotoxicity in rats using histopathological and specific ^{99m}Tc -Phytate biodistribution studies.

Materials and Methods: 60 female rats were divided into 9 treatment groups including L-asparaginase group, Aqueous extract (100 and 200 mg/kg), Ethanolic extract (100 and 200 mg/kg), Aqueous extract (100 mg/kg) + L-asparaginase, Aqueous extract (200 mg/kg) + L-asparaginase, Ethanolic extract (100-100 mg/kg) + L-asparaginase, and Ethanolic extract (200 mg/kg) + L-asparaginase and one control group. L-asparaginase was intraperitoneally injected at a dose of 1000 IU/Kg every other day for a week. Aqueous and ethanolic extracts of *P. anisum* were given by gavage technique for seven consecutive days. 24h after the last day of treatment, ^{99m}Tc -phytate was intravenously injected and then, rats were killed with a lethal dose of ketamine/xylazine. Vital organs were removed, weighed, and their activity was counted by a gamma counter. ^{99m}Tc -phytate scintigraphy and histopathological assessment were performed for further evaluation.

Results: L-asparaginase-induced liver toxicity was significantly reduced with ethanolic extract in L-asparaginase-treated rats ($P<0.05$). It is worth mentioning that the aqueous extract of Anise seed led to hepatotoxicity ($P<0.05$) which is likely to be mainly due to contamination of the plant with the toxic pyrrolizidine alkaloids.

Conclusion: *P. anisum* ethanolic extract due to the presence of anethole and phenolic compounds can ameliorate L-asparaginase-induced hepatotoxicity in rats.

Keywords: L-asparaginase, *Pimpinella anisum* L., Hepatotoxicity, ^{99m}Tc -Phytate, Liver, Rats