

# بررسی اثرات هیستولوژیکی و تغییرات آنزیم‌های کبدی در مواجهه ماهی گورامی سه خال

## باتریکب 4-chloro-N(2-(4-methoxyphenyl)-4-oxotiazolidin-3-yl)-2-phenoxybenzamid

### phenoxybenzamid بعنوان ضد تشنج

سهیلا نوروزی<sup>۱</sup>، طاهره ناجی<sup>۱\*</sup>، همایون حسین زاده صحافی<sup>۲</sup> و علی الماسی راد<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، گروه علوم پایه

<sup>۲</sup> ایران، تهران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

<sup>۳</sup> ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، گروه آموزشی شیمی دارویی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۳۰

### چکیده

داروهای ضد تشنج موثر هر کدام بدرجاتی، فعالیت غیر طبیعی نورون‌ها را بصورت انتخابی سرکوب می‌کنند. با این حال مکانیسم اثر و کارایی آنها در انواع مختلف اختلالات تشنجی تفاوت دارد. بررسی اثرات هیستولوژیکی ترکیب 4-chloro-N(2-(4-methoxyphenyl)-4-oxotiazolidin-3-yl)-2-phenoxybenzamid (مشتق فنوکسی بنزآمید) بر کبد ماهی گورامی سه خال و مقایسه آن با دیازپام بود. بدین منظور ۱۵۰ قطعه ماهی گورامی سه خال با وزن  $2 \pm 0.5$  گرم از کارگاه خان ماهی قزوین تهیه شد. گروه‌ها شامل کنترل ۱ (شاهد)، کنترل ۲ (حلال توئین ۸۰) و گروه کنترل رفرنس (دیازپام) ۴ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن گروه تیمار بترتیب با غلظت‌های ۱.۳، ۵.۷، ۱۷.۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بود. نخست کلرزدایی و سنجش فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب انجام شد. تزریق‌ها یک روز در میان و طی ده تزریق انجام شد، سپس تمام تیمارها تشریح و کبدها برای تهیه مقطع بافت کبدی جهت بررسی با میکروسکوپ نوری و الکترونی داخل فیکساتیوهای مربوطه قرار گرفت و تغییرات آنزیم‌ها و بافت کبد در آزمایشگاه بررسی شد. تغییرات آنزیم ALT، AST، و ALP در کنترل‌ها و تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $P \leq 0.05$ ). بررسی میکروسکوپی نیز حاکی از تغییرات غشایی، گسستگی، شکاف بین سینوزوئیدها و نکروز از دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به بالا بصورت وابسته به دوز بود. با افزایش دوز مشتق فنوکسی بنزآمید، بافت کبد و آنزیم‌های کبدی تحت‌تأثیر قرار گرفته و افزایش سطح آنزیم‌ها و تغییراتی همچون گسستگی بافتی، افزایش فاصله سینوزوئیدها و پیدایش واکوئل‌های چربی مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: 4-chloro-N(2-(4-methoxyphenyl)-4-oxotiazolidin-3-yl)-2-phenoxybenzamid، بافت کبد،

Trichogaster trichopterus، آنزیم‌های کبدی، تشنج

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۷۰۴۶۷۶، پست الکترونیکی: naji\_t@iaups.ac.ir

### مقدمه

انواع مختلف اختلالات تشنجی تفاوت دارد (۳). داروهای ضد تشنج بخوبی از راه خوراکی جذب می‌شوند و فراهم زیستی خوبی دارند. با در نظر گرفتن این واقعیت که بیشتر بنزودیازپین‌ها بطور بالقوه اثر منفی بر روی حافظه دارند

تشنج دوره محدودی از تخلیه غیرطبیعی نورونهای مغزی می‌باشد (۹). داروهای ضد تشنج موثر هر کدام بدرجات مختلفی، فعالیت غیرطبیعی نورون‌ها را بصورت انتخابی سرکوب می‌کنند. با این حال مکانیسم اثر و کارایی آنها در

خارج سلولی بوده و زمانی که به غشای سلول‌های کبدی صدمه‌ای وارد شده و یا در صورت مرگ سلول‌های کبدی میزان آن در پلاسما افزایش می‌یابد و میزان این افزایش نشانه‌ای از درجه وسعت ضایعات کبدی است (۱۴، ۱۷).

از آنجا که کبد اندامی حیاتی برای حفظ محیط داخلی بدن است مصرف طولانی مدت داروها باعث آسیب‌های جبران‌ناپذیر کبدی می‌شوند (۲). تغییرات بافت‌شناسی در اثر محرک‌های داخلی و خارجی ایجاد می‌شود که در هر صورت در نتیجه آشفتنگی در سطح مولکولی سازماندهی زیستی رخ می‌دهد. بنابراین بررسی بافت‌شناسی یک شاخص جامع بوده که می‌تواند بصورت دقیق وضعیت سلامت ماهی و تجمع مواد آلاینده را بیش از حد نرمال در محیط زیست مشخص نماید. کبد اندامی است که متابولیسم اولیه مواد غیرزیستی را انجام می‌دهد و با تغییر در ساختار ریخت‌شناسی مواد در برخی موارد سم‌زدایی مینماید (۱). طراحی ترکیبات جدید بر اساس هیبرید شدن فارماکوفور ۴- تیاژولیدینون و ۲- فنوکسی فنیل بوده است (۷). هر دو فارماکوفور فعالیت ضدتشنج نشان داده اند، انتظار می‌رود ساختار نهایی اثرات ضدتشنجی نشان دهد.

داروهای ضد تشنج موثر هر کدام بدرجاتی، فعالیت غیر طبیعی نوروں‌ها را بصورت انتخابی سرکوب می‌کنند (۱۸). اکثر آنها بوسیله‌ی آنزیم‌های کبدی متابولیزه می‌شوند، بنابراین مصرف همزمان آنها با داروهایی که القاکننده یا مهارکننده آنزیم‌های کبدی هستند می‌تواند باعث کاهش یا افزایش سطح پلاسمایی داروهای ضد تشنج شود. بنزودیازپین‌ها بعنوان یک دسته مهم از ضدتشنج‌ها بطور گسترده در بالین استفاده می‌شوند که برغم مزایای آنها، عوارض جانبی متعددی از جمله خواب‌آوری، فراموشی و اتاکسی دارند (۱۰، ۱۳). بنابراین سنتز آگونیست‌های جدید بنزودیازپین‌ها با اثرات ضد تشنجی قوی‌تر و عوارض جانبی کمتر دارای اهمیت بسیار زیادی می‌باشد (۸، ۱۹). بررسی عوارض جانبی این ترکیبات از طریق تأثیرات آنها

بنابراین سنتز آگونیست‌های جدید این گیرنده‌ها برای بدست آوردن اثر قوی‌تر و عوارض جانبی کمتر اهمیت دارد (۵ و ۶).

استفاده بیش از حد از داروهای ضد تشنج باعث تجمع متابولیت‌ها در بافت کبد می‌شود و آسیب‌های سلولی، ساختاری و تغییرات آنزیمی را بوجود می‌آورد (۷). از طرفی بررسی تغییرات سطح آنزیم‌های کبدی، AST، ALT، ALP می‌تواند میزان تخریب ترکیباتی که اثرات سوء کبدی را نشان دهد.

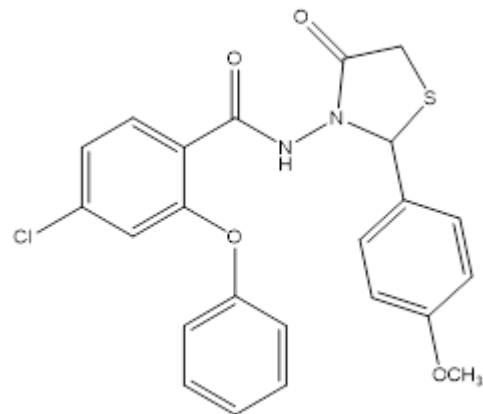
شروع آسیب کبدی پس از دارو درمانی طی یک هفته تا چند ماه رخ می‌دهد که با افزایش AST و ALT و یا هر دو همراه است. از این رو بیماران بایستی بصورت دوره‌ای ارزیابی شوند. بیماری‌هایی نظیر روماتوئید آرتریت و اوستئوآرتریت که مزمن بوده و در دراز مدت دارو می‌گیرند آسیب‌های کبدی بیشتری از خود نشان می‌دهند (۱۶).

آنزیم‌های کبدی ترکیبات پروتئینی هستند و نقشی حیاتی در فعالیت‌های سلولی دارند و هر گونه آسیب کبدی می‌تواند منجر به افزایش این سه آنزیم اصلی کبد (AST، ALT، ALP) شود و در صورتی که فرآیند متابولیسم بصورت غیر معمول آهسته باشد ریسک آسیب کبدی افزایش می‌یابد (۱۵).

آنزیم‌های کبدی از جمله فاکتورهای بیوشیمیایی مهم هستند که با سنجش آنها بعنوان یک شاخص آزمایشگاهی استاندارد جهت بررسی اختلالات کبدی در موجودات استفاده می‌شود. پرمصرف‌ترین آنزیم‌های تشخیص کبدی، شامل آسپاراتات آمینوترانسفرازها (AST یا SGOT) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT یا SGPT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) هستند. این آنزیم‌ها بطور معمول داخل سلول‌های کبدی قرار دارند. زمانی که کبد دچار آسیب شود سلول‌های کبدی این آنزیم‌ها را وارد خون می‌کنند. بالا رفتن سطح این آنزیم‌ها در خون نشانه آسیب کبدی است. این آنزیم‌ها در سیتوپلاسم سلول‌های کبدی چندین مرتبه بیشتر از مایع

وزنی ماهی‌ها، غلظت‌های مورد نظر از ماده سنتز شده مشتق فنوکسی بنزآمید در حلال توئین ۸۰ (۰.۴٪) حل شده و با توجه به LD50 تعیین شده، غلظت‌های ۱،۳،۵،۷، ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تهیه و در ویال‌های جداگانه برای تزریق نگهداری شد (۶). بمنظور آداپته شدن ماهی‌ها با شرایط محیطی، بمدت ۴۸ ساعت بدون تزریق در آکواریوم نگهداری شدند. آزمایشات در ۷ گروه (گروه کنترل ۱ (شاهد)، گروه کنترل ۲ (حلال)، گروه کنترل ۳ (دیازپام میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و ۴ گروه تیمار بترتیب با غلظت‌های (۱،۳،۵،۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) که هر گروه شامل ۱۵ قطعه ماهی نابالغ بود صورت گرفت. استفاده از حلال در این تحقیق بمنظور بررسی مؤثر و بی‌اثر بودن حلال در تحقیق بود که بدین منظور از حلال‌های مختلفی برای حل کردن ترکیب مورد نظر استفاده شد که در نهایت حلال توئین ۸۰ انتخاب شد. بمنظور تزریق ابتدا ویال‌های آماده شده (با غلظت‌های ۱،۳،۵،۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) توسط دستگاه سونیکاتور پیش از انجام هر تزریق ۱۵ دقیقه سونیکه شده و ذرات دارویی بصورت یکنواخت در حلال پراکنده و سپس دوزهای تعیین شده به گروه‌های تیمار توسط سرنگ انسولین BD تزریق شد. دوزهایی از ماده مورد نظر در غلظت‌های کم (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، متوسط (۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، زیاد (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و خیلی زیاد (۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بصورت یک روز در میان و طی ۲۰ روز به ماهی‌ها تزریق شد. و طی این مدت تغذیه و تعویض آب آکواریوم‌ها طبق استاندارد ماهی‌گورامی سه‌خال انجام شد. مقدار ماده تزریقی به ازای هر ماهی ۰/۰۲ میلی‌لیتر بوده و تزریق‌ها بصورت داخل عضله‌ای در محلی بین خط جانبی ماهی و عضله پشتی انجام شد. میزان مرگ و میر ماهی‌ها در طول مدت آزمایش بدقت ثبت شد. پس از ۱۰ تزریق و طی مدت ۲۰ روز ماهی‌ها بوسیله عصاره گل میخک، بیهوش شده و بیومتری ماهی‌ها شامل اندازه‌گیری طول و

بر روی کبد و آنزیم‌های کبدی سنجیده می‌شود و از آنجایی که سیستم کبدی ماهی‌گورامی سه‌خال مدل ساده‌تر انسانی است و همچنین بدلیل سرعت تکثیر بالا و مقاومت در شرایط آزمایشگاهی بعنوان مدلی مناسب در این تحقیق انتخاب شده است. در این مطالعه قصد بر آن است که تأثیرات دوزهای مختلف یکی از مشتقات ۴-تiazolidinون بنام مشتق فنوکسی بنزآمید بعنوان آگونیست رسپتورهای بنزودیازپینی بر روی تغییرات سطوح آنزیم‌های کبدی ماهی‌گورامی سه‌خال بررسی شود (شکل ۱). با اندازه‌گیری و مقایسه سطوح آنزیم‌ها و همچنین برش‌گیری از بافت کبد قبل و بعد از آزمایش، اثرات این ترکیب بررسی گردید.



شکل ۱- ساختار شیمیایی ترکیب 4-chloro-N(2-(4-methoxyphenyl)-4-oxotiazolidin-3-yl)-2-phenoxybenzamid

## مواد و روشها

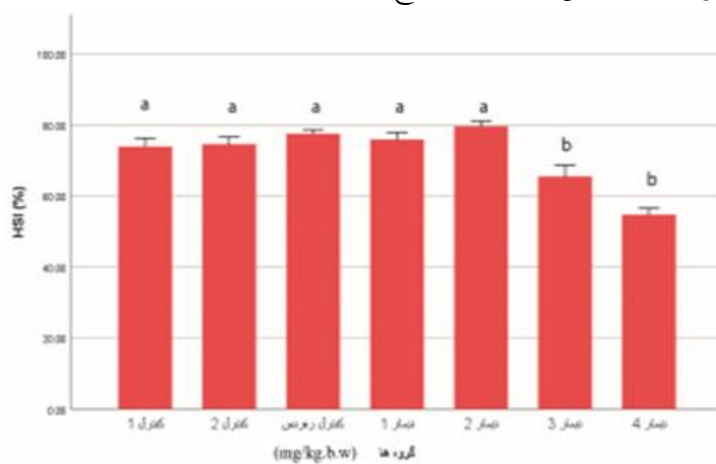
تعداد ۱۵۰ قطعه ماهی در اردیبهشت ۱۳۹۸ از کارگاه تکثیر و پرورش ماهی، خان ماهی واقع در قزوین خریداری شد. پس از کلرزدایی آب آکواریوم‌ها، فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل: سختی، دما و pH انجام پذیرفت. پیش از شروع اولین تزریق تمامی ماهی‌ها بوسیله محلول عصاره گل میخک با غلظت  $2 \times 10^{-6}$  میلی‌گرم بر کیلوگرم بیهوش شده و عملیات بیومتری شامل سنجش طول ماهی‌ها (با خط‌کش) و وزن آنها (با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم) انجام شد، سپس با توجه به میانگین

ماهی‌ها، بافت کبد با میکروسکوپ نوری و الکترونی برترتیب در فیکساتیوهای فرمالین ۱۰٪ و گلوآرآلدهید ۲/۵٪ قرار داده شد. سپس مقاطع تهیه شده از بافت کبد توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی در آزمایشگاه مشاهده شده و در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ و آزمون آماری One way ANOVA بررسی شد.

وزن انجام شد. تمام آزمایشات ۳ بار تکرار گردید. میزان تغییرات آنزیم‌های کبدی (AST, ALT, ALP) با کیت مخصوص اندازه‌گیری شد. جهت محاسبه شاخص هپاتوسوماتیک از فرمول زیر استفاده شد (۲) هپاتوسوماتیک شاخص از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$HSI (\%) = 100 \times \text{وزن کبد} / \text{وزن بدن}$$

بمنظور بررسی تغییرات بافت کبد، پس از بیهوشی کامل ماهی‌ها توسط محلول آبی از عصاره گل‌میخک و تشریح



کنترل ۱: شاهد	تیمار ۱ دوز میلی‌گرم بر کیلوگرم
کنترل ۲: حلال (توئین ۸۰)	تیمار ۲ دوز میلی‌گرم بر کیلوگرم
کنترل رفرنس: دیازپام ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم	تیمار ۳ دوز میلی‌گرم بر کیلوگرم
	تیمار ۴ دوز میلی‌گرم بر کیلوگرم
گروه‌های کنترل	گروه‌های تیمار

نمودار ۱- بررسی شاخص هپاتوسوماتیک (HSI). Error Bars Mean  $\pm$  SE.

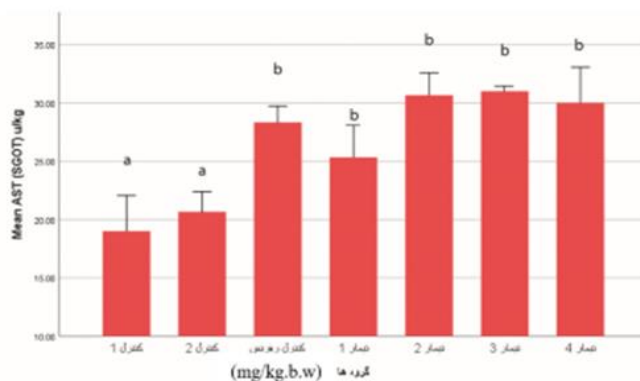
(حروف غیر مشابه بمعنای وجود اختلاف معنادار در سطح  $P \leq 0.05$  می‌باشد).

میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت بهم اختلاف معناداری نداشتند ( $P \geq 0.05$ ) ولی نسبت به گروه کنترل و تیمارهای ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف معناداری را نشان دادند ( $P \leq 0.05$ ). (نمودار ۱).

بررسی شاخص آنزیم AST: مقایسه نتایج سطح آنزیم AST در گروه‌های کنترل ۱ (شاهد) و کنترل ۲ (حلال) اختلاف معناداری را نشان نداد ( $P > 0.05$ ).

## نتایج

بررسی شاخص هپاتوسوماتیک: بررسی شاخص هپاتوسوماتیک حاکی از آن بود که شاخص هپاتوسوماتیک در گروه کنترل ۱ (شاهد) و کنترل ۲ (حلال) و کنترل رفرنس (دیازپام ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نسبت بهم اختلاف معناداری نداشتند ( $P \geq 0.05$ ). همچنین بررسی شاخص هپاتوسوماتیک نشان داد که تیمارهای ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری نشان ندادند ( $P \geq 0.05$ ). نتایج تیمارهای ۵



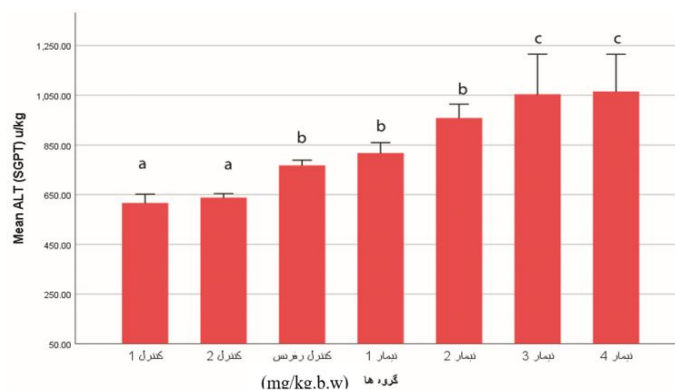
کنترل ۱: شاهد	تیمار ۱ دوز میلی‌گرم بر کیلوگرم
کنترل ۲: حلال (توئین ۸۰)	تیمار ۲ دوز میلی‌گرم بر کیلوگرم
کنترل رفرنس: دیازپام ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم	تیمار ۳ دوز میلی‌گرم بر کیلوگرم
	تیمار ۴ دوز میلی‌گرم بر کیلوگرم
گروه‌های کنترل	گروه‌های تیمار

نمودار ۲- بررسی شاخص هپاتوسوماتیک (AST). Error Bars Mean  $\pm$  SE.

(حروف غیر مشابه بمعنای وجود اختلاف معنادار در سطح  $P \leq 0/05$  می‌باشد).

دریافت کننده ماده مورد نظر با افزایش دوز مصرفی، مقادیر آنزیم AST افزایش محسوسی یافت و اختلاف بین نتایج حاصل از تمام تیمارها نسبت به گروه کنترل معنادار بود ( $P \leq 0/05$ ) (نمودار ۲).

ولی اختلاف سطح آنزیم AST در تمامی گروه‌های تیمار و همچنین کنترل رفرنس (دiazepam ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نسبت به کنترل ۱ (شاهد) و کنترل ۲ (حلال) تفاوت معناداری را نشان داد ( $P \leq 0/05$ ). در تمامی تیمارهای



کنترل ۱: شاهد	تیمار ۱ دوز میلی‌گرم بر کیلوگرم
کنترل ۲: حلال (توئین ۸۰)	تیمار ۲ دوز میلی‌گرم بر کیلوگرم
کنترل رفرنس: دیازپام ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم	تیمار ۳ دوز میلی‌گرم بر کیلوگرم
	تیمار ۴ دوز میلی‌گرم بر کیلوگرم
گروه‌های کنترل	گروه‌های تیمار

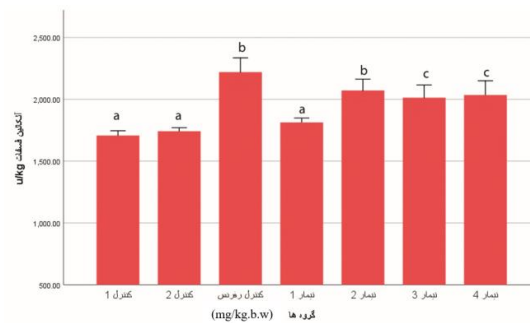
نمودار ۳- بررسی شاخص آنزیم ALT (SGPT). Error Bars Mean  $\pm$  SE.

(حروف غیر مشابه بمعنای وجود اختلاف معنادار در سطح  $P \leq 0/05$  می‌باشد).

نتایج آنزیم ALT نشان داد که سطح این آنزیم در گروه کنترل ۱ (شاهد) و گروه کنترل ۲ (حلال) اختلاف معناداری

میلیگرم بر کیلوگرم و ۷ میلیگرم بر کیلوگرم نسبت به کنترل ۱ (شاهد) و کنترل ۲ (حلال) و کنترل رفرنس (دiazپام ۳ میلیگرم بر کیلوگرم) و تیمارهای ۱ میلیگرم بر کیلوگرم و ۳ میلیگرم بر کیلوگرم اختلاف معناداری را نشان داد ( $P \leq 0/05$ ). نتایج حاکی از آن بود که تغییرات آنزیم ALT نیز همانند AST وابسته به دوز بود (نمودار ۳).

نداشت ( $P > 0/05$ ). اختلاف سطح آنزیم در تیمارهای ۱ میلیگرم بر کیلوگرم و ۳ میلیگرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل ۱ (شاهد) و کنترل ۲ (حلال) معنادار بود ( $P \leq 0/05$ )، ولی این اختلاف نسبت به کنترل رفرنس (دiazپام ۳ میلیگرم بر کیلوگرم) معنادار نبود ( $P > 0/05$ ). با توجه به نمودار حاصل از تغییر سطوح آنزیم، تیمارهای ۵



کنترل ۱: شاهد	تیمار ۱ دوز ۱ میلیگرم بر کیلوگرم
کنترل ۲: حلال (توئین ۸۰)	تیمار ۲ دوز ۳ میلیگرم بر کیلوگرم
کنترل رفرنس: Diazپام ۳ میلیگرم بر کیلوگرم	تیمار ۳ دوز ۵ میلیگرم بر کیلوگرم
	تیمار ۴ دوز ۷ میلیگرم بر کیلوگرم
گروه‌های کنترل	گروه‌های تیمار

نمودار ۴- بررسی شاخص آنزیم ALP

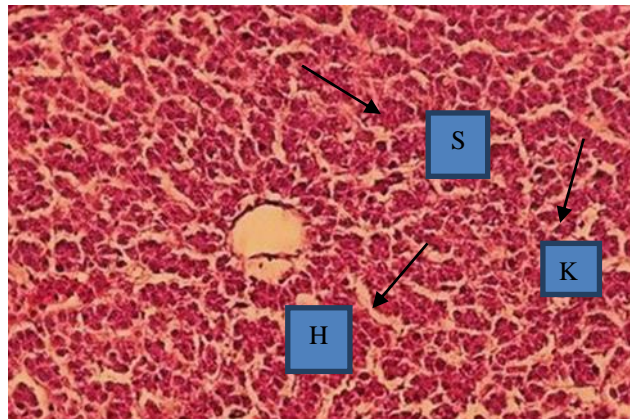
Error Bars Mean  $\pm$  SE. ALP (حروف غیر مشابه بمعنای وجود اختلاف معنادار در سطح  $P \leq 0/05$  می‌باشد).

بود (نمودار ۴).

بافت‌شناسی کبد با میکروسکوپ نوری: جهت بررسی تغییرات بافت کبد در تیمارها، تصاویر مربوط به میکروسکوپ نوری آنها با یکدیگر مقایسه شد. این نتایج در شکل‌های ۲ تا ۴ آمده است.

نتایج حاصل نشان داد که در گروه کنترل ۱ (شاهد)، هپاتوسیت‌ها دارای هسته مرکزی و سیتوپلاسم مشخص بودند و همچنین از شکل طبیعی برخوردار بودند. همچنین سینوزوئیدهای کبدی بصورت نرمال در فاصله صفحات سلول‌های کبدی قرار گرفتند. توده چربی در این تیمار مشاهده نشد. بطور کلی یک نمای طبیعی از بافت کبد مشاهده شد (شکل ۲).

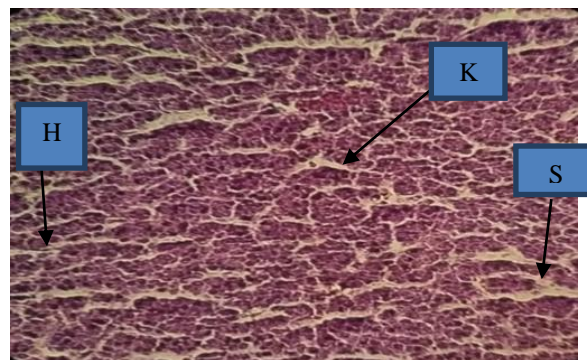
بررسی شاخص آنزیم الکالین فسفاتاز: نتایج حاصل از آنزیم ALP حاکی از آن بود که میزان تغییرات آنزیم در گروه‌های کنترل ۱ (شاهد) و کنترل ۲ (حلال) و تیمار ۱ میلیگرم بر کیلوگرم اختلاف معناداری را نشان نداد ( $P > 0/05$ ). تیمار ۳ میلیگرم بر کیلوگرم و کنترل رفرنس (دiazپام ۳ میلیگرم بر کیلوگرم) نیز با هم اختلاف معناداری نداشتند ( $P > 0/05$ ). ولی نسبت به گروه کنترل ۱ (شاهد) و کنترل ۲ (حلال) و تیمار ۱ میلیگرم بر کیلوگرم اختلاف معناداری را نشان داد ( $P \leq 0/05$ ). تیمارهای ۵ میلیگرم بر کیلوگرم و ۷ میلیگرم بر کیلوگرم نسبت به هم اختلاف معناداری را نشان ندادند ( $P > 0/05$ ) ولی نسبت به سایر تیمارها و گروه‌های کنترل اختلاف معناداری داشتند ( $P \leq 0/05$ ). تغییرات سطح آنزیم ALP نیز وابسته به دوز



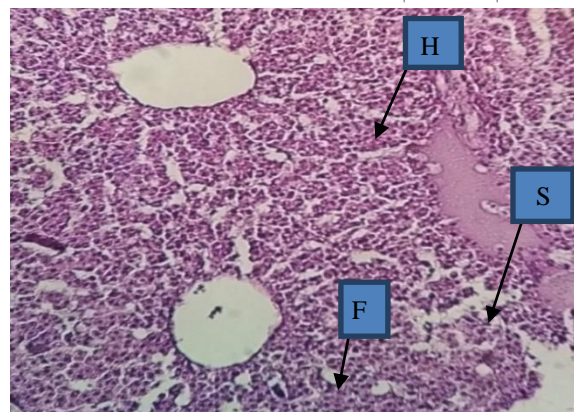
شکل ۲- مقطعی از بافت کبد ماهی کنترل ۱ (شاهد)، H: هپاتوسیت؛ S: سینوزوئید، K: سلول کوپفر رنگ‌آمیزی H & E، بزرگنمایی X40

بررسی مقطع کبدی در تیمار ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم گسستگی و شکاف‌های وسیع بین هپاتوسیت‌ها و همچنین فاصله گسترده بین سلول‌ها و اتساع سینوزوئیدها را نشان داد. در این دوز حفره‌ها و شکاف‌های بین سلولی افزایش یافته، واکوئل‌های چربی در همه جای سلول قابل مشاهده است. دیواره سلولی هپاتوسیت‌ها کاملاً مشخص نیست و آشفتگی سلولی بوضوح قابل رویت است (شکل ۴).

بررسی مقطع کبدی در تیمار ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم نشان داد که سلول‌ها کمابیش همانند گروه کنترل بوده و از ظرفیت کبدی نرمال برخوردار بودند. هپاتوسیت‌ها دارای هسته مرکزی و سیتوپلاسم واضح و مشخص بوده و شکل کاملاً طبیعی داشتند. همچنین سینوزوئیدهای کبدی بصورت نرمال در فاصله صفحات سلول‌های کبدی قرار گرفته بودند. در این نمونه اثری از توده چربی مشاهده نشد (شکل ۳).



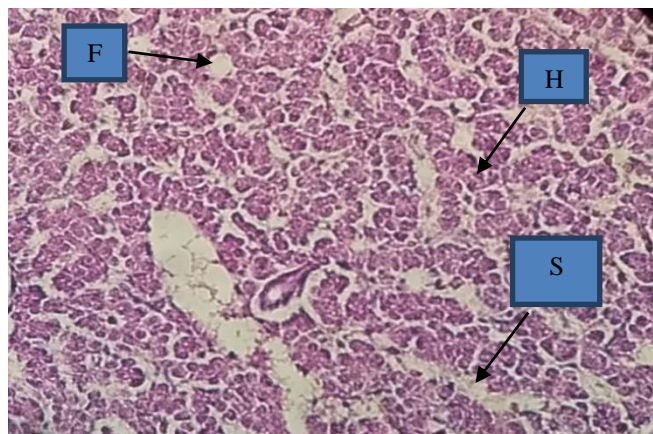
شکل ۳- مقطعی از بافت کبد ماهی تیمار ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم H: هپاتوسیت، S: سینوزوئید K: سلول کوپفر، رنگ‌آمیزی H & E، بزرگنمایی X40



شکل ۴- مقطعی از بافت کبد ماهی تیمار ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم H: هپاتوسیت، S: سینوزوئید، F: واکوئل چربی؛ رنگ‌آمیزی H & E، بزرگنمایی X40

یافته، واکوئل‌های چربی در همه جای سلول قابل مشاهده است. دیواره سلولی هپاتوسیت‌ها مشخص نیست و آشفتگی سلولی بوضوح قابل رویت است (شکل ۵).

بررسی مقطع کبد در تیمار ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز گسستگی و شکاف‌های وسیع بین هپاتوسیت‌ها و همچنین فاصله گسترده بین سلول‌ها و اتساع سینوزوئیدها را نشان داد. در این دوز حفره‌ها و شکاف‌های بین سلولی افزایش

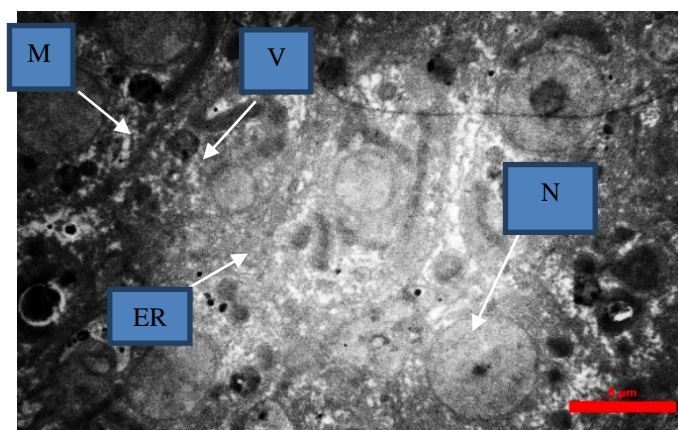


شکل ۵- مقطعی از بافت کبد ماهی تیمار ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم H. هپاتوسیت، S: سینوزوئید، F: سلول چربی؛ رنگ آمیزی E & H، بزرگنمایی 40X

میتوکندری‌های طبیعی که نشانه فعالیت طبیعی یک سلول سالم است، از دیگر اجزایی بودند که با کیفیت طبیعی مشاهده شدند. توده چربی در این تیمار مشاهده نشد و بطور کلی یک نمای طبیعی از بافت کبد مشاهده شد (شکل ۶).

بافت‌شناسی کبد با میکروسکوپ الکترونی: جهت بررسی تغییرات بافت کبد در تیمارها، تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی آنها با یکدیگر مقایسه شد. این نتایج در شکل‌های ۶ تا ۸ آمده است.

تصاویر الکترونی گروه کنترل ۱ (شاهد) هیچ مورد غیر طبیعی را نشان نداد. غشای مشخص سلول‌ها رویت شد. هسته، شبکه آندوپلاسمی گسترده، دستگاه گلژی و

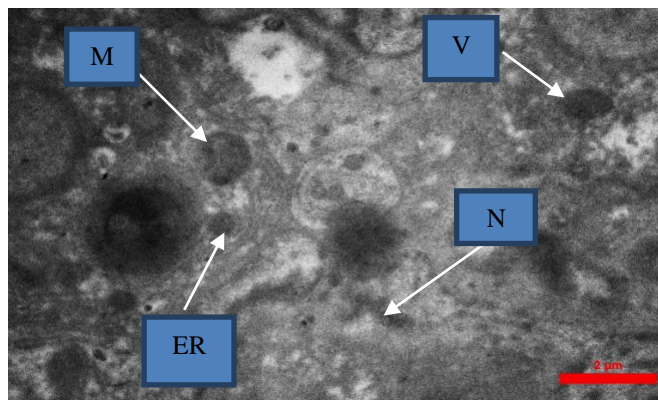


شکل ۶- تصویر میکروسکوپ الکترونی از مقطعی از بافت کبد ماهی کنترل ۱ (شاهد) N: هسته، M: میتوکندری، ER: شبکه آندوپلاسمی، V: وزیکول، (scale bar: 5μm)

گروه کنترل ۱ (شاهد) بوده و از یک ظرفیت کبدی نرمال برخوردار بودند. هپاتوسیت‌ها دیده می‌شود. اما همچنان

بررسی مقطع کبدی در تیمار ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم نشان داد که سلول‌ها با وجود تغییرات جزئی، کمابیش همانند

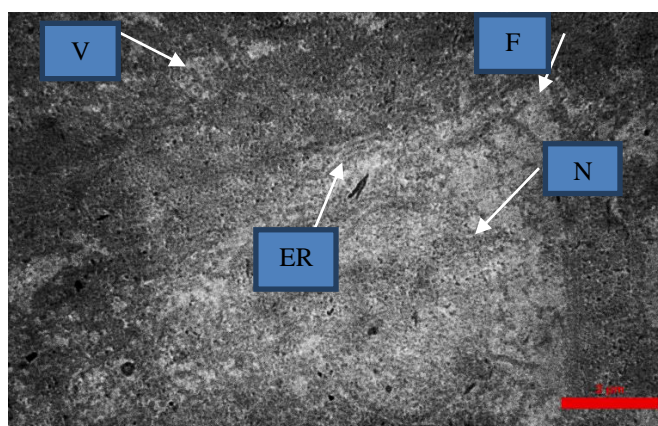
هسته و شبکه آندوپلاسمی و میتوکندری مشاهده می‌شود (شکل ۷).



شکل ۷- تصویر میکروسکوپ الکترونی مقطع بافت کبد تیمار ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم. N: هسته، M: میتوکندری، ER: شبکه آندوپلاسمی، V: وزیکول. (scale bar: 2 μm)

پراکنده است. ارگانل‌ها واضح دیده نمی‌شوند و میتوکندری دیده نمی‌شود. بافت سلول آسیب دیده که بالا رفتن آلکالین فسفاتاز در اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی هم مبین همین اتفاق است (شکل ۸).

بررسی مقطع کبدی در تیمار ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم نشان می‌دهد که سلول کبد دچار تخریب شده که احتمالاً باعث سیروز یا کبد چرب است، بوضوح غشای هپاتوسیت شاهد نیست. شبکه آندوپلاسمی تا حدی مشاهده می‌شود اما



شکل ۸- تصویر میکروسکوپ الکترونی از مقطع بافت کبد تیمار ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم. N: هسته، M: میتوکندری، ER: شبکه آندوپلاسمی، V: وزیکول، F: واکنل چربی (scale bar: 2 μm)

( $P > 0.05$ )، که این موضوع نشانه عدم ایجاد آسیب‌های سلولی توسط ماده حلال است. تیمار ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل و تیمار ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف معناداری را نشان داد ( $P \leq 0.05$ ). همچنین تیمارهای ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به هم اختلاف معناداری را نشان ندادند ( $P > 0.05$ ) ولی نسبت بسایر تیمارها و کنترل اختلاف معناداری داشتند ( $P \leq 0.05$ ) (نمودار ۴). تغییرات سطح آنزیم ALP نیز وابسته به دوز

## بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق میزان سمیت ماده سنتز شده ضد تشنج مشتق فنوکسی بنزآمید با دیازپام مقایسه گردید. با توجه به نتایج حاصل از آنزیم ALP تغییرات سطح سرمی آنزیم در گروه‌های کنترل ۱ (شاهد) و کنترل ۲ (حلال) اختلاف معناداری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). همچنین تیمار ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز با کنترل اختلاف معناداری نشان نداد

آنالوگ های جایگزین 4H-3(2-phenoxy)pheny-1,2,4-triazol و مشتقات کلر شده آن طراحی و تهیه کردند که تجزیه و تحلیل سازگاری و مطابقت مینیمم انرژی کانفورم های ترکیبات سنتز شده روی استازولام (اگونست گیرنده بنزودیازپین) نشان داد که با بخش اصلی فارماکوفور بنزودیازپین بخوبی همسان است. آزمایشات تشنجی از طریق Rotarod، PTZ(penthylen tetrazol) نشان داد که قرار دادن یک گروه امینو در موقعیت ۵ حلقه 1,2,4-Triazol، بویژه در مشتقات کلر، بهترین اثر را داشته که با دیازپام قابل مقایسه بود(4). زرقی و همکارانش در سال ۲۰۰۸ یک سری جدید از 1,3,4-oxadiazol را بعنوان ضد تشنج طراحی و سنتز کردند و نشان دادند که با قرار دادن یک گروه آمینو در موقعیت ۲ حلقه 1,3,4-Oxadiazole و یک جایگزین فلورو در موقعیت ارتو بنزیل اکسی ترکیبات دارای بهترین فعالیت ضد تشنجی بوده و نتایج نشان میدهد که این اثر از طریق مکانیزم گیرنده های بنزودیازپینی متداول است(۲۰).

زرقی و همکارانش در سال 2005 یک سری جدید از 2-substituted-5-(2-benzyloxyphenyl)-1, 3, 4-oxadiazoles سنتز کرده و بعنوان ضد تشنج ارزیابی کرده است. ترکیب 4b فعالیت ضد تشنجی قابل توجهی را در مدل های تشنجی نشان میدهد بنظر میرسد این اثر از طریق مکانیزم گیرنده های بنزودیازپینی مداخله می‌کند (۲۱).

در مطالعه حاضر مشاهده شد که تغییرات سطح آنزیم ALP بصورت وابسته به دوز بوده و این تغییرات در دوزهای ۱،۳،۵ میلیگرم بر کیلوگرم دارای اختلاف معنادار با گروه کنترل ۱ (شاهد) و کنترل ۲ (حلال) بود ( $P \leq 0/05$ ) (نمودار ۱۰). آنزیم AST بطور طبیعی در انواع مختلف بافت‌ها از قبیل: کبد، قلب، ماهیچه، کلیه و مغز قرار دارد. این آنزیم در صورت آسیب بهر یک از این بافت‌ها وارد خون شده و سطح سرمی آن افزایش می‌یابد، چنانچه نتایج مطالعه روی ماهی‌ها نشان داد تغییرات آنزیم AST نسبت به گروه کنترل ۱ (شاهد) و کنترل ۲ (حلال) دارای اختلاف معنادار بود ( $P \leq 0/05$ ) (نمودار ۲).

بود. از این رو مصرف دارو با حداقل دوز و در کوتاه‌ترین دوره درمان توصیه شده است، و در این مطالعه پس از حدود ۳ هفته در دوزهای بالا (۵ میلیگرم بر کیلوگرم و ۷ میلیگرم بر کیلوگرم) افزایش سطح آنزیم‌های کبدی مشاهده شد که نشانه شروع سمیت کبدی بود (نمودار ۴). با توجه به نتایج آزمایشگاهی و بررسی ساختار بافت در این مطالعه مشخص شد که بر اساس الگوی اول، سطح آنزیم‌های کبدی شامل ALT, ALP با افزایش دوز ماده مورد نظر افزایش یافت (نمودار ۲ و ۳ و ۴). چنانچه در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد با افزایش دوز مورد استفاده از ماده سنتز شده مشتق فنوکسی بنزآمید در تیمار ۵ میلیگرم بر کیلوگرم تجمع چربی بتبع کاهش بیان ژن متابولیزه کننده چربی افزایش یافت. از این رو اثرات هیستولوژیک و پاتولوژیک ماده سنتز شده مشتق فنوکسی بنزآمید بررسی شد تا بعنوان جایگزین احتمالی مناسبی برای دیازپام معرفی شود.

بر اساس الگوی دوم که حاکی از خونریزی و التهاب بافتی مزمن بود، تیمار ۵ میلیگرم بر کیلوگرم پس از ۱۰ تزریق بصورت یک روز درمیان گسستگی و شکاف‌های وسیع بین ساختار هپاتوسیت‌ها را نشان داد. همچنین در این تیمار فاصله گسترده بین سلول‌ها، اتساع سینوزوئیدها، حفره‌ها و شکاف‌های بین سلولی افزایش یافت. غشاء سلولی هپاتوسیت‌ها بوضوح مشخص نبود. همچنین تعداد میتوکندری‌ها نسبت به گروه کنترل ۱ (شاهد) و کنترل ۲ (حلال) و تیمار ۱ میلیگرم بر کیلوگرم کاهش یافته که نشانه آسیب وسیع بافت کبد است (شکل ۵).

با توجه بعوارض جانبی بنزودیازپین‌ها از جمله تحمل، وابستگی و اختلال حافظه تحقیقات پیرامون سنتز اگونست های رسپتورهای بنزودیازپینی انجام شده که به ترکیبات با قدرت اثر بیشتر و عوارض جانبی کمتر دست یابند (۴،۱۱،۱۲،۲۰) که در این زمینه تحقیقات زیادی انجام شده اکبرزاده و همکارانش در سال ۲۰۰۳ مجموعه ای جدید از

به گروه‌های کنترل و تیمارهای ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف معناداری نشان دادند که این اختلاف نشانه وجود التهاب در تیمارهای ۵ و ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود ( $P \leq 0/05$ ) (نمودار ۱).

در این مطالعه پروفایل سمیت کبدی ماده سنتز شده مشتق فنوکسی بنزآمید بعنوان جایگزین مناسبی برای دیازپام با عوارض بالای کبدی بررسی شد و نتایج بررسی بافت کبد در تیمار ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم حاکی از آن بود که سلول‌ها کمابیش همانند گروه کنترل بوده و از یک ظرفیت کبدی نرمال برخوردار بودند. هپاتوسیت‌ها دارای هسته مرکزی و سیتوپلاسم واضح و مشخص بوده و از شکل کاملاً طبیعی برخوردار بودند. همچنین سینوزوئیدهای کبدی بصورت نرمال در فاصله صفحات سلول‌های کبدی قرار گرفتند. توده چربی در این تیمار مشاهده نشد. همچنین بررسی مقطع کبدی با میکروسکوپ الکترونی در ۳ تیمار میلی‌گرم بر کیلوگرم نشان داد که سلول‌ها کمابیش همانند گروه کنترل بوده و از یک ظرفیت کبدی نرمال برخوردار بودند. هپاتوسیت‌ها دارای هسته مرکزی و سیتوپلاسم واضح و مشخص بوده و اندامک‌های سلولی از شکل کاملاً طبیعی برخوردار بودند. در این تیمار هم همانند گروه کنترل ۱ توده چربی مشاهده نشد. از این نتایج چنین استنتاج شد که ماده سنتز شده مشتق فنوکسی بنز آمید دوزهای ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم سمیت کبدی چندانی بر بافت کبد نداشته و بافت کبد کمابیش مشابه گروه کنترل ۱ (شاهد) بود. از این رو ماده سنتز شده مشتق فنوکسی بنزآمید با پروفایل سمیت کبدی کمتر و در برخی موارد معادل داروی رفرنس (دیازپام ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بررسی شد (شکل ۸). در مطالعه حاضر بررسی مقطع بافت کبد تیمار ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داد تعداد اندامک‌هایی نظیر میتوکندری‌ها که نشانه فعالیت سلول سالم است کاهش یافته و در نهایت نکروز و از بین رفتن سلول هپاتوسیت سالم دیده شد. در این دوز واکوئل‌های چربی در همه جای سلول مشخص

آنزیم ALT بر عکس AST بطور طبیعی بیشتر در بافت کبد یافت می‌شود. اگرچه نمی‌توان گفت این آنزیم منحصراً در کبد قرار دارد، اما کبد جایی است که در برگیرنده بیشترین غلظت این آنزیم است (۱)، بررسی تغییرات آنزیم ALT نیز نشان داد تغییرات سطح سرمی این آنزیم وابسته به دوز بوده و دارای اختلاف معناداری با کنترل ۱ (شاهد) و کنترل ۲ (حلال) بود (نمودار ۳). هاروی در سال ۲۰۱۱ پس از مطالعه در خصوص آنزیم‌های کبدی بیان کرد که آلانین آمینوترانسفراز (ALT) بطور انحصاری در داخل سیتوپلاسم سلول‌های کبدی وجود دارد در حالی که آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) هم بصورت سیتوپلاسمی و هم بصورت میتوکندریایی وجود دارد و ارزیابی سطح پلاسمایی آمینوترانسفرازها نشان دهنده آسیب سلولی در ارگانی است که این آنزیم داخل آن بالا رفته است (۱۳).

نتایج تحقیق آدباو در سال ۲۰۰۳ نشان داد که تغییرات نسبت وزن هر یک از ارگان‌ها به بدن ممکن است نشانه‌ای از انقباض یا التهاب سلولی باشد. انقباض در ارگان می‌تواند بعلاوه از دست دادن مایع بافتی یا سلولی رخ دهد؛ در حالی که افزایش وزن هر ارگان به بدن می‌تواند نشان دهنده التهاب باشد (۳). چنانچه در مطالعه حاضر مشاهده شد، نتایج حاصل از میانگین وزن و طول ماهی‌ها قبل و بعد از تزریق اختلاف معناداری نداشتند ( $P > 0/05$ ). بررسی شاخص هپاتوسوماتیک گروه کنترل ۱ (شاهد) و کنترل ۲ (حلال) و کنترل رفرنس (دیازپام ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نسبت بهم اختلاف معناداری نداشتند ( $P > 0/05$ )، که این موضوع نشانه عدم ایجاد آسیب‌های سلولی توسط ماده حلال بود. همچنین نتایج نشان داد که تیمارهای ۱ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز نسبت به گروه‌های کنترل اختلاف معناداری نشان ندادند ( $P > 0/05$ ) که حاکی از حداقل آسیب سلولی در دوزهای پایین ماده سنتز شده مشتق فنوکسی بنز آمید بود. در نهایت نتایج شاخص هپاتوسوماتیک تیمارهای ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت بهم اختلاف معناداری نداشتند ( $P > 0/05$ ) ولی نسبت

بود و غشاء سلولی هپاتوسیت‌ها از بین رفته و آشفستگی سلولی بوضوح قابل رویت بود (شکل ۸).

در مطالعه حاضر که بر روی ماهی گورامی سه خال انجام شد دوزی معادل ۲۶-۶ برابر این محدوده برای بررسی اثر سمیت دارو تزریق شد که در نهایت سنجش سطح آنزیم AST و مقایسه نتایج میزان آنزیم در گروه‌های کنترل ۱ (شاهد) و کنترل ۲ (حلال) اختلاف معناداری را نشان نداد ( $P > 0.05$ ) که این امر نشان دهنده عدم تأثیر منفی حلال مورد استفاده در نتایج آنزیم بود. اختلاف سطح آنزیم AST در تمامی گروه‌های تیمار نسبت به کنترل نشان داد که در گروه‌های دریافت کننده ماده سنتز شده فنوکسی بنزآمید با افزایش دوز مصرفی، سطح سرمی آنزیم AST در تمامی تیمارها افزایش محسوسی یافت و اختلاف بین نتایج حاصل از تمام تیمارها نسبت به گروه کنترل ۱ (شاهد) و کنترل ۲ (حلال) معنادار بود ( $P \leq 0.05$ ). این اختلاف حاکی از آن بود که با افزایش دوز این آنزیم به تدریج افزایش یافته تا جایی که در دوز ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم افت نسبی آنزیم AST را شاهد بودیم که این حالت ناشی از تخریب گسترده و نکروز سلول‌های ترشح کننده آنزیم بود، به زبان ساده‌تر آسیب و تخریب سلولی به حدی وسیع بود که تعداد کثیری از سلول‌های کبدی از بین رفته و دیگر سلول‌های زیادی برای ترشح آنزیم وجود ندارد (نمودار ۲). نتایج آنزیم ALT نشان داد که سطح این آنزیم در گروه کنترل ۱ (شاهد) و گروه کنترل ۲ (حلال) اختلاف معناداری نداشت ( $P > 0.05$ ) ولی اختلاف سطح آنزیم در تیمارهای ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل معنادار بود ( $P \leq 0.05$ ). با توجه به نمودار حاصل از تغییر سطوح آنزیم، سطح آنزیم در تیمارهای ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به کنترل و تیمارهای ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف معناداری داشت ( $P \leq 0.05$ ). مقایسه نتایج این آنزیم حاکی از آن بود که تغییرات ALT نیز همانند AST وابسته به دوز بود (نمودار ۳).

بررسی مقطع کبدی در تیمار ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم حاکی از گسستگی و شکاف‌های وسیع بین هپاتوسیت‌ها بود. همچنین فاصله گسترده بین سلول‌ها و اتساع سینوزوئیدها صورت گرفته بود. در این دوز حفره‌ها و شکاف‌های بین سلولی افزایش یافته، واکوئل‌های چربی در همه جای سلول مشخص است و دیواره سلولی هپاتوسیت‌ها بوضوح مشخص نیست و آشفستگی سلولی به وضوح قابل رویت است (شکل ۵). بررسی یافته‌های آنزیمی، بالینی و مشاهدات میکروسکوپ نوری و الکترونی حاصل از این مطالعه نشان داد که ماده سنتز شده مشتق فنوکسی بنزآمید با افزایش دوز بیش از ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بافت کبد و آنزیم‌های کبدی را تحت تأثیر قرار داده و باعث افزایش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی و تغییراتی همچون گسستگی و نکروز بافت، افزایش فاصله سینوزوئیدها و پیدایش واکوئل‌های چربی در بافت کبد شده بود.

### نتیجه‌گیری

با بررسی تصاویر میکروسکوپ نوری و الکترونی و برآیندی از مقایسه آنزیم‌های کبدی مشاهده شد که اثرات سوء ترکیب با افزایش دوز دارو ارتباط مستقیم دارد. همچنین با توجه به نتایج این مطالعه اثرات زیان‌آور ترکیب ضد تشنج مشتق فنوکسی بنزآمید در دوزهای میلی‌گرم بر کیلوگرم ۱ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم روی بافت کبد کمتر از دیازپام بود. اما در دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم هر دو ترکیب آسیب‌های بافتی و برآیند افزایش آنزیمی تقریباً یکسان بود و با افزایش دوز این آسیب‌زایی به صورت وابسته به دوز افزایش یافت و باعث افزایش سطح آنزیم‌های کبدی و نکروز بافتی گردید و شکاف‌های وسیع بین سلولی بوضوح دیده شد (شکل ۵).

### سپاسگزاری

این تحقیق برگرفته از پایان نامه دانشجویی با کد اخلاق IR.IAU.PS.RES 1397.374 می‌باشد. بدین وسیله بر

این تحقیق یاری نموده اند تشکر و قدردانی نماییم.

خود لازم می‌دانیم از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام

## منابع

- ۱- توکمه چی الف ، فرخی ف ، حاجی رحیمی الف. ۱۳۹۴. بررسی تأثیر نانوذرات اکسید آهن و روی بر بافت کبد و عضله در ماهی قرل آلابی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران) جلد ۲۸، شماره ۳، ۲۹۳.
- ۲- نادری م، صفاهیه ع، دهقان مدیسه س، ذوالقرنین ح، رجب زاده قطرمی الف، عیدی وند س. ۱۳۹۳. اثر استروژنیک ۴-نونیل فتل بر سنتز ویتلوژنین در جنس نر نابالغ ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*). پژوهش‌های جانوری (زیست‌شناسی ایران) (۳۷):۱۴۳-۱۵۴.
- 3- Adebayo JO, Yakubu MT, Egwim EC, Owoyele VB, Enaibe BU. Effect of ethanolic extract of khaya senegalensis on some biochemical parameters of rat kidney. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 8869-72.
- 4- Akbarzadeh T, Tabatabai SA, Khoshnoud MJ, Shafaghi B, Shafiee A. Design and synthesis of 4H-3-(2-phenoxy) phenyl-1, 2, 4-triazole derivatives as benzodiazepine receptor agonists. *Bioorganic& Medicinal Chemistry*. 2003; 11:769-773.
- 5- Alerno S, Da Settimo F, Taliani S, Simorini F, La Motta C, Fornaciari G, et al. Medicinal chemistry of indolylglyoxylamide GABAA/BzR high affinity ligands: identification of novel anxiolytic/non sedative agents. *Current Topics in Medical Chemistry*. 2012; 12:286-311.
- 6- Almasirad A, Hosseini R, Jalalizadeh H, Rahimi-Moghaddam Z, Abaeian N, Janafrooz M, et al. Synthesis and analgesic activity of 2-phenoxybenzoic acid and N-phenylanthranilic acid hydrazides. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2006; 29:1180-1185.
- 7- Almasirad A, Tabatabai SA, Faizi M, Kebriaeezadeh A, Mehrabi N, Dalvandi A, et al. Synthesis and anticonvulsant activity of new 2-substituted-5-[2-(2-fluorophenoxy) phenyl]-1, 3, 4-oxadiazoles and 1, 2, 4-triazoles. *Bioorganic& Medicinal Chemistry Letter*. 2004; 14:6057-6059.
- 8- Almasirad A, Vousooghi N, Tabatabai SA, Kebriaeezadeh A, Shafiee A. Synthesis, anticonvulsant and muscle relaxant activities of substituted 1, 3, 4-oxadiazole, 1, 3, 4-thiadiazole and 1, 2, 4-triazole. *Acta Chimica Slovenica*. 2007; 54:317-324.
- 9- Faizi M, Dabirian S, Tajali H, Ahmadi F, Rezaee E, Shahhosseini S, et al. Novel agonists of benzodiazepine receptors: design, synthesis, binding assay and pharmacological evaluation of 1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pyrimidinone and 3-amino-1, 2, 4-triazole derivatives. *Bioorganic& Medicinal Chemistry*. 2015; 23:480-487.
- 10- Faizi M, Jahani R, Ebadi SA, Almasirad A. Novel 4-thiazolidinone derivatives as agonists of benzodiazepine receptors: Design, synthesis and pharmacological evaluation. *Experimental and Clinical Sciences*. 2017; 16: 52-62.
- 11- Grunwald C, Rundfeldt C, Lankau HJ, Arnold T, Höfgen N, Dost R, et al. Synthesis, pharmacology, and structure-activity relationships of novel imidazolones and pyrrolones as modulators of GABAA receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006; 49:1855-1866.
- 12- Guerrini G, Costanzo A, Ciciani G, Bruni F, Selleri S, Costagli C, et al. Benzodiazepine receptor ligands. 8: Synthesis and pharmacological evaluation of new pyrazolo [5, 1-c] [1, 2, 4] benzotriazine 5-oxide 3-and 8-disubstituted: High affinity ligands endowed with inverse-agonist pharmacological efficacy. *Bioorganic& Medicinal Chemistry*. 2006; 14:758-775.
- 13- Harvey R, Ferrier DR. *Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry*. 5<sup>th</sup> edition. 2011. pp. 213-214, 250-288.
- 14- Kumar Rajagopal, S. Maniskam, P., Periyasamy, V., Namasivayam, N. Activity of *Cassia auriculata* leaf extract in rats with alcoholic liver injury. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2003; 14:452-458.
- 15- Rezaee E, Hedayati M, Hoghooghi Rad L, Shahhosseini S, Faizi M, Tabatabai SA. Design, synthesis and biological evaluation of 4-benzamidobenzoic acid hydrazide derivatives as novel soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2014; 13:51-59.
- 16- Rudolph U, Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov*. 2011; 10:685-697.
- 17- Smith GB, Olsen RW. Functional domains of GABA A receptors. *Pharmacological Sciences*. 1995; 16:162-168.
- 18- Tabatabai SA, Barghi Lashkari S, Zarrindast MR, Gholibeikian M, Shafiee A. Design, synthesis and anticonvulsant activity of 2-(2-phenoxy) phenyl-1, 3, 4-oxadiazole derivatives.

- Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2013; 12:105–111.
- 19- Tripathi AC, Gupta SJ, Fatima GN, Sonar PK, Verma A, Saraf SK. 4-Thiazolidinones: the advances continue. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014; 72:52–77.
- 20- Zarghi A, Hajimahdi Z, Mohebbi S, Rashidi H, Mozaffari S, Sarraf S, et al. Design and synthesis of new 2-substituted-5-[2-(2-halobenzyloxy) phenyl]-1, 3, 4-oxadiazoles as anticonvulsant agents. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2008; 56:509–512
- 21- Zarghi A, Hamed S, Tootooni F, Amini B, Sharifi B, Faizi M, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of new 2-substituted-5-[2-[(2-halobenzyl) thio] phenyl]-1, 3, 4-oxadiazoles as anticonvulsant agents. *Scientia Pharmaceutica*. 2005; 76:185–201.

## Investigating of Histological and Pathological Effects of 4-chloro-N (2-(4-methoxyphenyl)-4-oxotiazolidin-3-yl)-2-phenoxybenzamid on *Trichogaster trichopterus* As Anticonvulsant

Noorozi S.<sup>1</sup>, Naji T.<sup>1\*</sup> and Hosseinzadeh sahafi H.<sup>2</sup> and Almasirad A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical science, Tehran Medical science, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural research, education and Promotion organization, Tehran, I.R. of Iran.

<sup>3</sup> Dept. of Medical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

### Abstract

Effective anticonvulsant drugs each selectively suppress the abnormal activity of neurons to some degree. However, their mechanism of action and efficacy differ in different types of epilepsy disorders. Investigation of histological effects of 4-chloro-N(2-(4-methoxyphenyl)-4-oxotiazolidin-3-yl)-2-phenoxybenzamid compared to Diazepam as a reference drug on *Trichogaster trichopterus*'s liver which has done at the fish lab of Islamic Azad University. In this study, 150 fish specimens with an average weight of  $2 \pm 0.5$  gr were bought from Khan-mahi fish farm. This study was performed on 4 treatment groups (1, 3, 5, 7 mg/kg b.w.) and three controls including, control 1 (intact), control 2 (solvent tween 80), reference control (Diazepam 3 mg/kg.b.w). Before dropping fishes into the aquariums, dechlorination of water was performed in 24 hours, and physicochemical factors were measured. Injections were performed every other day for 20 days and all the treatments were anatomized and their livers put into the fixative to check by optical and electron microscope later. The results showed that the ALT, AST and ALP were changed in controls to treatments. These results showed a significant difference between the control and the treatment groups ( $P \leq 0.05$ ) Microscopic images also showed membrane changes, rupture, gaps between sinusoids, and necrosis at a dose of 5 mg /kg body weight and was in a dose-dependent. Diazepam and derivative of phenoxybenzamid affects liver tissue and liver enzymes by increasing doses and increased sinusoidal spacing and adipose vacuole in liver tissue.

**Key words:** 4-chloro-N (2-(4-methoxyphenyl)-4-oxotiazolidin-3-yl)-2-henoxybenzamid, liver tissue, *Trichogaster trichopterus*, liver Enzymes, anticonvulsant