

Comparing the effect of hydrazone derivative 2-phenylthiobenzoic acid as a new anti-inflammatory with mefenamic acid on liver tissue histology and liver enzymes in *Trichogaster trichopterus*

Yasaman Khani¹, Tahereh Naji^{*2}, Ali Almasi Rad³, Homayoun Hosseinzadeh Sahafi⁴

1. Ph.D. Student in Pharmacy, Dept. of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Tehran Medical Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: yasamankhani2@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Tehran Medical Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: tnaji2002@gmail.com
3. Associate Prof., Dept. of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Tehran Medical Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: almasirad.a@iaups.ac.ir
4. Professor, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Promotion Organization, Tehran, Iran. E-mail: h_hosseinzadeh@yahoo.com

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 11.01.2022

Revised: 11.18.2022

Accepted: 12.16.2022

Keywords:

2- (Phenylthio) benzoic acid
Enzyme,
Liver,
Trichogaster trichopterus

ABSTRACT

Background and Objectives: The effect of liver ultrastructure and changes of liver enzymes with hydrazone derivative 2-phenylthiobenzoic acid as a new anti-inflammatory and its comparison with mefenamic acid was investigated in three spotted gourami fish.

Materials and Methods: 120 pieces of *Trichogaster trichopterus* female fish with an average weight of 1.93 ± 0.43 g were purchased from from ornamental fish farm and divided into eight groups of 15 including the intact control group, DMSO solvent control, six treatment groups receiving mefenamic acid and hydrazone derivative with a dose of 10, 20 and 30 mg/kg. Data analysis was done using SPSS₂₆ software with one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test at $P \geq 0.05$.

Results: The results showed that in the highest dose of mefenamic acid and hydrazone derivative, the hepatosomatic index decreased significantly compared to the control treatments ($P < 0.05$). ALP and ALT increased significantly in all mefenamic acid and hydrazone derivative treatments compared to control treatments ($P < 0.05$). The highest ALT was measured in medium dose of mefenamic acid and hydrazone derivative and the highest AST was measured in low dose of mefenamic acid and hydrazone derivative ($P < 0.05$). Liver histology with optical microscope showed that in the control treatments, liver sinusoids had a normal shape and a normal trend, while in the treatments of mefenamic acid and hydrazone derivative, expansion and disorder of the sinusoids occurred. In the examination of the electron microscope, dissociation was observed in the cell membrane and cytoplasm in the treatments of mefenamic acid and hydrazone derivative.

Conclusion: both Mefenamic acid and hydrazone derivative cause liver damage. In all three doses, mefenamic acid has more tissue and cell damage than the hydrazone derivative, and the hydrazone derivative is more favorable in terms of toxic profile.

Cite this article: Khani, Yasaman, Naji, Tahereh, Almasi Rad, Ali, Hosseinzadeh Sahafi, Homayoun. 2023. Comparing the effect of hydrazone derivative 2-phenylthiobenzoic acid as a new anti-inflammatory with mefenamic acid on liver tissue histology and liver enzymes in *Trichogaster trichopterus*. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 12 (2), 157-169.



مقایسه اثر مشتق هیدرازون ۲- فنیل تیو بنزویک اسید به عنوان یک ضد التهاب جدید با مفنامیک اسید بر هیستولوژی بافت کبد و آنزیم‌های کبدی در ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*)

یاسمن خانی^۱، طاهره ناجی^{۲*}، علی الماسی راد^۳، همایون حسین‌زاده صحافی^۴

۱. دانشجوی دکتری داروسازی، گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: yasamankhani2@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: tnaji2002@gmail.com
۳. دانشیار گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: almasirad.a@iaups.ac.ir
۴. استاد تمام، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. رایانامه: h_hosseinzadeh@yahoo.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	سابقه و هدف: تأثیر فراساختار کبد و تغییرات آنزیم‌های کبدی با مشتق هیدرازون ۲- فنیل تیو بنزویک اسید به عنوان یک ضد التهاب جدید و مقایسه آن با مفنامیک اسید در ماهی گورامی سه خال بررسی گردید.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۰	مواد و روش‌ها: تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی گورامی سه خال ماده با میانگین وزنی $1/93 \pm 0/43$ گرم از مرکز پرورش ماهیان زینتی خریداری و به هشت گروه ۱۵ تایی شامل گروه کنترل‌های دست‌نخورده و حلال DMSO، شش گروه تیماری دریافت‌کننده مفنامیک اسید و مشتق هیدرازون با دوز ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۶ با آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و توکی در سطح $P \leq 0/05$ انجام شد.
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۸/۲۷	یافته‌ها: نتایج نشان داد در بیش‌ترین دوز مفنامیک اسید و مشتق هیدرازون شاخص هپاتوسوماتیک نسبت به تیمارهای کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/05$). آنزیم ALT و ALP در همه تیمارهای مفنامیک اسید و مشتق هیدرازون نسبت به تیمارهای کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/05$). بافت‌شناسی کبد با میکروسکوپ نوری نشان داد در تیمارهای کنترل، سینوزوئیدهای کبدی به شکل طبیعی و از یک روند نرمال برخوردار بودند در حالی‌که در
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۵	واژه‌های کلیدی: آنزیم، کبد، ماهی گورامی سه خال، مشتق هیدرازون ۲- فنیل تیو بنزویک اسید

تیمارهای مفنمیک اسید و مشتق هیدرازون اتساع و برهم‌ریختگی سینوزوئیدها رخ داد. در بررسی میکروسکوپ الکترونی نیز گسستگی در غشا و سیتوپلاسم سلول در تیمارهای مفنمیک اسید و مشتق هیدرازون مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: مفنمیک اسید و مشتق هیدرازون موجب آسیب کبدی می‌گردند. در تیمارهای مفنمیک اسید هر سه دوز، آسیب بافتی و سلولی بیش‌تر از مشتق هیدرازون بود و مشتق هیدرازون از لحاظ پروفایل سمیت کبدی مطلوب‌تر است.

استناد: خانی، یاسمن، ناجی، طاهره، الماسی راد، علی، حسین‌زاده صحافی، همایون (۱۴۰۲). مقایسه اثر مشتق هیدرازون ۲- فنیل تیو بنزوئیک اسید به عنوان یک ضد التهاب جدید با مفنمیک اسید بر هیستولوژی بافت کبد و آنزیم‌های کبدی در ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*). نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۲ (۲)، ۱۶۹-۱۵۷.

DOI: 10.22069/japu.2022.20744.1721



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی (Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) از پرمصرف‌ترین ترکیبات در درمان درد و التهاب می‌باشند (۱). مهار آنزیم سیکلواکسیژناز توسط داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی، علاوه بر این‌که سنتز پروستاگلاندین‌های محافظ (محصولات COX-1) را مهار می‌نماید، افزایش متابولیسم آراشیدونیک اسید در مسیر لیپواکسیژناز را نیز به همراه دارد؛ بنابراین داروهایی که بتوانند هم‌زمان هر دو مسیر سیکلواکسیژناز و لیپواکسیژناز را مهار کنند، اثرات درمانی قوی‌تر و عوارض جانبی کم‌تری خواهند داشت (۲، ۳) هدف اصلی درمانی داروهای NSAID فعالیت سیکلواکسیژنازی آنزیم سیکلواکسیژناز می‌باشد. با توجه به عملکرد فیزیولوژیک پروستاگلوئیدهای حاصل از مسیر سیکلواکسیژناز، عوارض جانبی ایجاد شده در مصرف NSAID هایی را که مهارکننده غیرانتخابی آنزیم سیکلواکسیژناز می‌باشند، توجه می‌نماید. عوارض کبدی از جمله شایع‌ترین عوارض می‌باشند (۴، ۵).

از جمله داروهایی که می‌توانند هم‌زمان COX و LOX را مهار کنند می‌توان مشتقات جدید آریل هیدرازون ۲-فنیل تیو بنزوئیک اسید را نام برد (۶، ۷). هیدرازون‌ها به‌تازگی به‌دلیل خواص بیولوژیکی مختلف مانند ضد باکتری، ضد قارچی (۸)، ضد تشنج (۹)، ضد مالاریا و آنتی‌اکسیدانت (۱۰)، شلاتورکننده آهن (۱۱)، وازودیلاتور (۱۲)، ضد تومور (۱۳) و ضدالتهاب اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند. فنیل تیو بنزوئیک اسید ۴- نیترو بنزیلیدن هیدرازون از مشتقات هیدرازون ۲- فنیل تیو بنزوئیک اسید است که در آزمایشگاه شیمی دارویی دانشگاه آزاد واحد علوم دارویی تهران سنتز شده است. در سال ۲۰۱۲، شاه‌قلی و همکاران اثرات ضد التهابی مشتق سنتز شده 2-(phenylthio) benzoic acid (4-nitrobenzylidene)hydrazide را روی موش

صحرائی بررسی کردند. این مشتق اثرات ضد التهابی معنی‌دار بالاتری نسبت به گروه کنترل داشت ولی نسبت به مفنامیک اسید اثرات معنی‌دار ضد التهابی بالاتری نداشت (۱۴).

سلول‌های کبدی بسیاری از متابولیسم‌ها را انجام می‌دهند و دارای تعداد زیادی آنزیم هستند. آمینوترانسفرازها حساس‌ترین و پرمصرف‌ترین آنزیم‌های تشخیصی کبد و شامل آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) هستند (۱۵، ۱۶) ارزیابی سطح پلاسمایی آمینوترانسفرازها نشان‌دهنده آسیب سلولی در ارگانی است که این آنزیم داخل آن بالا رفته است (۱۷). تغییرات نسبت وزن ارگان به بدن ممکن است نشانه‌ای از انقباض یا التهاب سلولی باشد (۱۸).

ماهی‌ها بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین گروه مهره‌داران است. موقعیت تکاملی آن‌ها نسبت به دیگر مهره‌داران و توانایی ماهی‌ها برای انطباق با محیط‌های متنوع، این موجود را برای مطالعه تکامل مولکولی ایده‌آل می‌کند (۱۹). کبد ماهی ارگان‌ساز اصلی مربوط به دفع سموم آلی و غیرآلی می‌باشد و می‌تواند آن‌ها را در مقادیر بالاتری نسبت به سایر ارگان‌ها جمع و دفع کند (۱۹، ۲۰). ماهی گورامی سه خال (*tricopterus Tricogaster*) متعلق به خانواده *Anabantidae* بوده که به‌عنوان یک مدل اندوکراینی در پژوهش حاضر در نظر گرفته شده است. اگرچه برخی تفاوت‌های معنی‌دار در سیستم اندوکراینی ماهی‌ها در مقایسه با پستانداران وجود دارد، اما اساس زیربنایی سیستم اندوکراینی آن‌ها بسیار مشابه پستانداران است و به‌عنوان مدل‌های آزمایشگاهی کاربردهای زیادی دارند (۲۱).

در این مطالعه با فرض این‌که هیدرازون‌ها در مقایسه با NSAID ها اثرات ضدالتهابی و ضد درد قوی‌تر و عوارض کم‌تری دارند، اثر مشتق هیدرازونی بر بافت کبد و آنزیم‌های کبدی ماهی گورامی سه خال و مقایسه آن با داروی مفنامیک اسید بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در آزمایشگاه آبریان دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی در تیرماه سال ۱۴۰۱ انجام گرفت و با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1400.421 تصویب شد. تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی گورامی سه خال ماده با میانگین وزنی $1/93 \pm 0/43$ گرم و طول کل $5/8 \pm 0/6$ سانتی‌متر از مرکز پرورش ماهیان زیتتی در همدان تهیه شدند. ۴۸ ساعت قبل از ورود ماهیان تمامی آکواریوم‌ها با ابعاد $30 \times 40 \times 60$ سانتی‌متر مکعب) با کاغذ سمباده همراه نمک شست و شو داده شد و به منظور کلرزدایی و بالا بردن اکسیژن پر شدند. سپس فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی شامل سختی آب، pH و دمای آب سنجیده شد. مدت زمان سازگاری ماهی‌ها با محیط ۴۸ ساعت بود. ماهی‌ها به صورت یک روز در میان از غذای استاندارد به میزان کافی تغذیه شدند.

ماهی‌ها به طور تصادفی در ۸ گروه شامل کنترل دست نخورده (بدون تزریق)، کنترل حلال (دی متیل سولفوکساید (DMSO))، سه گروه تیماری دریافت‌کننده مگنمیک اسید با دوز ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و سه گروه تیماری دریافت‌کننده مشتق هیدرازون با دوز ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم‌بندی شدند (۲۲، ۲۳). دوزهای تزریقی براساس میانگین وزنی ماهی‌ها در هر گروه انجام شد تا میزان مورد نیاز داروها به دست آید. مقدار محاسبه شده توزین و در DMSO حل گردید و داخل ظروف شیشه‌ای تیره که درب آن‌ها با پارافیلیم بسته شده بود، نگهداری شد.

داروی مگنمیک اسید و مشتق 2-(phenylthio) benzoic acid (4-nitrobenzylidene) hydrazid به صورت سنتز شده از آزمایشگاه شیمی دارویی واحد علوم پزشکی تهران تهیه شدند. حلال مورد استفاده DMSO بود که داروی مگنمیک اسید و مشتق هیدرازون در آن قابل حل بودند (۲۳، ۳۰).

تزریق ماهی‌ها تا ۱۰ نوبت و به صورت یک روز در میان انجام شد (۲۴، ۲۵). برای تزریق ابتدا ماهی‌ها در هر گروه با استفاده از محلول عصاره میخک رقیق شده با آب مقطر بیهوش شدند و سپس مقدار $0/2$ میلی‌لیتر از محلول ماده مورد نظر بین باله پشتی و خط جانبی درون عضله با زاویه 30° درجه با سرنگ BD نیم سی‌سی تزریق شد. بعد اتمام تزریق‌ها به مدت ۴۸ ساعت مداخله‌ای روی ماهی‌ها انجام نگرفت و نهایتاً ماهیان پس از یوتانازی با عصاره میخک غلیظ تشریح شدند.

اندام‌های داخلی شامل کبد و سایر احشا تخلیه و کبد جداسازی شد. تعدادی کبد از هر گروه جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری انتخاب شد و در محلول فرمالین ۱۰ درصد (۲۶) قرار گرفت. هم‌چنین جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی، تعدادی کبدی از هر گروه در محلول گلو تار آلدهید $2/5$ درصد قرار داده شد. سطح آنزیم‌های کبدی شامل AST، ALT، ALP پس از هموژنیزاسیون بافت ماهیان اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری آنزیم ALP بر اساس DGKC (استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان)، آنزیم ALT و AST بر اساس IFCC (فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی) با استفاده از کیت‌های اندازه‌گیری مخصوص شرکت پارس آزمون انجام شد. درصد شاخص هپاتوسوماتیک بر اساس نسبت وزن کبد ماهی بر وزن ماهی و به صورت درصد تعیین شد.

جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی، بافت تخمدان در گلو تار آلدهید $2/5$ درصد، تتراکسید اسمیم $1/5$ درصد و بافر کاکودیلات سدیم $0/1$ مولار، فیکس گردید. سپس نمونه‌ها در سری الکل صعودی (۵۰، ۷۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد) آبیگری و در رزین پلیمریزه شدند. پس از انجام برش‌گیری، برش‌ها روی شبکه مسی (گرید) مش 200 قرار گرفت و رنگ‌آمیزی شد. سپس، گریدها با میکروسکوپ

شاخص هپاتوسوماتیک در دوز ۱۰ mg/kg مفنامیک اسید و مشتق هیدرازونی نسبت به گروه‌های کنترل افزایش یافت که احتمالاً به علت آسیب و التهاب سلولی می‌باشد. در همه گروه‌های مفنامیک اسید و مشتق هیدرازونی با افزایش دوز، شاخص هپاتوسوماتیک روند کاهشی داشت که می‌تواند به علت افزایش بافت چربی و کاهش مایعات سلولی باشد. هم‌چنین در گروه دوز ۳۰ mg/kg مفنامیک اسید آسیب بیش‌تری نسبت به گروه مشتق هیدرازونی در دوز ۳۰ mg/kg مشاهده شد. مشابه با یافته‌های مطالعه حاضر، Somchit و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی آسیب کبدی ناشی از مفنامیک اسید در موش گزارش کردند که این دارو موجب سمیت کبدی و آسیب به هپاتوسیت‌ها شد و به‌طور واضحی آنزیم‌های کبدی در موش افزایش پیدا کرد. در این مطالعه فقط موش‌هایی که ۱۰۰ mg/kg/day مفنامیک اسید به‌مدت ۱۴ روز گرفته بودند افزایش وزن کبد داشتند (۲۸). در تأیید این مطالعه، مفنامیک در مطالعه حاضر نیز موجب سمیت کبدی و آسیب بافتی شد و میزان آنزیم‌های کبدی در ماهی گورامی سه‌خال افزایش پیدا کرد.

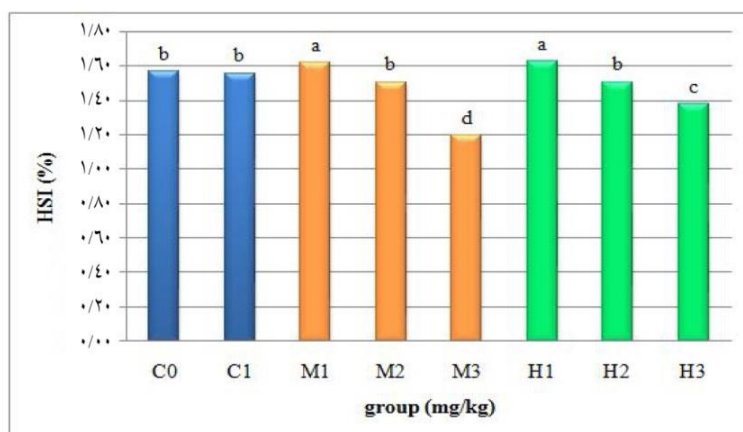
الکترونی مدل (PHILIPS EM208S) در ولتاژ ۷۰ کیلوولت مورد بررسی قرار گرفتند (۲۶).

جهت انجام مطالعات آماری و بررسی معنی‌دار بودن اختلافات در گروه‌های مورد بررسی از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی و نرم‌افزار SPSS (ورژن ۲۶) استفاده شد. در همه آزمون‌ها $P \leq 0/05$ معنی‌دار بود.

نتایج و بحث

شاخص هپاتوسوماتیک: شاخص کبدی نسبت وزن کبد به وزن ماهی تعریف می‌شود. تغییرات نسبت وزن ارگان به بدن ممکن است نشانه‌ای از انقباض یا التهاب سلولی باشد. انقباض در ارگان می‌تواند به علت از دست دادن مایع از ارگان به علت آسیب رخ دهد، در حالی که افزایش وزن ارگان نسبت به بدن می‌تواند بیانگر التهاب باشد (۲۷).

بررسی شاخص هپاتوسوماتیک در شکل ۱ بیانگر آن است که شاخص هپاتوسوماتیک در گروه کنترل دست نخورده، گروه کنترل حلال، مشتق هیدرازونی ۲۰ mg/kg و مفنامیک اسید ۲۰ mg/kg نسبت به هم اختلاف معنی‌داری ندارد ($P > 0/05$). در مطالعه حاضر



شکل ۱- مقایسه میانگین شاخص هپاتوسوماتیک در گروه‌های مختلف.

C0: کنترل دست نخورده؛ C1: کنترل حلال؛ M1، M2 و M3: به ترتیب مفنامیک اسید در دوزهای ۱۰ mg/kg، ۲۰ mg/kg و

و ۳۰ mg/kg؛ H1، H2 و H3: به ترتیب مشتق هیدرازونی در دوزهای ۱۰ mg/kg، ۲۰ mg/kg و ۳۰ mg/kg.

حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح $P \leq 0/05$ می‌باشد.

ALT و احتمالاً $(P < 0/05)$. بیشترین افزایش آنزیم ALT و احتمالاً بیشترین آسیب کبدی در دوز متوسط هر دو ماده مشتق هیدرازونی و مفنمیک اسید اتفاق افتاد و آسیب کبدی ناشی از مفنمیک اسید نسبت به مشتق هیدرازونی بیش تر بود (شکل ۴).

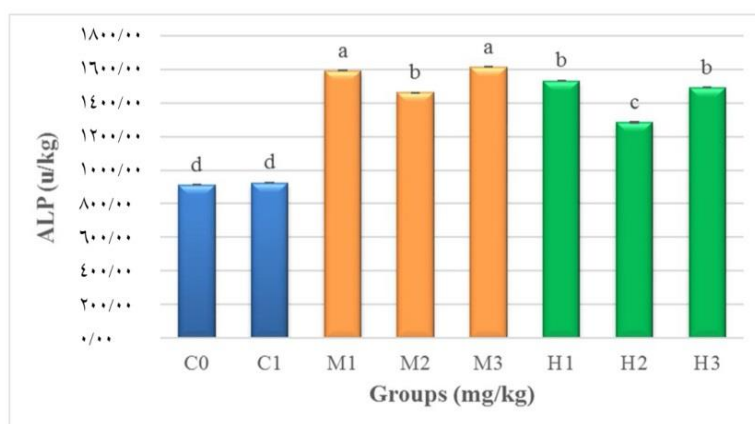
بر خلاف مطالعه حاضر، در سال ۲۰۱۴، Zuo و همکاران، اثرات Phloretin Isonicotinyl (PIH) را روی کبد نوعی موش بررسی و مشاهده کردند PIH به صورت معنی داری مانع افزایش آنزیم کبدی ALT، AST، Y-GT، ALP شد (۲۹). همسو با یافته‌های مطالعه حاضر Mokhnache و همکاران (۲۰۲۰) در بررسی اثرات کبدی مشتق هیدرازونی جدید سنتز شده از ایزونیزاید بر کبد نوعی موش نر (swiss albino) گزارش کردند مشتق هیدرازونی به طور معنی داری منجر به آنزیم‌های ALT و AST گردید (۳۰). به طور مشابه Naslunal و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند ناپروکسن در دوزهای بالا بر بیان ژن کبدی و بافت کبدی ماهی wild three-spined stickleback اثرات مخرب دارد (۳۱). Germaine و همکاران (۲۰۲۰) نیز آسیب کبدی ناشی از ایوپروفن را در ماهی‌های *Clarias gariepinus* یا African sharptooth catfish گزارش کردند (۳۲). در یک مطالعه انسانی نیز گزارش شد مصرف داروی ناپروکسن که از دسته NSAID هاست موجب افزایش آنزیم‌های ALT، AST، ALP در یک بیمار زن شده است (۳۳) که با یافته‌های مطالعه این پژوهش همخوانی دارد.

آنزیم‌های کبدی: نتایج آزمون تجزیه واریانس تفاوت معنی داری را در آنزیم‌های کبدی ALT، ALP و AST در گروه‌های مختلف نشان داد $(P < 0/05)$ (شکل‌های ۲ تا ۴).

نتایج این مطالعه نشان داد (شکل ۲) مشتق هیدرازون ۲- فنیل تیو بنزوئیک اسید و مفنمیک اسید دارای اثرات هپاتوتوکسیک بوده و بدون وابستگی به دوز موجب افزایش معنی دار سطح آنزیم‌های ALP، ALT و AST گردیدند. بررسی سطح آنزیمی ALP نشان داد که هم مفنمیک اسید و هم مشتق هیدرازونی موجب آسیب کبدی در هر سه دوز گردیدند $(P < 0/05)$. سطوح ALP در گروه‌های مشتق هیدرازونی نسبت به گروه‌های مفنمیک اسید در دوز معادل به طور معنی داری پایین تر بود که نشان می‌دهد آسیب کبدی ناشی از مشتق هیدرازونی نسبت به مفنمیک اسید کم تر است.

نتایج این پژوهش نشان داد (شکل ۳) همه دوزهای مفنمیک اسید و دوزهای ۱۰ mg/kg و ۲۰ mg/kg مشتق هیدرازولی منجر به افزایش معنی دار آنزیم کبدی ALT در ماهی‌ها در مقایسه با تیمارهای کنترل گردید $(P < 0/05)$. بیشترین میزان آنزیم ALT در ماهی‌های گروه ۲۰ mg/kg مفنمیک اسید اندازه‌گیری شد و مشتق هیدرازونی آسیب کبدی کمتری نسبت به مفنمیک اسید ایجاد کرد.

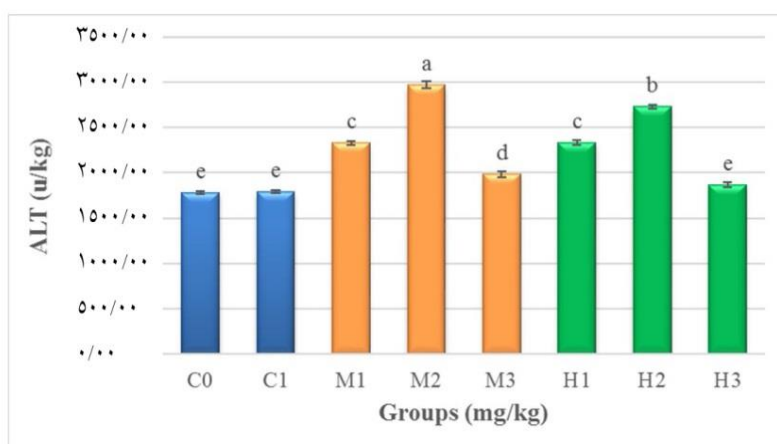
در ارزیابی سطح ALT مشخص گردید هم مفنمیک اسید و هم مشتق هیدرازونی بدون وابستگی به دوز باعث افزایش ALT و آسیب کبدی شدند



شکل ۲- مقایسه میانگین آنزیم ALP در گروه‌های مختلف.

C0: کنترل دست نخورده؛ C1: کنترل حلال؛ M1، M2 و M3: به ترتیب مفنمیک اسید در دوزهای ۱۰ mg/kg، ۲۰ mg/kg و ۳۰ mg/kg؛ H1، H2 و H3: به ترتیب مشتق هیدرازونی در دوزهای ۱۰ mg/kg، ۲۰ mg/kg و ۳۰ mg/kg

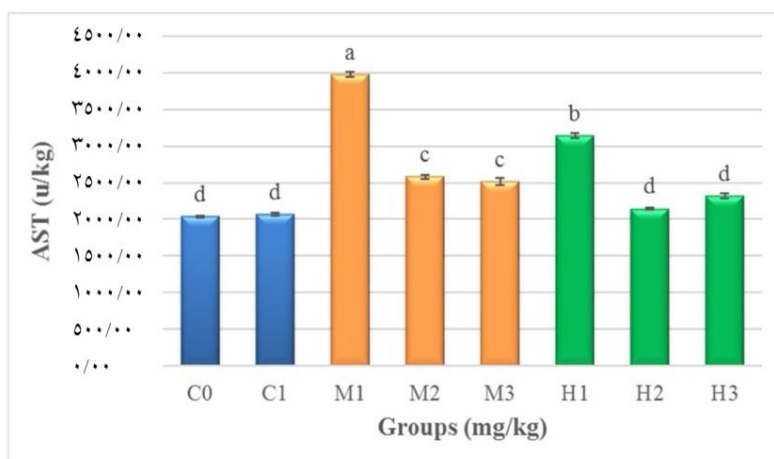
حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح $P \leq 0/05$ می‌باشد.



شکل ۳- مقایسه میانگین آنزیم ALT در گروه‌های مختلف.

C0: کنترل دست نخورده؛ C1: کنترل حلال؛ M1، M2 و M3: به ترتیب مفنمیک اسید در دوزهای ۱۰ mg/kg، ۲۰ mg/kg و ۳۰ mg/kg؛ H1، H2 و H3: به ترتیب مشتق هیدرازونی در دوزهای ۱۰ mg/kg، ۲۰ mg/kg و ۳۰ mg/kg

حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح $P \leq 0/05$ می‌باشد.



شکل ۴- مقایسه میانگین آنزیم AST در گروه‌های مختلف.

C0: کنترل دست نخورده؛ C1: کنترل حلال؛ M1، M2 و M3: به ترتیب مفنمیک اسید در دوزهای ۱۰ mg/kg، ۲۰ mg/kg و ۳۰ mg/kg

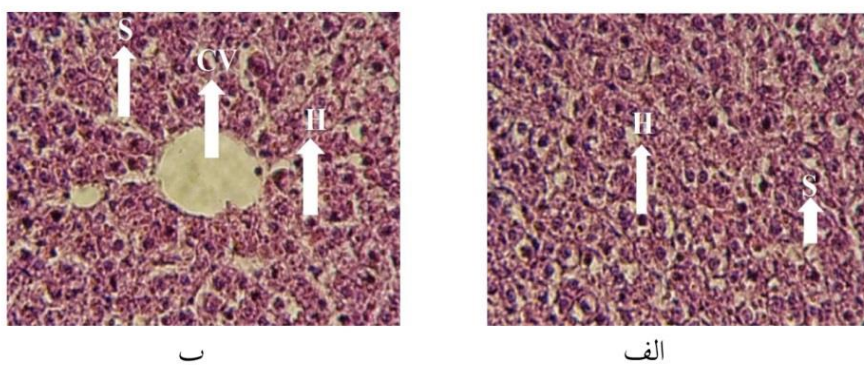
H1، H2 و H3: به ترتیب مشتق هیدرازونی در دوزهای ۱۰ mg/kg، ۲۰ mg/kg و ۳۰ mg/kg

حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی دار بودن اختلاف در سطح $P \leq 0.05$ می‌باشد.

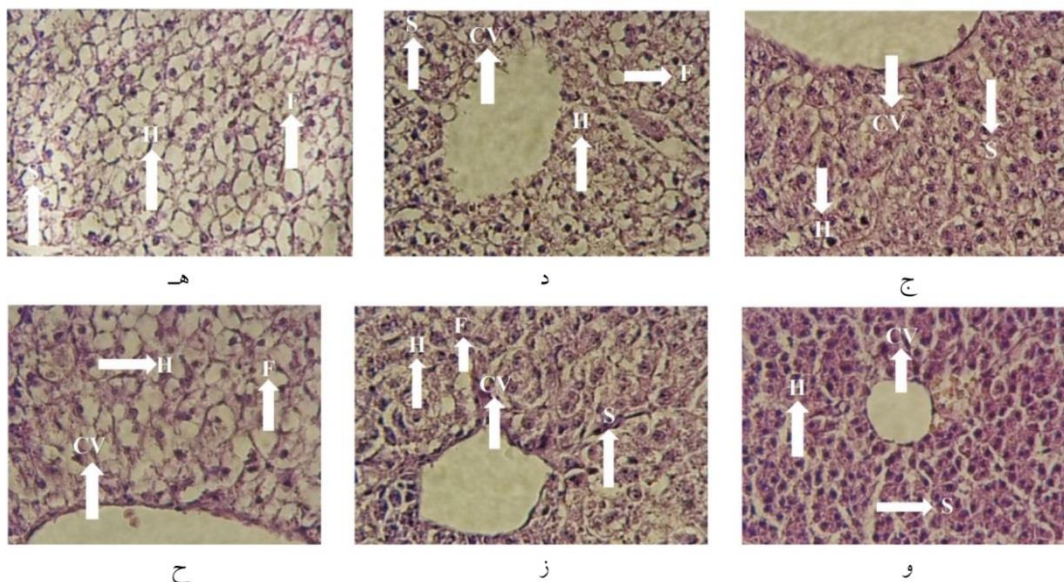
به‌سختی قابل تشخیص بودند (شکل ۶- ج، و). در دوز ۲۰ mg/kg نیز ورید مرکزی در گروه مفنمیک اسید دچار نامنظمی و گسستگی شده بود در حالی که در گروه مشتق هیدرازونی در حالت نرمالی قرار داشت. سینوزوئیدها در گروه مفنمیک اسید مقدار زیادی از بین رفته بودند و هپاتوسیت‌ها روند منظمی نداشتند اما در گروه مشتق هیدرازونی سینوزوئیدها تا حدودی قابل تشخیص بودند (شکل ۶- د، ز). در دوز ۳ mg/kg مفنمیک اسید و مشتق هیدرازونی بافت کبد دچار گسستگی شده بود و مقدار زیادی بافت چربی تشکیل شده بود (شکل ۶- ه ح). با در نظر گرفتن نتایج آنزیم‌های کبدی و میکروسکوپ الکترونی احتمالاً آسیب ناشی از مفنمیک اسید بیش‌تر بوده است.

مشاهده بافت کبد با میکروسکوپ نوری: ارزیابی مقاطع بافت تخمدان ماهی‌ها در گروه شاهد و گروه کنترل حلال DMSO نشان داد هپاتوسیت‌ها دارای هسته مرکزی و سیتوپلاسم مشخص بوده و از شکل نرمالی برخوردار هستند. سینوزوئیدهای کبدی به شکل طبیعی در فاصله صفحات سلول‌های کبدی قرار گرفته و از یک روند نرمال برخوردارند. (شکل ۵- الف، ب).

به‌طورکلی مشاهده شد آسیب بافتی مفنمیک اسید نسبت به مشتق هیدرازونی بیش‌تر است. در گروه مشتق هیدرازونی با دوز ۱۰ mg/kg سینوزوئیدها دچار اتساع شده بودند اما هپاتوسیت‌ها تا حدودی در حالت نرمالی قرار داشتند؛ اما در گروه مفنمیک اسید با دوز ۱۰ mg/kg اتساع و برهم ریختگی سینوزوئیدها به‌طور کامل رخ داد و هپاتوسیت‌ها



شکل ۵- مقطع بافت کبد. الف: گروه کنترل دست‌نخورده (شاهد)، ب: گروه کنترل حلال. S (Sinusoid): سینوزوئید، (hepatocyte) H: هپاتوسیت، CV (Central vein): ورید مرکزی. رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی $\times 40$.



شکل ۶- مقطع بافت کبد. ج: گروه ۱۰ mg/kg مفنایمیک اسید، د: گروه ۲۰ mg/kg مفنایمیک اسید، ه: گروه ۳۰ mg/kg مفنایمیک اسید، و: گروه ۱۰ mg/kg مشتق هیدرازونی، ز: گروه ۲۰ mg/kg مشتق هیدرازونی، ح: گروه ۳۰ mg/kg مشتق هیدرازونی. S (Sinusoid): سینوزوئید، H (hepatocyte): هپاتوسیت، F (Fat): سلول چربی، CV (Central vein): ورید مرکزی. رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی $\times 40$.

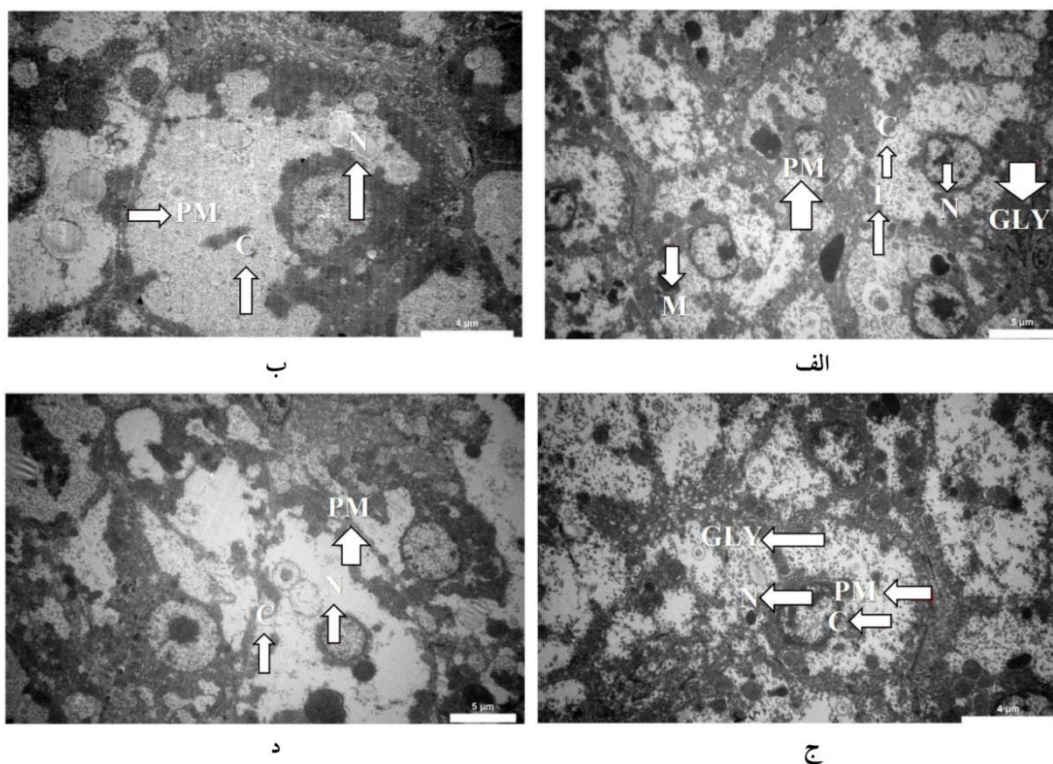
بسیار با داروی NSAID مفنایمیک اسید برخورد داشتند. اثرات مفنایمیک اسید روی دو گونه ماهی *Oryzias latipes* و *Danio rerio* مورفولوژی و ظاهر کبد بررسی شد و سمیت این دارو روی کبد آن‌ها مشخص شد (۳۴). این مطالعه تأییدی بر مطالعه حاضر است که در آن تزریق مفنایمیک اسید

Świacka و همکاران (۲۰۲۰) در مورد مصرف گسترده و هم‌چنین ورود NSAIDها به محیط زیست به‌خصوص چرخه زندگی موجودات آبی ابراز نگرانی کردند. جدا از بحث سمیت‌های حاد برای این موجودات، دوز کم و طولانی‌مدت این دسته از داروها نیز ایجاد سمیت می‌کند. در بین موجودات آبی ماهی

اسید با دوز 30 mg/kg ، هسته و سیتوپلاسم و غشای پلاسمایی به سختی قابل تشخیص بود. غشا و سیتوپلاسم گسسته و ذخایر گلیکوژنی پراکنده شده بودند. سلول‌ها حالت نرمالی نداشتند. در گروه مشتق هیدرازونی در دوز 30 mg/kg ، هسته، غشاء و سیتوپلاسم به سختی قابل تشخیص بودند. غشای پلاسمایی و سیتوپلاسم گسسته شده و سلول‌ها غیرنرمال بودند. مفنمیک اسید (۲۸) و مشتق هیدرازونی (۲۹) موجب تخریب بافت کبدی و نکروز شده و با آسیب رساندن به هپاتوسیت‌ها موجب افزایش آنزیم‌های کبدی می‌شوند.

و مشتق هیدرازونی به صورت یک روز در میان موجب سمیت کبدی و تغییرات بافت کبدی و افزایش چربی در این بافت شد.

مشاهده بافت کبد با میکروسکوپ الکترونی: بافت کبد به ترتیب در گروه‌های کنترل دست نخورده، حلال DMSO، مفنمیک اسید و مشتق هیدرازونی در شکل ۷ نشان داده شده است. در گروه کنترل دست نخورده و در گروه حلال DMSO هپاتوسیت‌ها در حالت نرمال بودند و اجزای سلولی شامل هسته، سیتوپلاسم، غشای پلاسمایی، میتوکندری و لیزوزوم‌ها و ذخایر گلیکوژنی مشاهده شدند. در گروه مفنمیک



شکل ۷- مقطع سلول کبد در الف: گروه کنترل دست نخورده، ب: گروه حلال DMSO، ج: گروه مفنمیک اسید با دوز بالا (30 mg/kg) و د: گروه مشتق هیدرازونی. PM (Plasma membrane): غشای پلاسمایی، N (Nucleus): هسته هپاتوسیت، C (Cytoplasm): سیتوپلاسم، GLY (Glycogen): ذخایر گلیکوژنی، L (Lysosome): لیزوزوم‌ها، M (Mitochondria): میتوکندری (Scale Bar $4 \mu\text{m}$).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی و نوری و تغییرات آنزیم‌های کبدی مطالعه حاضر نشان داد هر دو ماده مفنمیک اسید و مشتق هیدرازون ۲-فنیل تیو بنزوئیک اسید در دوزهای ۱۰ تا ۳۰ mg/kg موجب

آسیب کبدی می‌شوند اما آسیب کبدی ناشی از مشتق هیدرازون ۲-فنیل تیو بنزوئیک اسید از مفنمیک اسید در هر سه دوز کم‌تر و از لحاظ پروفایل سیمت مطلوب‌تر است.

منابع

1. Fiorucci, S., Meli, R., Bucci, M., & Cirino, G. (2006). Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy?. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 1433-1438.
2. Celotti, F., & Laufer, S. (2001). Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. *Pharmacol. Res.* 43 (5), 429-436.
3. Funk, C. D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Sci.* 294 (5548), 1871-1875.
4. Azizian, H., Mousavi, Z., Faraji, H., Tajik, M., Bagherzadeh, K., Bayat, P., Shafiee, A., & Almasirad, A. (2016). Arylhydrazone derivatives of naproxen as new analgesic and anti-inflammatory agents: Design, synthesis and molecular docking studies. *J. Mol. Graph. Model.* 67, 127-136.
5. Stork, G. (1977). Monoalkylation of alpha, beta-unsaturated ketones via metalloenamines: 1-butyl-10-methyl-delta** (1 (9))-2-octalone. *Pascal and Francis Bibliographic Databases.* 6, 242.
6. Day, A. C., & Whiting, M. C. (1988). Acetone hydrazone. *Org. Synth.* 50, 10-12.
7. Singh, N., Ranjana, R., Kumari, M., & Kumar, B. (2016). A review on biological activities of hydrazone derivatives. *Int. J. Pharm. Clin. Res.* 8 (3), 162-166.
8. Kandile, N. G., Mohamed, M. I., Zaky, H., & Mohamed, H. M. (2009). Novel pyridazine derivatives: Synthesis and antimicrobial activity evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 44 (5), 1989-1996.
9. Mamolo, M. G., Falagiani, V., Zampieri, D., Vio, L., & Banfi, E. (2001). Synthesis and antimycobacterial activity of [5-(pyridin-2-yl)-1, 3, 4-thiadiazol-2-ylthio] acetic acid arylidene-hydrazone derivatives. *Il Farmaco.* 56 (8), 587-592.
10. Randhawa, H., Kamboj, A., & Saluja, A. K. (2014). Synthesis, pharmacological evaluation and computational studies of some novel hydrazine derivatives of thiophene chalcone as antimicrobial and antioxidant agents. *World J. Pharm. Res.* 3, 3146-3159.
11. Lima, P. C., Lima, L. M., Da Silva, K. C., Léda, P. H., Miranda, A. L P., Fraga, C. A. M., & Barreiro, E. J. (2000). *Eur. J. Med. Chem.* 35, 187.
12. Kümmerle, A. E., Raimundo, J. M., Leal, C. M., da Silva, G. S., Balliano, T. L., Pereira, M. A., de Simone, C. A., Sudo, R. T., Zapata-Sudo, G., Fraga, C. A., & Barreiro, E. J. (2009). Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potent vasodilator arylidene N-acylhydrazone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 44 (10), 4004-4009.
13. Nasr, T., Bondock, S., & Youns, M. (2014). Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide-hydrazone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 76, 539-548.
14. Shahgholi, K. (2011. 2012). Investigating the anti-inflammatory effects of new 2-phenylthio benzoic acid derivatives. pharma D thesis. Faculty of pharmacy. Islamic azad university of medical science.
15. Limdi, J. K., & Hyde, G. M. (2003). Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad. Med. J.* 79 (932), 307-12.
16. Giannini, E. G., Testa, R., & Savarino, V. (2005). Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Cmaj.* 172 (3), 367-379.

17. Harvey, R. A., & Ferrier, D. R. (2012). Lippincott's illustrated reviews. *Pharmacology*. 201, 250-288.
18. Adebayo, J. O., Yakubu, M. T., Egwim, E. C., Owoyele, V. B., & Enaibe, B. U. (2003). Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. *J. Ethnopharmacol.* 88 (1), 69-72.
19. Govind, P. (2011). A review of fish model in experimental pharmacology. *Int. Res. J. Pharm.* 2 (9), 33-36.
20. Hart, P. J., & Reynolds, J. D. (2008). Handbook of fish biology and fisheries: fisheries.
21. Takatsuki, A., & Yamaguchi, I. (2001). Fish reproduction as an indicator of endocrine disruption by chemical compounds, *Ricken Review*. 42, 43-44.
22. Cimolai, N. (2013). The potential and promise of mefenamic acid. *Expert review of clinical pharmacology*. 6 (3), 289-3052.
23. Kim, J. W., Ishibashi, H., Yamauchi, R., Ichikawa, N., Takao, Y., Hirano, M., Koga, M., & Arizono, K. (2009). Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *The Journal of toxicological sciences*. 2009 Apr 1; 34 (2), 227-32.
24. Mokhnache, K., Karbab, A., Soltani, E. K., Bououden, W., Ouhida, S., Arrar, L., Esteban, M. A., Charef, N., & Mubarak, M. S. (2020). Synthesis, characterization, toxic substructure prediction, hepatotoxicity evaluation, marine pathogenic bacteria inhibition, and DFT calculations of a new hydrazone derived from isoniazid. *J. Mol. Struct.* 1221, 128817.
25. Näslund, J., Asker, N., Fick, J., Larsson, D. J., & Norrgren, L. (2020). Naproxen affects multiple organs in fish but is still an environmentally better alternative to diclofenac. *Aquat Toxicol.* 227, 105583.
26. Wang, H. Y., Weng, C. F., Tu, M. C., & Lee, S. C. (2001). Synchronization of plasma sexual steroid concentrations and gonadal cycles in the sleeper, *Eleotris acanthopoma*. *Zool Stud.* 40 (1), 14-20.
27. Adebayo, J. O., Yakubu, M. T., Egwim, E. C., Owoyele, V. B., & Enaibe, B. U. (2003). Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. *J. Ethnopharmacol.* 88 (1), 69-72.
28. Somchit, N., Sanat, F., Gan, E. H., Shahrin, I. A., & Zuraini, A. (2004). Liver injury induced by the non-steroidal anti-inflammatory drug mefenamic acid. *SMJ.* 45 (11), 530.
29. Zuo, A. R., Yu, Y. Y., Shu, Q. L., Zheng, L. X., Wang, X. M., Peng, S. H., Xie, Y. F., & Cao, S. W. (2014). Hepatoprotective effects and antioxidant, antityrosinase activities of phloretin and phloretin isonicotinyl hydrazone. *J. Chin. Med. Assoc.* 77 (6), 290-301.
30. Mokhnache, K., Karbab, A., Soltani, E. K., Bououden, W., Ouhida, S., Arrar, L., Esteban, M. A., Charef, N., & Mubarak, M. S. (2020). Synthesis, characterization, toxic substructure prediction, hepatotoxicity evaluation, marine pathogenic bacteria inhibition, and DFT calculations of a new hydrazone derived from isoniazid. *Journal of Molecular Structure.* 1221, 128817.
31. Näslund, J., Asker, N., Fick, J., Larsson, D. J., & Norrgren, L. (2020). Naproxen affects multiple organs in fish but is still an environmentally better alternative to diclofenac. *Aquat. Toxicol.* 227, 105583.
32. Ogunwole, G. A., Saliu, J. K., Osuala, F. I., & Odunjo, F. O. (2021). Chronic levels of ibuprofen induces haematotoxic and histopathology damage in the gills, liver, and kidney of the African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*). *Environmental Science and Pollution Research.* 28 (20), 25603-25613.
33. Ali, S., Pimentel, J. D., & Ma, C. (2011). Naproxen-induced liver injury. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International.* 10 (5), 552-556.
34. Świacka, K., Michnowska, A., Maculewicz, J., Caban, M., & Smolarz, K. (2021). Toxic effects of NSAIDs in non-target species: a review from the perspective of the aquatic environment. *Environmental Pollution.* 273, 115891.

