

بررسی اثرات ترنجبین بر بیلیروبین خون در موش‌های مبتلا به هیپر بیلیروبینمی تجربی

احمد رضا بندگی* (M.Sc)

دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

خلاصه

سابقه و هدف: از زمان‌های قدیم، گیاهان دارویی کاربرد فراوانی در طب سنتی ایران داشته‌اند و در حاضر نیز ترنجبین که صمغ گیاه خارشتر می‌باشد به عنوان یک داروی گیاهی جهت درمان زردی نوزادان استفاده می‌شود. در این مطالعه، اثرات ترنجبین بر بیلیروبین خون در موش‌های مبتلا به هیپر بیلیروبینمی بررسی شد. مواد و روش‌ها: نوزادان موش سفید آزمایشگاهی از نژاد ویستار با وزن ۲۱-۱۹ گرم در این مطالعه استفاده در شدند. موش‌ها با تزریق داخل صفاقی دلتا-آمینولولولینیک اسید (Delta amino levulinic acid, ALA) یک دوره زمانی خاص بعد از تولد، مبتلا به هیپر بیلیروبینمی شده و به ۳ گروه تقسیم شدند و ترنجبین با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد توسط لوله دهانی - حلقی در چند مرتبه به آنها خوراندند. سپس در ساعات مختلف با خونگیری و اندازه‌گیری بیلیروبین توتال، منحنی تغییرات بیلیروبین تا ۷۲ ساعت بعد از اولین تزریق ALA رسم گردید. یک گروه هم به عنوان شاهد منفی (موش‌های سالم) انتخاب شد. یافته‌ها: نتایج نشان داد که پس از تزریق ALA، غلظت بیلیروبین پلاسما به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) افزایش یافت. تجویز خوراکی ترنجبین، بیلیروبین موش‌های یرقانی را نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0/05$). نتیجه‌گیری: ترنجبین می‌تواند به عنوان یک داروی کاهش دهنده بیلیروبین پلاسما مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: یرقان فیزیولوژیک، بیلیروبین، ترنجبین، داروهای گیاهی

مقدمه

۵mg/dl در اولین روز تولد یا ۱۲-۱۰ mg/dl در روزهای بعدی پاتولوژیک است [۶]. در نوزادان رسیده هرچه میزان بیلیروبین سرم از حد ۲۰mg/dl بیشتر شود، خطر کرنیکتروسس بیشتر می‌گردد. در هنگام نارس بودن نوزاد، حتی بیلیروبین کمتر از ۲۰mg/dl نیز ممکن است باعث کرنیکتروسس شود [۵]. کرنیکتروسس یا انسفالوپاتی بیلیروبین حالتی است که به علت اثر سمی بیلیروبین بر عصب‌های قاعده‌ای مغز و هسته‌های ساقه

یرقان، زرد شدن پوست و ملتحمه به علت رسوب بیلیروبین است که در هنگام افزایش غلظت بیلیروبین در خون ایجاد می‌شود [۱۰، ۱۱]. یرقان یک مشکل شایع در نوزادان است و هر ساله حدود ۷۰-۶۰ درصد شیرخواران متولد شده به طور کلینیکی یرقان می‌گیرند [۱۶]. غلظت بیلیروبین در روزهای ۷-۱ بعد از تولد به بالاترین مقدار می‌رسد. هیپر بیلیروبینمی بیش از

رطوبت و در حدود ۵٪ خاکستر و مابقی خرده‌های گیاهی است [۱]. در طب سنتی، از محلول ترنجبین جهت درمان زردی نوزادان به صورت خوراکی استفاده می‌شود [۱۵]. با توجه به این نکته، هدف از پژوهش حاضر بررسی علمی تأثیر خوراکی محلول ترنجبین بر کاهش بیلی‌روبین در نوزادان موش سفید آزمایشگاهی مبتلا به هیپربیلی‌روبینمی تجربی است. بدیهی است که نتایج مثبت حاصل از این مطالعه با توجه به عوارض جانبی کم داروهای گیاهی می‌تواند در مورد انسان نیز سودمند باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات. این مطالعه مداخله‌ای - تجربی روی نوزادان موش سفید آزمایشگاهی نژاد ویستار ۱۰ روزه با وزن ۲۱-۱۹ گرم انجام گرفت. نوزادان به همراه والدشان در قفس جداگانه در حیوان‌خانه دانشکده پزشکی سمنان با درجه حرارت ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد و نور طبیعی نگهداری می‌شدند.

روش تهیه محلول ترنجبین. ترنجبین را در آب حل نموده و پس از گذر از صافی در پژوهش مورد استفاده قرار دادیم. برای تعیین غلظت ترنجبین در محلول، ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه شده، در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کاملاً خشک شود، ماده خشک شده را وزن کرده که غلظت آن در محلول‌هایی که با غلظت‌های متفاوت تهیه گردیده بود ۱۰، ۲۰، ۳۰ (گرم بر دسی‌لیتر) بود. از محلول‌های فوق در حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتری در ساعات مختلف با توجه به گروه آزمایشی به موش‌ها خوراندند.

روش ایجاد هیپربیلی‌روبینمی. یک مدل آزمایشگاهی هیپربیلی‌روبینمی بعد از تولد در موش‌ها، تجویز ALA به عنوان پیش‌ساز هم (Heme) برای ایجاد یرقان در طی یک دوره زمانی خاص بعد از تولد است. این دوره زمانی بین روزهای ۷ تا ۲۱ بعد از تولد است، چون روز هفتم بعد از تولد زمانی است که تغییرات اولیه بعد از تولد در غلظت بیلی‌روبین سرم و متابولیسم

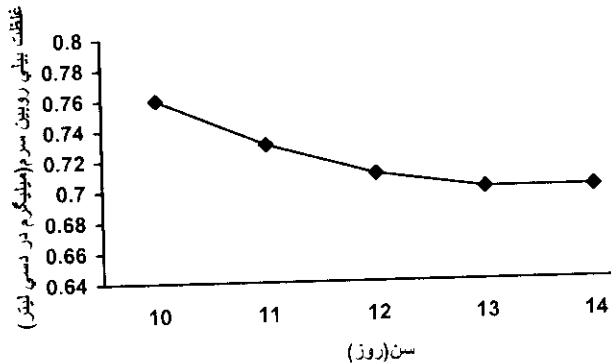
مغز ایجاد می‌شود. در فاز حاد، نوزادان با زردی نسبتاً شدید، دچار ضعف عضلانی، هیپوتونی و ضعف در مکیدن می‌شوند. اگر هیپربیلی‌روبینمی درمان نشود، نوزاد هیپرتونیک می‌شود و شاید باعث تب گردد. نوزادان مبتلا به کرنیکتروس شدید در دوران نوزادی می‌میرند و نوزادانی که زنده می‌مانند در آینده ممکن است دچار کری عصبی، فلج مغزی عقب ماندگی ذهنی شوند [۴، ۱۴].

در حال حاضر، از فتوتراپی جهت درمان یرقان فیزیولوژیک نوزادی استفاده می‌شود که طی آن پیوندهای هیدروژنی داخل مولکولی بیلی‌روبین شکسته شده و به ایزومرهای غیرسمی پایدار تبدیل می‌شود [۱۶]. طی سالیان متمادی گیاهان دارویی اساس و حتی در برخی موارد تنها طریق درمان محسوب می‌شد و در همین حال مواد اولیه موجود در آنها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گرفت. امروزه گرایش مجددی به مصرف گیاهان دارویی به خاطر کم بودن عوارض سوء جانبی، گوناگونی ترکیبات مؤثر موجود در گیاهان، توسعه صنایع وابسته به کشت گیاهان دارویی، جلوگیری از خروج ارز به خارج از کشور، ایجاد کار مفید و خصوصاً پیشنهاد استفاده از گیاهان دارویی توسط سازمان جهانی بهداشت (WHO) و بسیاری از دلایل دیگر بوجود آمده است [۲].

ترنجبین رزینی است که به صورت شبنم بر روی شاخه و برگ‌های خارشتر (Camel's thorn) از خانواده پروانه آسا ظاهر می‌گردد. خارشتر گیاهی است چند ساله با ریشه چوبی ضخیم، ساقه خاردار و پرانشعاب و دارای برگ‌های ساده و کوچک می‌باشد، که در مناطق خشک و بیابانی نواحی مختلف ایران می‌روید. برای جمع‌آوری ترنجبین، ساقه‌های خشک گیاه را که حاوی قطرات خشک شده ترنجبین است تکان داده و محصول حاصله را به بازار عرضه می‌کنند. ترنجبین به صورت قطعات بسیار کوچک، محلول در آب با طعم شیرین و مطبوع می‌باشد و حاوی ۷/۴۷ درصد ملزیتوز، ۴۴/۲۶ درصد ساکارز، ۵/۱۱ درصد قند احیاکننده فروکتوز، ۵/۱

پلازما (به عنوان شاهد منفی)

جهت آزمایش از موش‌های ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ روزه (از هر گروه سنی ۱۰ سر) استفاده شد که نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است و اختلاف معنی داری در غلظت بیلی روبین بین روزهای دهم و سیزدهم مشاهده نشد ($P < 0/05$).



شکل ۱. منحنی تغییرات طبیعی غلظت بیلی روبین پلازما در موش‌های ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ روزه ($n=10$ در هر گروه سنی).

آزمایش ۲. اثر ALA بر غلظت بیلی روبین پلازما (شاهد مثبت یرقانی)

۸۰ میکرومول ALA در هر یک از ساعات ۰، ۴ و ۸ تزریق گردید و جهت اندازه‌گیری بیلی روبین، در ساعات ۰، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ نمونه‌گیری به عمل آمد. همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود، بعد از تزریق ALA، غلظت بیلی روبین پلازما افزایش یافت که بیشترین افزایش غلظت بیلی روبین در ساعت ۱۶ بعد از اولین تزریق است که اختلاف، معنی دار بود ($P < 0/05$) و تقریباً در روز دوم به حد طبیعی برگشت.

آزمایش ۳. اثر ترنجبین ۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪ بر غلظت بیلی روبین پلازما

بعد از تزریق ALA (۳×۸۰ میکرومول) در ساعات ۰، ۴ و ۸ موش‌ها به سه گروه تقسیم شدند و به آنها ترنجبین با غلظت‌های ۱۰٪، ۲۰٪ یا ۳۰٪ و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در هر یک از ساعات ۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ خورنده شد و جهت تعیین غلظت بیلی روبین در ساعات ۱۶ و ۲۴ نمونه‌گیری به عمل آمد. نتایج در شکل ۳ نشان

Heme متوقف می‌شود و روز ۲۱ زمانی است که مکانیسم کنژوگه شدن بیلی روبین در کبد جهت دفع در صفر کامل می‌شود. تجویز ALA در این دوره زمانی منجر به افزایش سریع، ثابت و وابسته به دوز قابل توجهی در غلظت بیلی روبین سرم در نوزادان موش‌ها می‌شود و ALA بین روزهای ۷ تا ۱۵ بعد از تولد بیشترین اثر را دارد [۱۳]. در پژوهش حاضر، به دلیل حجم کم خون در موش‌های ۷ روزه، از موش‌های ۱۰ روزه استفاده گردید که ALA (۳۸۰ تا ۱۰۰۰ میکرومول به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن) و با حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتری به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. تعداد تزریق‌ها با توجه به گروه آزمایشی و ساعات مورد نظر تعیین گردیده است.

گروه‌های آزمایشی. موش‌های مبتلا به هیپر بیلی روبینمی به ۳ گروه تقسیم شدند و ترنجبین با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد توسط لوله دهانی - حلقی در چند مرتبه به آنها خورنده شد. یک گروه هم به عنوان شاهد منفی (موش‌های سالم) انتخاب شد.

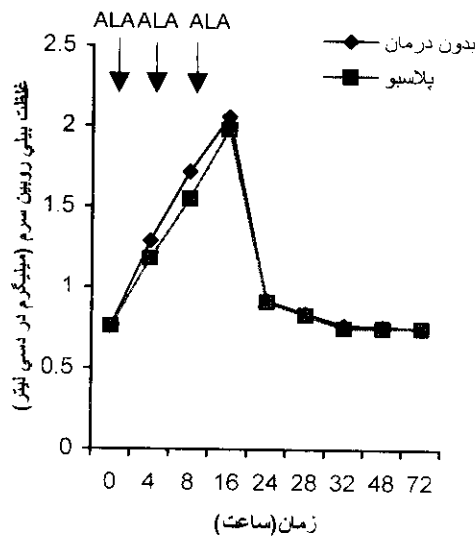
روش خون‌گیری و اندازه‌گیری بیلی روبین. با قطع کردن ورید ژوگولار و با استفاده از لوله‌های همتوکریت هپارینه، خون وریدی جمع‌آوری و سپس توسط میکروسانتریفوژ، پلازما تهیه گردید و تا زمان اندازه‌گیری بیلی روبین در تاریکی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت اندازه‌گیری بیلی روبین توتال از روش Jendrassik and Grof استفاده گردید [۶]. جهت اجتناب از خطا، از نمونه‌های همولیز و لیمیک صرف نظر شد. از کنترل لیوفیلیزه Randox جهت انجام کنترل کیفی استفاده گردید.

آنالیز آماری. نتایج با آزمون آماری آنالیز واریانس و t تست مورد بررسی قرار گرفت و اختلاف $P < 0/05$ بین گروه‌های مورد آزمایش از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شده است.

آزمایش‌ها و نتایج

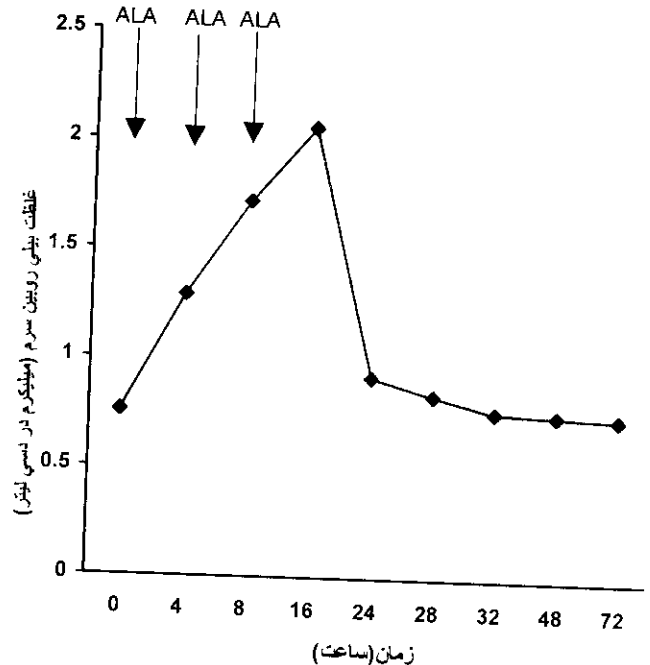
آزمایش ۱. تعیین دامنه طبیعی غلظت بیلی روبین

(شکل ۴) که اختلاف معنی دار نبود.



شکل ۴. غلظت بیلی روبین پلازما در موش‌های دچار هیپر بیلی روبینمی قبل و بعد از درمان با پلاسیبو.

می‌دهد که ترنجبین منجر به کاهش بیلی روبین گردیده است ولی تنها در مورد ترنجبین با غلظت ۳۰٪ اختلاف معنی دار بود ($P < 0.05$).



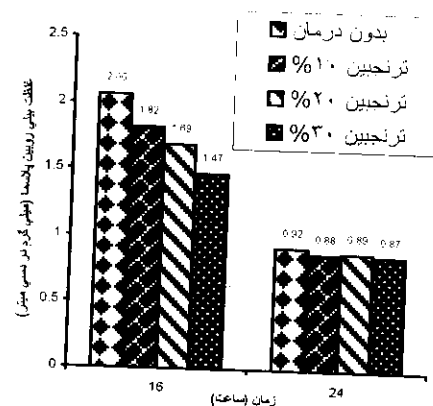
شکل ۲. اثر ALA بر غلظت بیلی روبین پلازما در ساعات ۰، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴، ۲۸، ۳۲، ۴۸ و ۷۲ بعد از نمونه‌گیری. در هر زمان از ۱۰ سر موش ۱۰ روزه نمونه‌گیری به عمل آمد. فلش‌ها زمان‌های تزریق ALA را نشان می‌دهد.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که ترنجبین قادر است غلظت بیلی روبین پلازما را در موش‌های دچار هیپر بیلی روبینمی کاهش دهد.

امروزه استفاده از داروهای گیاهی که دارای سابقه کاربرد دیرینه‌ای در طب سنتی نیز می‌باشند، مورد توجه قرار گرفته است. ترنجبین یکی از همین داروهای گیاهی است که در طب سنتی ایران در درمان یرقان فیزیولوژیک نوزادان استفاده می‌شود. ترنجبین، رزینی است که از گیاه خار شتر (Alhagi camelorum یا Camel's thorn) به دست می‌آید. این گیاه در مناطق بیابانی ایران فراوان است [۱]. گرما یا فعالیت حشرات باعث خروج رزین شده که بعداً سفت و محکم می‌شود، ترنجبین دارای ساکارز بوده و در داروسازی به عنوان شیرین کننده مورد استفاده قرار می‌گیرد، به خوبی در آب حل گردیده و یک مایع شیرین زرد رنگ حاصل می‌شود که برای درمان یرقان فیزیولوژیک نوزادان، روزانه ۲ تا ۳ مرتبه به آنها خورانده می‌شود [۱۵].

در این پژوهش، جهت بررسی علمی اثر ترنجبین بر



شکل ۳. اثر غلظت‌های مختلف ترنجبین بر غلظت بیلی روبین پلازما در موش‌های دچار هیپر بیلی روبینمی (برای توضیح بیشتر به متن مراجعه شود).

آزمایش ۴. اثر پلاسیبو بر غلظت بیلی روبین پلازما مشابه آزمایش ۳ انجام گردید با این تفاوت که به جای ترنجبین از آب مقطر (پلاسیبو) استفاده شد

متابولیسم بیلی روبین در طی دوره نوزادی، گردش روده ای - کبدی است، که طی آن بیلی روبین کنژوگه توسط آنزیم بتا-گلوکورونیداز در شیر مادر و در روده کوچک، دکنژوگه شده و بیلی روبین مجدداً وارد گردش خون می شود [۱۲]. ممکن است ترنجبین با کاهش فعالیت آنزیم بتا-گلوکورونیداز از گردش روده ای - کبدی جلوگیری کرده و باعث دفع بیلی روبین از طریق مدفوع بشود. آگار، یک ملین پلی ساکاریدی کلئیدی است که در معده به بیلی روبین غیرکنژوگه متصل می شود و از بازجذب آن جلوگیری می کند، با تجویز آگار، ۲۰ ساعت بعد از تولد نوزادان و به مدت ۴ روز، از افزایش بیلی روبین مورد انتظار در سومین تا پنجمین روز زندگی جلوگیری شده است [۱۵]. شاید ترنجبین نیز با اتصال به بیلی روبین موجود در روده از بازجذب آن جلوگیری نماید.

در یک مطالعه [۱۵] به نوزادان سالم ترم انسان، ترنجبین با غلظت های مختلف داده شده است ولی باز هم در بعضی از نوزادان هیپربیلی روبینمی مشاهده گردید. با توجه به اختلاف نتایج پژوهش حاضر با مقاله فوق می توان به موارد زیر اشاره کرد: اولاً، شاید به علت حجم کم نمونه (نوزادان) در آن مطالعه، نمی توان نتیجه دقیقی در مورد اثر ترنجبین گرفت. ثانیاً، ممکن است مقدار ترنجبین تجویز شده جهت کاهش غلظت بیلی روبین کافی نبوده است و باید براساس وزن نوزادان، ترنجبین تجویز گردد.

در مجموع، بررسی حاضر نشان داد که ترنجبین باعث کاهش بیلی روبین در نوزادان موش سفید آزمایشگاهی می شود و این تأییدی بر این است که استفاده آن در طب سنتی ایران برای این هدف با ارزیابی ما، همخوانی دارد. البته قبل از مصرف آن در انسان، کارآزمایی بالینی ضروری است.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سمنان که بودجه این پژوهش را تأمین کرده اند و

هیپربیلی روبینمی، از نوزادان موش سفید استفاده شد که به طور آزمایشگاهی در آنها هیپربیلی روبینمی ایجاد شده بود [۷]. بعد از تزریق ALA، همراه با افزایش بیلی روبین سرم، فعالیت هم اکسیژناز کبدی هم افزایش می یابد که احتمالاً به دلیل افزایش Heme مشتق از ALA است [۳]. بنابراین قسمتی از افزایش بیلی روبین سرم بعد از تجویز ALA در روزهای ۷ تا ۱۴ بعد از تولد، به علت افزایش سرعت اکسیداسیون Heme به پیگمان صفراوی در کبد است که این همراه با ظرفیت محدود کبد جهت کنژوگاسیون مقدار زیاد بیلی روبین تشکیل شده است [۷]. همزمان با تزریق داخل صفاقی ALA محلول ترنجبین نیز با غلظت های مختلف خورانده شد، غلظت های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد ترنجبین باعث کاهش غلظت بیلی روبین پلاسما گردید که در غلظت ۳۰٪، اختلاف معنی دار بود. توانایی ترنجبین برای مهار هیپربیلی روبینمی ایجاد شده توسط ALA، ثابت و پایدار و وابسته به دوز بود.

در چند مطالعه از ترکیبات سنتتیک Sn-پروتوپورفیرین [۸،۹] و Zn-پروتوپورفیرین [۱۳] جهت کاهش غلظت بیلی روبین در موش های یرقانی استفاده شده است، چون این ترکیبات، مهارکننده قوی هم اکسیژناز هستند، با تجویز آنها به موش، بیلی روبین کاهش یافته است. پس ترنجبین نیز ممکن است باعث کاهش فعالیت هم اکسیژناز شود و بدین وسیله منجر به کاهش بیلی روبین سرم گردد.

مکانیسم اثر ترنجبین مشخص نیست. سه مسیر متابولیک و دفعی برای بیلی روبین وجود دارد که عبارتند از: کنژوگاسیون با اسید گلوکورونیک، فتوایزومریزاسیون و اکسیداسیون [۱۲]. ممکن است ترنجبین با تحریک این مکانیسم ها، باعث کاهش بیلی روبین سرم شود. برای مثال ممکن است با افزایش فعالیت آنزیم GDP - گلوکورونیل ترانسفراز، مسیر کنژوگاسیون با اسید گلوکورونیک را تحریک نماید. شاید ترنجبین در تبدیل بیلی روبین به ایزومرهای محلول در آب مؤثر باشد که به راحتی از طریق صفرا یا ادرار دفع شود. مسیر دیگر

- [9] Drummond, G.S. and Kappas, A., Chemoprevention of neonatal jaundice: potency of tin-protoporphyrin in an animal model, *Science*, 217 (1982) 1250-1252
- [10] Frank, B.B., Clinical evaluation of jaundice - a guideline of the patient care committee of the american gastroenterological association, *JAMA*, 262 (1989) 3031-3034
- [11] Hope, S., Newman, T.B. and Stevenson D.K., Direct bilirubin measurements in jaundiced term new-born infant, a reevaluation, *Am. J. Dis. Child.*, 145 (1991) 1305-1309.
- [12] Itoh, S., Kondo, M., Imai, T. and Kusaka, T., Relationships between serum ZZ-bilirubin, its subfractions and biliverdin concentrations in infants at 1-month check-ups, *Ann. Clin. Biochem.*, 38 (2001) 323-327.
- [13] Maines, M.D., Zinc-protoporphyrin is a selective inhibitor of heme oxygenase activity in the neonatal rat, *Biochim. Biophys. Acta.*, 633 (1981) 339-350.
- [14] Maisels, M.J., Baltz, R.D., Bhutani, V.K. and Newman, T.B., Neonatal jaundice and Kernicterus, *Pediatrics*, 108 (2001) 763-765.
- [15] Panjavani, Z., Kharrazi-Sabet H., Tawakkoli, S., Ramazani, M.R. and Sarraf, M.T., Is Taranjebin a prophylactic agent for neonatal jaundice? *Med. J. IRI.*, 9 (1995) 27-32.
- [16] Schwobel, A. and Sakranda, S., Hyperbilirubinemia, new approaches to an old problem, *J. Perinatal. Neonatal. Nurs.*, 11 (1997) 78-97.
- همچنین از آقایان دکتر راهب قربانی، دکتر عباسعلی وفایی، حسن صادقی، بیژن نجاتی و خانم پریسا کوهساریان که همکاری صمیمانه‌ای داشته‌اند صمیمانه تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

- [۱] آیین‌چی، ی. مفردات پزشکی و گیاهان دارویی ایران، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، سال ۱۳۷۰، ص ۹۸.
- [۲] خاکساری، م.، رضوانی، م.ا.، سنجادی، م.ع. و سلیمانی، ع. بررسی اثر مصرف موضعی عصاره آبی *Rhazya stricta* بر ترمیم زخم پوستی موش سفید بزرگ آزمایشگاهی، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان، جلد ۱، شماره ۳، ۱۳۷۹، ۱۰-۱.
- [3] Anderson, K.E., And, D. and Rummond, G.S., Porphrogenic effects and induction of heme- oxygenase in vivo by ALA, *Biochim. Biophys. Acta.*, 676 (1981) 289-299
- [4] Anonymous, Kernicterus in full-term infants, united states, *JAMA*, 286 (2001) 299-300.
- [5] Behram, R., Kliegman, R. and Jenson, H.B., Nelson textbook of pediatrics, 16th Edition, W.B.Saunders Co., USA, 2000 pp:513-559
- [6] Burtis, C.A. and Ashwood, E.R., Tietz textbook of clinical chemistry. Third Edition, W.B.Saunders Co., USA, 1999, pp:1151-1169
- [7] Drummond, G.S. and Kappas, A., An experimental model of postnatal jaundice in the suckling rat, *J. Clin. Invest.*, 74 (1984) 142-149.
- [8] Drummond, G.S. and Kappas, A., Prevention of neonatal hyperbilirubinemia by tin-protoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (USA), 78 (1981) 6466-6470.