مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۷-۲۸۸
DOI: 10.22034/JAR.2023.2307

مقایسه تأثیر هالوپریدول و عصاره برگ توت سفید(*Morus alba*) بر بافت کبد و آنزیم‌های کبدی در ماهی گورامی سه خال(*Trichogaster trichopterus*)

طاهره ناجی[1*] ، مهزاد بی‌نیاز[1]، سعید محمدی معتمد[2] و یاسمن شیبانی[1]

[1] ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، گروه علوم پایه

[2] ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، گروه فارماکوگنوزی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۶

چکیده

داروی هالوپریدول، آنتاگونیست گیرنده دوپامین است و در درمان بیماری‌های روانی کاربرد دارد. توت سفید، گیاهی متعلق به خانواده Moracea است. برگ توت سفید همانند داروی هالوپریدول، دارای اثرات آنتی‌دوپامینرژیکی است. هدف از این پژوهش، مقایسه اثر عصاره برگ توت سفید و هالوپریدول به عنوان دو ماده آنتی دوپامینرژیک بر سطح آنزیم‌های کبدی و بافت کبد در ماهی گورامی سه خال با بالغ ماده می‌باشد. بدین منظور تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی در ۸ گروه شامل گروه‌های کنترل دست نخورده، کنترل حلال، تیمارهای دریافت کننده دوزهای ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم هالوپریدول، و دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره اتانولی برگ توت سفید، تقسیم شدند. تجویز داروها به صورت عضلانی در یک بازه زمانی بیست روزه به صورت یک روز در میان انجام گرفت. پس از اتمام تزریقات، آنزیم‌های کبدی و بافت کبد در همه گروه‌ها مورد مطالعه قرارگرفت. نتایج آماری نشان داد که بین سطح آنزیم‌های کبدی در گروه‌های کنترل و تحت تیمار اختلاف معنی‌دار وجود داشت($P<0/05$) به این ترتیب که با افزایش دوز، هالوپریدول موجب افزایش آنزیم‌های کبدی و آسیب به سلول‌های کبدی شد درحالیکه عصاره برگ توت سفید منجر به کاهش آنزیم‌های کبدی و حفاظت از سلول‌های کبد شد. بنابراین هالوپریدول می‌تواند سمیت کبدی ایجاد کند اما عصاره برگ توت سفید، احتمالا هپاتوپروتکتیو است.

واژه های کلیدی: هالوپریدول، توت سفید، کبد، ماهی گورامی سه‌خال

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: tnaji2002@gmail.com

مقدمه

روان پریشی (سایکوز)، حالتی از بیماری‌های روحی و روانی همراه با علائمی نظیر توهم، هذیان، گفتار نامنظم و رفتار آشفته است (۲۶). هالوپریدول از ازمشتقات بوتیروفنون‌ها و آنتاگونیست گیرنده دوپامین است و موجب انسداد گیرنده دوپامینی D۲، در اغلب نواحی به خصوص در مسیرهای مزولیمبیک و مزوکورتیکال می‌شود (۳). این دارو به‌طور گسترده در کنترل بیماری‌هایی از قبیل سایکوز، تیک، سندرم تورت، بیش فعالی و وسواس فکری-عملی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳، ۸و ۳۰). هالوپریدول تحت متابولیسم کبدی گسترده‌ای قرار می‌گیرد و تنها ۱ درصد از آن، در ادرار قابل تشخیص می‌باشد (۱۵). گیاه توت سفید از خانواده Moraceae است. این گیاه، درختی و برگ‌ریز است و رشد سریعی دارد. ارتفاع این درخت به طور معمول به ۳ الی ۶ متر می‌رسد. درخت توت سفید در سراسر جهان به خصوص در مناطقی که کرم ابریشم پرورش داده می‌شود، یافت می‌شود (۳۵و۳۶). مطالعه بر مدل‌های حیوانی، اثرات آنتی‌سایکوتیک عصاره برگ توت سفید را به اثبات رسانده است (۲۶،۲۲و۳۳)

DOI: 10.22034/JAR.2023.2307

برگ توت، حاوی فلاونوئیدها، کومارین و استیلبن با خاصیت محافظت از کبد می‌باشد. رادیکال‌های آزاد، از عوامل مهم بروز بسیاری از اختلالات کبدی هستند. عصاره برگ توت سفید، بخاطر حضور فلاونوئیدها، خاصیت آنتی اکسیدانی دارد و با از بین بردن رادیکال‌های آزاد، می‌تواند از اندام‌ها در برابر استرس اکسیداتیو، محافظت می‌کند (۱۴، ۲۶، ۳۶و ۳۷). ماهی گورامی سه خال با نام علمی *Trichogaster trichopterus* و نام عمومی گورامی سه‌خال شناخته می‌شود و متعلق به خانواده Anabantoidei است. گورامی سه‌خال، به عنوان مدل آزمایشگاهی، در این پژوهش، انتخاب شد. ماهیان بعلت پایینتر بودن در رده‌بندی مهره‌داران و تکامل کمتر سیستم عصبی نسبت به پستانداران، درد و رنج کمتری را متحمل می‌شوند، همچنین تهیه آن‌ها مقرون به صرفه است و در مجموع، مدل ارزشمندی در مطالعات سمیت کبدی هستند (۳۲). هالوپریدول و عصاره برگ توت سفید، هردو خاصیت آنتی‌دوپامینرژیکی دارند بنابراین با هدف بررسی و مقایسه عوارض جانبی آن‌ها بر سطح آنزیم‌های کبدی و بافت کبد، انتخاب شدند.

مواد و روشها

زمان و مکان پژوهش: این پژوهش در فروردین‌ماه سال ۱۴۰۱ در آزمایشگاه علوم پایه دانشکده داروسازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران و پس از دریافت کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1400.334، انجام شد.

مدل پژوهش: تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی بالغ و ماده گورامی سه‌خال با میانگین وزنی ۰/۰۱±۳/۲۴ گرم از یک کارگاه پرورش ماهی واقع در شهر همدان تهیه شد. ابتدا آب آکواریوم‌ها، کلرزدایی شد و ۴۸ ساعت بعد، ماهیان، در شرایط استاندارد از لحاظ دما، پی‌اچ، سختی آب و چرخه تاریکی‌روشنایی، با محیط سازگار شدند و بصورت کاملا تصادفی به ۸ گروه پانزده عددی، تقسیم شدند.

تیماربندی: گروه‌ها مشتمل بر گروه کنترل دست‌نخورده (شاهد)، کنترل حلال (اتانول ۷۰ درجه)، سه گروه تیماری با هالوپریدول با دوزهای ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی و سه گروه تیماری با عصاره برگ توت سفید با دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی، شد (۷، ۲۵و ۳۴). دوزهای انتخابی، پس از مرور مطالعات پیشین، انتخاب شد زیرا دراین مطالعات پس از آزمون و خطا، بازه‌ی دوزهای موثر، ایمن و غیرکشنده، به مرور زمان، مشخص شده‌اند.

منبع تهیه مواد موثره: برای تهیه محلول هالوپریدول، پودر ماده موثره آن به شماره بچ (Bach No: S_400488) از شرکت سبحان دارو، تهیه شد و مقدار مناسبی از آن، براساس میانگین وزنی ماهیان در سه گروه تیماری، در اتانول ۷۰ درجه حل گردید و درون ظرف کدر جهت انجام تزریقات نگهداری شد (۲۹). برگ‌های توت سفید در تیرماه سال ۱۴۰۰ از درخت‌های توت سفید در استان همدان چیده و تمیز شد و در شرایط مناسب از لحاظ تهویه، در سایه، خشک گردید. نمونه هرباریوم برگ درخت توت سفید، در هرباریوم دانشکده داروسازی، به شماره وچر(Voucher No: 164_AuPF)، ثبت گردید. برگ‌های خشک‌شده توسط دستگاه آسیاب برقی، آسیاب شد. به منظور تهیه عصاره برگ توت سفید، از اتانول ۷۰ درصد و روش خیساندن (Maceretion) استفاده شد (۳۱). پس از دو مرحله عصاره‌گیری، حلال تبخیر شده و عصاره خشک شده بدست آمد. مقدار مناسبی از عصاره خشک شده در اتانول ۷۰ درصد حل و پس از فیلتر شدن، در ظروف مناسب، ریخته شد.

روش تزریق و تشریح: محلول حاوی دارو و عصاره، به صورت عضلانی، بین باله پشتی و خط جانبی ماهی، با فواصل یک روز در میان، تزریق شد. تزریقات به‌وسیله سرنگ انسولین BD و با حجم ۰/۰۲ میلی‌لیتر در هر تزریق صورت گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از آخرین تزریق،

DOI: 10.22034/JAR.2023.2307

ماهی‌ها به‌وسیله عصاره گل میخک بیهوش و سپس تشریح شدند (۲۸) و کبد آن‌ها جدا شد. به دلیل کوچک بودن جثه ماهیان، امکان خونگیری فراهم نبود بنابراین از مایع بین بافتی جهت اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی استفاده شد. پس از خالی کردن احشای شکمی و قطع سر، دم و باله‌ها، بدن عضلانی ماهی با دستگاه هموژنایزر، یکدست شد و به لوله آزمایش، انتقال یافت.

آنزیم‌سنجی: لوله‌های حاوی نمونه، سانتریفیوژ شد و مایع بین بافتی در بالای لوله جدا شد. سطح آنزیم‌های ALT، ALP و AST، توسط کیت‌های تشخیص کمی شرکت پارس آزمون و به روش فوتومتریک اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری غلظت آنزیم‌های ALT و AST، نمونه‌ها با محلول‌های معرف مخلوط شدند و پس از یک دقیقه جذب نوری آن‌ها در طول موج ۳۴۰ نانومتر، خوانده شد. اپتیمم فعالیت آنزیم ALP در محیط قلیایی است بنابراین از دی‌اتانول‌آمین استفاده شد تا pH ای برابر ۹/۸ ایجاد کند. سپس نمونه و معرف با هم مخلوط شد و پس از یک دقیقه جذب نوری آن در طول موج ۴۰۵ نانومتر، خوانده شد.جذب هر نمونه با منحنی جذب استاندارد مقایسه شد و بدین ترتیب، غلظت هر آنزیم، محاسبه شد.

تهیه لام: جهت آماده سازی لام‌ها، کبدهای جدا شده در هر گروه، داخل فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد و سپس مراحل پاساژ، قالب‌گیری، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی انجام شد. لام‌های آماده شده به‌وسیله میکروسکوپ نوری نیکون (EclipseE100) مورد مطالعه قرار گرفت. جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی، ابتدا بافت کبد در گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد و تترااکسید اسمیم ۱/۵ درصد، فیکس شد. سپس نمونه‌ها به‌وسیله الکل و استون، آبگیری شد، در رزین پلیمریزه شد و بعد برش‌گیری انجام شد. برش‌ها روی گرید (شبکه مسی)، قرارگرفت و رنگ آمیزی شد. در آخر، گریدها با میکروسکوپ الکترونی عبوری (EM208 Philips, TEM(Nederland) مورد بررسی قرار گرفت (۲۷).

تحلیل آماری: جهت تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از سه‌بار تکرار در گروه‌های شاهد و تحت تیمار و بررسی میزان معنی‌دار بودن اختلافات مشاهده شده، از ورژن ۲۶ نرم‌افزار SPSS و روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه(one way Anova) استفاده شد. به منظور مقایسه میانگین‌ها، از آزمون دانکن و برای رسم نمودارها هم از نرم افزارGRAPHPAD استفاده شد.

نتایج

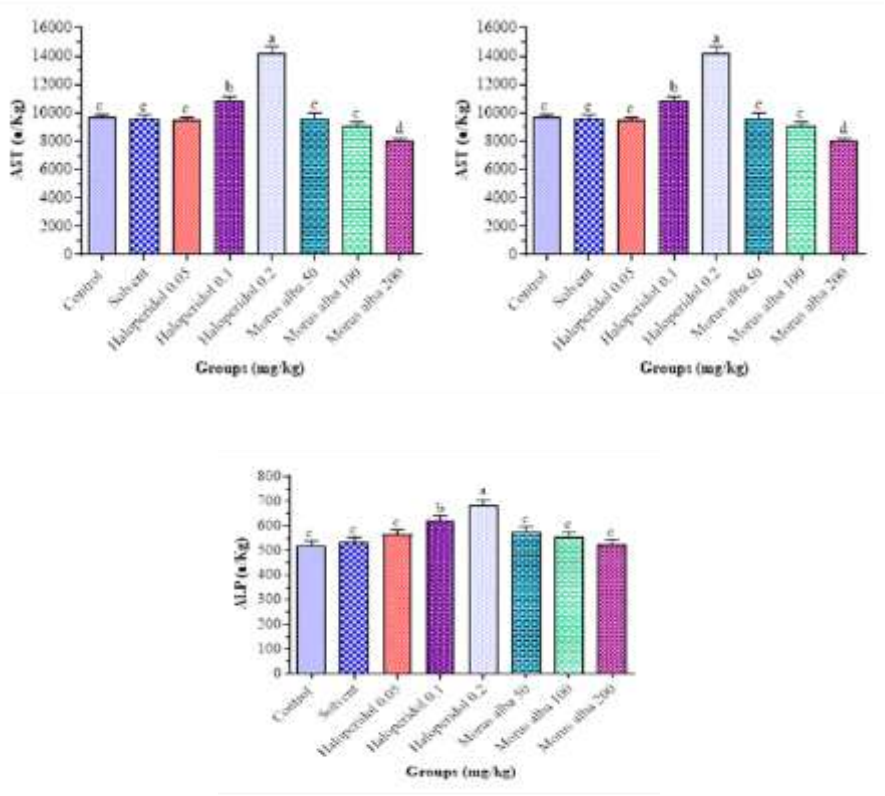
آنزیم‌های کبدی: نتایج نشان داد که بین گروه شاهد و کنترل حلال، اختلاف معناداری از نظر سطوح آنزیم‌های کبدی وجود نداشت (P<۰/۰۵). آنزیم ALT در گروه‌های تحت تیمار با هر سه دوز هالوپریدول و دوز کم و متوسط عصاره توت، در مقایسه با گروه‌های کنترل، اختلاف معنی‌دار نشان داد (P>۰/۰۵). آنزیم AST، در گروه‌های تیماری با دوزهای متوسط و زیاد هالوپریدول و دوز زیاد عصاره توت، نسبت به گروه‌های کنترل، تغییر معنی‌دار نشان داد (P>۰/۰۵). سطح آنزیم ALP نیز، تنها در گروه‌های تیمار شده با دوز بالای هالوپریدول و دوز کم عصاره توت، بصورت معنی‌داری تغییر کرد (P>۰/۰۵) و در سایر گروه‌ها نسبت به گروه‌های کنترل، تفاوتی را نشان نداد (P<۰/۰۵).

بررسی بافت کبد با میکروسکوپ نوری: مطالعه بافت کبد با میکروسکوپ نوری نشان داد که در گروه شاهد و کنترل حلال، هپاتوسیت‌ها دارای هسته مرکزی و سیتوپلاسم مشخص بودند. سینوزوئیدهای کبدی نیز به شکل طبیعی مابین سلول‌های کبدی قرارگرفته بودند. سلول‌های کوپفر با پراکندگی معمول، مشاهده شد و واکوئل چربی وجود نداشت (شکل ۲، A و B). در گروه تیماری با دوز کم هالوپریدول، بافت کبد همانند گروه‌های کنترل و با همان پراکنش سلولی مشاهده شد (شکل ۲، C) اما در گروه‌های تحت تیمار با دوز متوسط و زیاد هالوپریدول، ساختار و انسجام بافت کبد برهم خورد و

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۷-۲۸۸
DOI: 10.22034/JAR.2023.2307

اتساع سینوزوئیدها، گسستگی بین هپاتوسیت‌ها و افزایش تعداد واکوئل‌های چربی و سلول‌های کوپفر، رویت شد (شکل ۲، D و E). در گروه تیماری با دوز کم عصاره توت، هپاتوسیت‌ها همانند گروه‌های کنترل به نظر می‌رسید و تنها شمار اندکی از واکوئل‌های چربی، مشاهده گردید (شکل ۲، F). با افزایش دوز این عصاره، ساختار هپاتوسیت‌ها حفظ شد و تصاویر بدست‌آمده، هیچگونه آسیب را به بافت کبد، نشان نداد (شکل۲، G و H).

بررسی بافت کبد با میکروسکوپ الکترونی: بررسی دقیق‌تر بافت کبد با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که در گروه شاهد (شکل۳، A)، هپاتوسیت‌ها، واجد هسته گرد و غشای پیوسته بودند و در سیتوپلاسم آن‌ها، اندامک‌های متعدد سلولی به چشم خورد. میتوکندری‌ها، ماتریکس همگن داشتند و در اطراف هسته، شبکه آندوپلاسمی وسیع و جسم گلژی دیده شد. در گروه تیمار شده با هالوپریدول دوز بالا (شکل۳، B)، در وسط شکل، هسته هپاتوسیت، نامشخص بود و غشاء و شبکه آندوپلاسمی کاملاً از بین رفته بود. اندامک‌ها و فضاهای داخل سلولی تخریب و واکوئل‌های چربی جایگزین شده بود. غشای سلول‌های کبدی که تحت تأثیر عصاره برگ توت قرار داشت (شکل۳، C)، سالم بود و در اطراف هسته، اندامک‌های درون‌سلولی شامل شبکه آندوپلاسمی، میتوکندری و شبکه گلژی نیز مشاهده گردید.

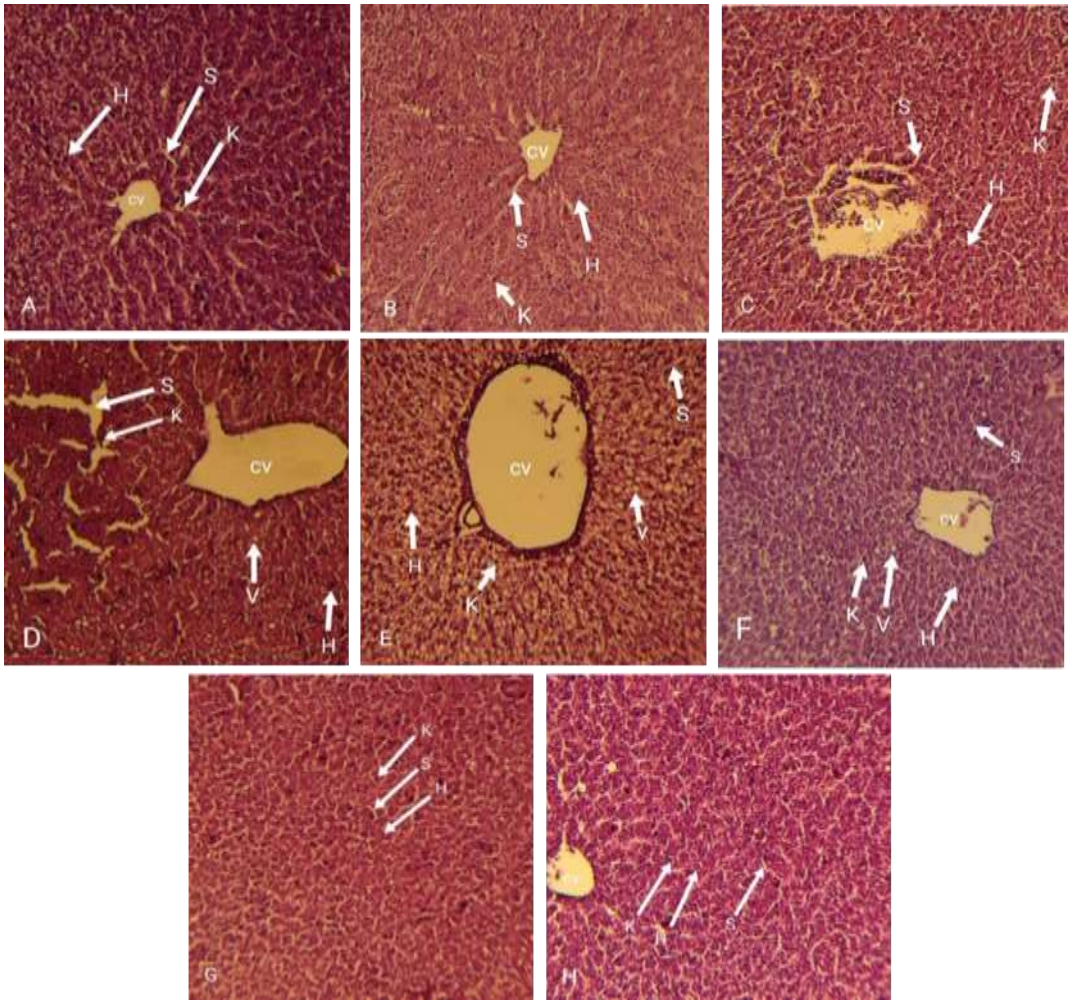


شکل ۱_ نمودار سطح آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP ،گروه کنترل دست نخورده (شاهد)، Solvent نشان دهنده گروه کنترل حلال(اتانول ۷۰ درجه)، Haloperidol نشان دهنده داروی هالوپریدول است که با سه دوز ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲میلی‌گرم بر کیلوگرم، تزریق شده است، *Morus alba* نشان‌دهنده عصاره برگ توت سفید است که با سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم، تزریق شده است. حروف مشابه در نمودارها به معنی عدم وجود اختلاف در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ است.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۷-۲۸۸
DOI: 10.22034/JAR.2023.2307

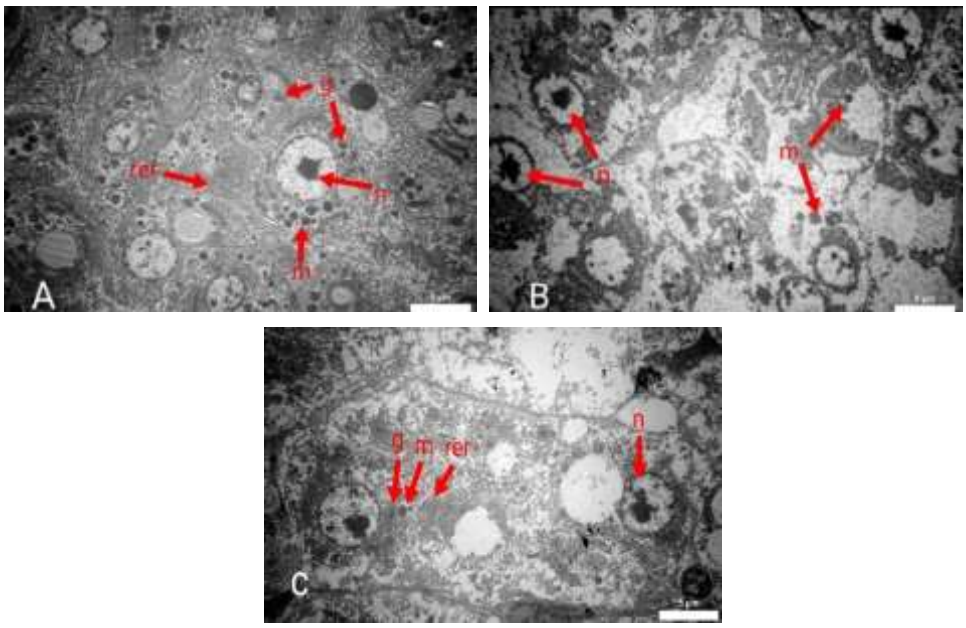
بحث و نتیجه گیری

کبد، یکی از اندام‌های حیاتی است و وظایف گوناگونی بر عهده دارد که سمیت‌زدایی داروها و حفظ هموستاز متابولیک بدن، از جمله مهم‌ترین آن‌ها است (۴و ۶). عواملی مانند داروها ، استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد می‌توانند عملکرد طبیعی کبد را دچار اختلال کنند (۱۸). بسیاری از مطالعات نشان داده است که مصرف داروهای آنتی‌سایکوتیک با ایجاد عوارض جانبی بر روی کبد و القای آنزیم‌های کبدی مرتبط است (۱۹). آزمون‌های مختلفی جهت ارزیابی کارکرد کبد وجود دارد که در یکی از آن‌ها، میزان آنزیم‌های کبدی، سنجش می‌شود. تغییرات این آنزیم‌ها، نمایانگر سلامت غشای هپاتوسیت‌ها یا نکروز آن‌ها است. ALT، AST و ALP، سه آنزیم مهم کبدی هستند. ALT، آنزیمی در سیتوزول هپاتوسیت‌ها است. این آنزیم در کبد نسبت به سایر بافت‌ها، غلظت بیشتری دارد. میزان این آنزیم هم‌راستا با هرگونه آسیب به سلول‌های کبدی، افزایش پیدا می‌کند و نیمه‌عمر آن از چند ساعت تا چندین روز، متغیر است.



شکل ۲_ مقاطع بافت کبد. A) گروه کنترل دست نخورده(شاهد)، B) گروه کنترل حلال، C) گروه تیماری با هالوپریدول با دوز ۰/۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، D) گروه تیماری با هالوپریدول با دوز ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم E) گروه تیماری با هالوپریدول با دوز ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم F) گروه تیماری با عصاره توت با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم G) گروه تیماری با عصاره توت با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم H) گروه تیماری با عصاره توت با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، H: هپاتوسیت، S: سینوزوئید، CV: ورید مرکزی، K: سلول‌های کوپفر ، V: واکوئل چربی، رنگ‌آمیزی H&E،رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی ۴۰×

DOI: 10.22034/JAR.2023.2307 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۷-۲۸۸



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی از مقطع بافت کبد. A)گروه کنترل دست‌نخورده (شاهد) B) تیمار هالوپریدول با دوز ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی، C)تیمار عصاره توت با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی،SCALE BAR: 5µm، در این تصاویر، هسته هپاتوسیت(n)، میتوکندری(m)، دستگاه گلژی(g) و شبکه اندوپلاسمی(rer) مشخص شده‌اند.

مقدار AST به سرعت همراه با آسیب غشای سلول‌های کبدی افزایش پیدا می‌کند. افزایش AST به معنی تغییرات نفوذپذیری غشای هپاتوسیت‌ها، نکروز سلولی و یا التهاب کبدی است. نیمه‌عمر این آنزیم، از چند دقیقه تا چند ساعت است.. ALT و AST معمولاً برای تشخیص صدمات کبدی اندازه‌گیری می‌شوند. ALP، بجز کبد، در استخوان، روده باریک، کلیه و جفت هم وجود دارد. نیمه‌عمر این آنزیم، ۷۰ ساعت است. التهاب و نکروز سلول‌های کبد سبب افزایش ALP می‌شوند (۱۱ و۱۷). تماس با سموم، میزان آنزیم‌های ALT و AST را در سرم خون به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. سمیت کبدی به معنای آسیب کبدی ناشی از مواد شیمیایی مانند داروها می‌باشد (۲۴). روی هم رفته، تغییرات آنزیم‌های کبدی، شاخص میزان تخریب ترکیباتی است که سمیت کبدی دارند (۵). اتانول ۷۰ درصد، سطوح هیچ‌یک از آنزیم‌های کبدی را دستخوش تغییر نکرد (شکل ۱، A، B و C) بنابراین می‌توان گفت که حلال دارو و عصاره، بر روند آزمایش بی‌تأثیر بود. نمودارALT، هماهنگ با افزایش دوز هالوپریدول، سیر صعودی را نسبت به گروه‌های کنترل نشان داد به طوریکه در دوز بالای هالوپریدول بیشترین میزان آنزیم ALT مشاهده شد (شکل ۱، A). دوز پایین هالوپریدول، میزان آنزیم‌های AST و ALP را تغییر نداد، اما افزایش دوز آن، مقادیر این دو آنزیم را بالا برد (شکل ۱، B و C). هم‌راستا با این نتایج، در مطالعه کادهم در سال ۲۰۲۱، تجویز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم هالوپریدول به موش، باعث افزایش قابل توجه سطح سرمی ALT، ASTو ALP شد (۲۰). مطالعه بالینی گیرتنر و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان داد که آنزیم‌های کبدی ALT وAST در دو درصد بیماران بستری در بیمارستان در طول درمان با هالوپریدول افزایش یافت (۱۶). می توان چنین استنباط کرد که احتمالاً، هالوپریدول، سبب آسیب به غشای هپاتوسیت‌ها و نشت آنزیم‌های کبدی به مایع میان‌بافتی شده است. آنزیم ALT پس از تزریق دوزهای کم و متوسط عصاره توت، افزایش یافت اما دوز زیاد عصاره، تغییری بر آن ایجاد نکرد شد (شکل

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۷-۲۸۸
DOI: 10.22034/JAR.2023.2307

۱، A). همچنین دوزهای کم و متوسط عصاره، تأثیری بر آنزیم AST نشان نداد اما دوز زیاد عصاره، سبب افت مقادیر AST شد (شکل ۱، B). این داده‌ها می‌تواند حاکی از آن باشد که عصاره توت در رنج دوزهای خاصی، اثر حمایتی از بافت کبد، دارد. بعلاوه، هیچ یک از دوزهای عصاره توت، سطح آنزیم ALP را تغییر نداد (شکل ۱، C). در تأیید این نتایج، کلانتری و همکاران در سال ۲۰۰۹ با تزریق عصاره هیدروالکلی برگ توت سفید با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌هایی که از قبل به‌وسیله کربن‌تتراکلرید دچار آسیب کبدی شده بودند، کاهشALT و AST را گزارش کردند. بعلاوه عصاره توت، آثار محافظتی از کبد را نشان داد و هیچ اثری از فیبروز و التهاب در کبد گروه‌های تیماری با عصاره، مشاهده نشد (۲۱) متقابلاً در پژوهشی دیگر از زنی و همکاران در سال ۲۰۰۸، تجویز خوراکی ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره آبی برگ درخت توت سفید به موش‌های هایپرلیپیدمیک، منجر به کاهش ALT و افزایش AST پلاسما شد (۳۷). نظری و همکاران در سال ۲۰۱۴ به این نتیجه رسیدند که عصاره برگ توت سفید به طور قابل توجهی سطح سرمی آنزیم‌های کبدی AST،ALT، ALP را در موش‌های دیابتی کاهش می‌دهد (۲۳). در مطالعه‌ی داولیوری و همکاران درسال ۲۰۱۵، تجویز خوراکی ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره اتانولی برگ درخت توت سفید، تغییر معنی‌داری بر میزان AST،ALT،ALP ایجاد نکرد اما ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از همین عصاره، آنزیم ALT را کاهش داد. آنها همچنین سمیت ناچیزی را برای عصاره توت گزارش کردند زیرا در مطالعه آنها هیچ مرگ و میری در دوز ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیده نشد (۱۳). در مطالعه‌ی حاضر ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره، دوز موثر برای نشان دادن اثرات حفاظت از کبد می‌باشد زیرا سطح آنزیم ALP و ALT هیچ اختلافی را با گروه شاهد نشان نداد و حتی سطح آنزیم AST را نسبت به گروه شاهد کاهش داد. کبد ماهی نسبت به محرک‌های شیمیایی حساس است چون جریان خون در کبد ماهیان به نسبت کند بوده و دفع سموم شیمیایی و متابولیک‌ها تدریجی می‌باشد (۲). به‌طور کلی در مسمومیت‌ها ممکن است تمامی کبد ماهی یا برخی نواحی آن دچار آسیب شود، اندازه سلول‌های کبدی تغییر کند، زمینه سلولی غیرقابل تشخیص شود و تمایل سیتوپلاسم به ائوزین کاهش یابد. اگر تعداد سلول‌های آسیب دیده زیاد باشد، ممکن است تغییرات دژنراتیو در بافت رخ دهد. کبد چرب معمولاً به ضایعات پاتولوژیکی گفته می شود که در آن‌ها، تعداد زیادی از سلول‌ها دچار دژنرسانس شده و حاوی چربی زیادی می‌شوند (۱). حلال دارو و عصاره توت، تغییری بر بافت کبد ایجاد نکرد زیرا هپاتوسیت‌ها همانند گروه شاهد، نمای طبیعی نشان دادند (شکل ۲، B). در گروه‌های تحت تیمار با هالوپریدول، مشخصا، بافت کبد دچار آسیب شده بود (شکل ۲، D و E). آندریازا و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که هالوپریدول در کبد رت استرس اکسیداتیو القا کرد و پراکسیداسیون لیپیدی در کبد را افزایش داد (۹) بنابراین می‌توان گفت که احتمالاً هالوپریدول با القای استرس اکسیداتیو منجر به آسیب به هپاتوسیت‌ها، اندامک‌های داخل سلولی، از بین رفتن یکپارچگی غشای هپاتوسیت‌ها و آسیب به بافت کبد شد (شکل ۲، D و E). دوز کم و متوسط عصاره توت گرچه تا حدی آنزیم ALT را بالا برد اما مقادیر سایر آنزیم‌های کبدی، بی‌تغییر یا کمتر از گروه‌های کنترل بود (شکل ۱). بعلاوه عصاره توت، نتوانست تغییر قابل توجهی بر مورفولوژی سلول‌ها بگذارد زیرا ساختار طبیعی هپاتوسیت‌ها با هسته‌های واضح و غشای یکپارچه و سینوزوئیدهایی با ظاهر طبیعی و تعداد اندکی واکوئل چربی مشاهده شد (شکل ۲، F، G و H). چنین به نظر می‌رسد که عصاره توت سفید، هپاتوپروتکتیو باشد. سیما چاهان و همکاران در سال ۲۰۱۹ با روش آنالیز HPLC عصاره متانولی برگ درخت توت سفید، حضور مورین را به عنوان یکی از اجزا اصلی ثابت کردند (۱۲). مطالعه بنت بن‌آزو و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داد که

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۷-۲۸۸
DOI: 10.22034/JAR.2023.2307

مورین یک فلاونوئید فعال دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد سایکوز می‌باشد (۱۰). بنابراین این احتمال وجود دارد که عصاره برگ توت سفید با خواص آنتی اکسیدانی از کبد محافظت کند و باعث حفظ ساختار کبد شود. بررسی‌های بافت کبد با میکروسکوپ الکترونی مطابق نتایج بدست آمده از میکروسکوپ نوری بود بدین صورت که در گروه شاهد، هپاتوسیت‌ها وضعیت طبیعی و معمول داشتند، تیمار هالوپریدول (شکل ۳، B)، آسیب گسترده کبدی، اتساع سینوزوئیدها، افزایش تعداد سلول‌های کوپفر به دلیل التهاب، از بین رفتن غشای هپاتوسیت‌ها و اندامک‌های داخل سلولی و کبد چرب را نشان داد، اما در گروه تیماری با عصاره برگ توت سفید (شکل ۳، C)، آسیب کبدی مشاهده نشد بلکه هپاتوسیت‌ها در کنار سینوزوئیدها در آرایشی منظم قرار گرفتند، اندامک‌های سلولی نسبتاً واضح مشاهده شدند و اثرات تخریبی نسبت به تیمار هالوپریدول مشاهده نشد و هپاتوسیت‌ها بدون آسیب بودند. تنها ضایعه، رسوب قطرات چربی در زمینه سلولی بود. با توجه به داده‌های حاصل از آنالیز نمودار آنزیم‌های کبدی و استناد به شواهد بدست آمده به کمک میکروسکوپ نوری و الکترونی از بافت کبد، به این نتیجه رسیدیم که هالوپریدول به صورت وابسته به دوز و خصوصاً در دوزهای متوسط و بالا، توانست موجب آسیب به بافت کبد، افزایش آنزیم‌های کبدی و تخریب هپاتوسیت‌ها در سطح سلولی شود اما دوز بالای عصاره برگ توت سفید، احتمالاً به علت افزایش غلظت فلاونوئیدها، اثر حفاظتی و آنتی اکسیدانی بروز داد و اثرات سمی بالقوه موجود در عصاره را متعادل کرد. هالوپریدول و عصاره برگ توت سفید اگرچه از منظر اثرات آنتی دوپامینرژیکی، متشابه‌اند اما یقینا نمی‌توان یک عصاره گیاهی را جایگزین دارویی شیمیایی تصور کرد که در امر دارودرمانی و بالین، جایگاه ارزشمندی دارد. تنها می‌توان امیدوار بود نظر به عوارض کبدی کمتر عصاره برگ توت، با پژوهش‌های تکمیلی در آینده، بتوان از این عصاره به‌عنوان درمان مکمل، خصوصا در بیماری‌های روانی مزمن، بهره‌گیری کرد.

سپاسگزاری

این پژوهش با همکاری آزمایشگاه علوم پایه دانشکده داروسازی واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی انجام گرفته است. بدین‌وسیله از تمامی همکاران این مرکز که در انجام این پژوهش همکاری کرده‌اند تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

۱. تاکاشیما، فومیو.، ۱۳۷۸. اطلس بافت‌شناسی ماهی، موسسه چاپ و انتشارات دانشگاه تهران، ۳۶۴ صفحه.

۲. خدادادی، الف.، عرب زاده، پ.، رسولی، س.، مرادپور، ع.، و عابدیان امیری، الف.،۱۳۹۳. بررسی علل تلفات ماهیان قزل آلای رنگین کمان پرورشی مزارع Cage Culture (پرورش در قفس) سد حسنلو استان آذربایجان غربی، مجله آسیب شناسی درمانگاهی دامپزشکی(دامپزشکی تبریز)، (۸)۲، صفحات ۴۶۱-۴۷۲.

۳. برترام جی، کاتزونگ.، ۲۰۲۱. فارماکولوژی پایه و بالینی. انتشارات تیمورزاده، ۱۵۵۶ صفحه.

۴. کومار عباس، استر.، ۱۳۹۸. آسیب شناسی پایه رابینز، انتشارات حیدری، ۸۷۲ صفحه.

۵. مازندرانی، م.، ناجی، ط.، حسین زاده، ه.، و الماسی راد، ع.، ۲۰۲۱. بررسی اثر هیستولوژیک ترکیب ضد درد و التهاب متیل سولفانیل بنزیلیدین تیازولوتریازول بر تغییرات آنزیم‌های کبدی و ساختار فراسلولی کبد ماهی گورامی سه‌خال(Trichogaster trichopterus)، نشریه توسعه آبزی پروری، (۱۵)۳، صفحات ۸۷-۷۷

۶. جانای، هال.، ۱۳۹۴. فیزیولوژی پزشکی گایتون و هال. انتشارات بشری، ۱۳۵۲ صفحه.

7. Ahlenius, S., Engel, J., and Zöller, M., 1977. Effects of apomorphine and haloperidol on exploratory behavior and latent learning in mice. Physiological Psychology, 5, PP: 290-294.

8. Alexander, G.C., Gallagher, S.A., Mascola, A.,

DOI: 10.22034/JAR.2023.2307 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۷-۲۸۸

Moloney, R.M., and Stafford, R.S., 2011. Increasing off-label use of antipsychotic medications in the United States, 1995–2008. Pharmacoepidemiology and drug safety, 20(2), PP: 177-184.

9. Andreazza, A.C., Barakauskas, V.E., Fazeli, S., Feresten, A., Shao, L.I., Wei, V., and Beasley, C.L., 2015. Effects of haloperidol and clozapine administration on oxidative stress in rat brain, liver and serum, Neuroscience letters, 591, PP: 36-40.

10. Ben-Azu, B., Aderibigbe, A.O., Omogbiya, I.A., Ajayi, A.M., Owoeye, O., Olonode, E.T., and Iwalewa, E.O., 2018. Probable mechanisms involved in the antipsychotic-like activity of morin in mice. Biomedicine & Pharmacotherapy, 105, PP: 1079-1090.

11. Center, S.A., Interpretation of liver enzymes, 2007. Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice, 37(2), PP: 297-333.

12. Chauhan, S., Devi, U., Kumar, V.R., Kumar, V., Anwar, F., and Kaithwas, G., 2015. Dual inhibition of arachidonic acid pathway by mulberry leaf extract, Inflammopharmacology, 23(1), PP: 65-70.

13. De Oliveira, A.M., Mesquita, M.D.S., da Silva, G.C., de Oliveira Lima, E., de Medeiros, P.L., Paiva, P.M.G.,. and Napoleão, T.H., 2015. Evaluation of toxicity and antimicrobial activity of an ethanolic extract from leaves of *Morus alba* L. (Moraceae). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 513978, 2015 p.

14. Dubey, V., Shah, K.W., and Raghuwanshi, R.K., 2020. Comprehensive Notes on Phytochemical and Pharmacological Activity of *Morus alba*. Pharmaceutical and Biosciences Journal, 5, PP: 01-06.

15. Forsman, A., and Ohman, R., 1976. Pharmacokinetic studies on haloperidol in man, Current Therapeutic Research, 20(3), PP: 319–336.

16. Gaertner, I., Altendorf, K., Batra, A., and Gaertner, H.J., 2001. Relevance of liver enzyme elevations with four different neuroleptics: a retrospective review of 7,263 treatment courses. Journal of clinical psychopharmacology, 21(2), PP: 215-222.

17. Gowda, S., Desai, P.B., Hull, V.V., Avinash, A.K ., Vernekar, S.N., and Kulkarni, S.S., 2009. A review on laboratory liver function tests. The Pan african medical Journal, 3p.

18. Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A., 2010. General review on in vitro hepatocyte models and their applications. Hepatocytes, PP: 1-40.

19. Halici, Z., Dursun, H., Keles, O.N., Odaci, E., Suleyman, H., Aydin, N., and Unal, B., 2009. Effect of chronic treatment of haloperidol on the rat liver: a stereological and histopathological study. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 379(3), PP: 253-261.

20. Kadhem, W.M., 2021. Protective role of Pomegranate juice Against Hepatotoxicity and Nephrotoxicity Induced by Haloperidol Drug in Male White Rats. Annals of the Romanian Society for Cell Biology, 25 (4), PP: 8231-5.

21. Kalantari, H., Aghel, N., and Bayati, M., 2009. Hepatoprotective effect of *Morus alba L.* in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. Saudi pharmaceutical Journal, 17(1), PP: 90-94.

22. Laddha, G., and Vidyasagar, G., 2012. Anti-psychotic effect of aqueous leaves extract of *Morus alba* in animal models. Int J Pharm, 2(3), PP: 513-519.

23. Nazari, M., Hajizadeh, M.R., Eftekhar, A., Fattahpour, S., Ziaaddini, H., Hassanshahi, G., and Rezaeian, M., 2014. Comparative regulatory effects of *Morus alba* leaf extracts on hepatic enzymes in streptozotocin-induced diabetic and non-diabetic rats. Med Chem, S, 1, PP: 2161-0444.

24. Pandit, A., Sachdeva, T., Bafna, P., 2012. Drug-induced hepatotoxicity: a review. Journal of applied pharmaceutical science,02 (05), PP: 233-243.

25. Pardo, M., López-Cruz, L., Valverde, O., Ledent, C., Baqi, Y., Müller, C.E., and Correa, M., 2013. Effect of subtype-selective adenosine receptor antagonists on basal or haloperidol-regulated striatal function: Studies of exploratory locomotion and c-Fos immunoreactivity in outbred and A2AR KO mice. Behavioural Brain Research, 247, PP: 217-226.

26. Rayam, S., Kudagi, B.L., Buchineni, M., Pathapati, R.M., and Immidisetty, M.R., 2019. Assessment of Morus alba (mulberry) leaves extract for anti-psychotic effect in rats, Int. Journal Basic Clin. Pharmacol, 8(9), PP: 2130-2133.

27. Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, The Journal of cell biology, 17(1), 208 p.

28. Sattari, A., Mirzargar, S.S., Abrishamifar, A., Lourakzadegan, R., Bahonar, A., Mousavi, H.E., and Niasari, A., 2009. Comparison of electroanesthesia with chemical anesthesia (MS222 and clove oil) in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* using plasma cortisol and glucose responses as physiological stress indicators. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 4(6), PP: 306-313.

29. Subrahmanyam, C.V.S., and Suresh, S., 1999. Solubility behaviour of haloperidol in individual solvents determination of partial solubility parameters. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 47(3), PP: 289-294.

30. Tyler, M.W., Zaldivar-Diez, J., and Haggarty, S.J., 2017. Classics in chemical neuroscience: haloperido, ACS chemical neuroscience, 8(3), PP: 444-453.

31. Valacchi, G., Belmonte, G., Miracco, C., Eo, H., and Lim, Y., 2014. Effect of combined mulberry leaf and

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۹۷-۲۸۸ DOI: 10.22034/JAR.2023.2307

fruit extract on liver and skin cholesterol transporters in high fat diet-induced obese mice. Nutrition research and practice, 8(1), PP: 20-26.

32. Wolf, J.C., and Wolfe, M.J., 2005. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. Toxicologic pathology, 33(1), PP: 75-85.

33. Yadav, A.V., Kawale, L.A., and Nade, V.S., 2008. Antidopaminergic effect of methanolic extract of *Morus alba Linn* leaves. Pharmacology Journal 1, PP: 218-232.

34. Yadav, A.V., and Nade, V.S., 2008. Anti-dopaminergic effect of the methanolic extract of *Morus alba L.* leaves. Indian Journal of pharmacology, 40(5), 221 p.

35. Younus, I., Fatima, A., Ali, S.M., Usmani, S., Begum, Z., Badar, S., and Asghar, R., 2016. A review of ethnobotany, phytochemistry, antiviral and cytotoxic/anticancer potential of *Morus alba linn*. Int. Journal Adv. Res. Rev, 1(2), PP: 84-96.

36, Zafar, M.S., Muhammad, F., Javed, I., Akhtar, M., Khaliq, T., Aslam, B., and Zafar, H., 2013. White mulberry *(Morus alba)*: A brief phytochemical and pharmacological evaluations account. International journal of agriculture and biology, 15(3), PP: 612-620.

37. Zeni, A.L.B., and Dall'Molin, M., 2010. Hypotriglyceridemic effect of *Morus alba L.*, Moraceae, leaves in hyperlipidemic rats. Revista Brasileira de Farmacognosia, 20, PP: 130-133.

Comparison of the effect of Haloperidol and *Morus alba* leaf extract on liver tissue and hepatic enzymes in *Trichogaster trichopterus*

Naji T.[1], Biniaz M.[1], Mohammadi Motamed S.[2] and Sheybani Y.[1]

[1] Dept. of Basic Science, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Haloperidol is a dopamine receptor antagonist and is used in the treatment of mental illnesses. *Morus alba* is a plant belonging to the Moracea family. *Morus alba* leaves have antidopaminergic effects like haloperidol. The purpose of this research is to compare the effect of *Morus alba* leaves extract and haloperidol as two antidopaminergic substances on the level of hepatic enzymes and liver tissue in adult female three spot gourami fish. For this purpose, the number of 120 pieces of fish in 8 groups including intact control group, solvent control, treatments receiving doses of 0.05, 0.1 and 0.2 mg/kg of haloperidol, and doses of 50, 100 and 200 mg/kg of ethanol extract of *Morus alba* leaves, they were divided. Medicines were administered intramuscularly every other day for a period of twenty days. After finishing the injections, liver enzymes and liver tissue were studied in all groups. The statistical results showed that There was a significant difference between the level of liver enzymes in the control and treated groups ($P < 0.05$) in such a way that by increasing the dose, haloperidol increased liver enzymes and damage to liver cells, while the extract of *Morus alba* leaves, led to the reduction of liver enzymes and protection of liver cells. Therefore, haloperidol can cause hepatotoxicity, but *Morus alba* extract is probably hepatoprotective.

Key words: Halperidol, *Morus alba*, liver, *Trichogaster trichopterus*