

ORIGINAL ARTICLE

The Influences of Hydro-Alcoholic Extract of *Melilotus officinalis* on Blood Liver Enzymes in Adult Male Rats Under the Chronic Stress

Madineh Mardaninia¹, Saeid Valipour Chahardahcharic^{2*}, Hamed Hosseinzadeh¹

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

2. Department of Biology, Iz.C., Islamic Azad University, Izeh, Iran.

Correspondence

Saeid Valipour Chahardahcharic

Email: Sa.valipour@iau.ac.ir

How to cite

Mardaninia, M., Valipour Chahardahcharic, S., & Hosseinzadeh, H. (2026). The influences of Hydro-Alcoholic Extract of *Melilotus officinalis* on Blood Liver Enzymes in Adult Male rats Under the Chronic Stress. *Experimental Animal Biology*, 14(54), 37-47.

ABSTRACT

The liver enzymes are the liver health indicators in which their increase uncovers the liver damage. This experimental research was designed to examine the hydro-alcoholic extract' effect of *M. officinalis* plant on blood liver enzymes in the adult male rats, under the chronic stress. To do so, 40 male Wistar rats were randomly classified into the control, vehicle-treated, and three experimental groups that received chronic stress and treated with dosages of 25, 50 and 100 (mg/Kg) of *M. officinalis* extract. To induce chronic immobility stress, animals were daily placed in the restraint device for two hrs during 21 days. The plant extract was injected intraperitoneally 30 minutes before stress induction. After the deep anesthesia and blood sampling from the animals' hearts, the blood serum samples were taken to evaluate the liver enzymes' level. In the vehicle-treated group, AST, ALT, and ALP levels showed significant increases compared to the control group ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$, respectively). The *M. officinalis* extract at 50 mg/kg significantly reduced AST and ALP levels compared to the vehicle-treated group ($p<0.001$, $p<0.05$) and significantly reduced ALT levels compared to both vehicle-treated and control groups ($p<0.001$, $p<0.05$). Administration of 25 and 100 mg/kg of the extract significantly lowered ALT levels relative to the vehicle-treated group ($p<0.001$, $p<0.01$), while no significant changes were observed in the other two enzymes. As a conclusion, the medium dose of *M. officinalis* extract could reduce high level of the liver blood enzymes in this stress.

KEYWORDS

Animal model, Blood liver enzymes, Chronic stress, *Melilotus officinalis*.

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

تأثیر عصاره هیدروالکلی یونجه زرد (*Melilotus officinalis*) بر آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی نر بالغ تحت استرس مزمن

مدینه مردانی‌نیا^۱، سعید ولی‌پور چهارده چریک^{۲*}، حامد حسین‌زاده^۱

چکیده

سطح آنزیم‌های کبدی به‌عنوان نشانگر سلامت کبد عمل کرده و در آسیب کبدی افزایش می‌یابند. این پژوهش تجربی به‌منظور بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گیاه یونجه زرد بر آنزیم‌های کبدی خون در موش‌های صحرایی نر بالغ تحت استرس مزمن، طراحی و اجرا گردید. در مطالعه حاضر از ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار استفاده شد که به‌صورت تصادفی به گروه‌های کنترل، شاهدتزریق و سه گروه تجربی دریافت‌کننده استرس مزمن و تیمار شده با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ (mg/Kg) از عصاره یونجه زرد تقسیم‌بندی شدند. برای ایجاد استرس مزمن بی‌حرکتی، حیوانات روزانه در دستگاه مقیدکننده به‌مدت ۲ ساعت، برای ۲۱ روز قرار گرفتند. عصاره گیاهی ۳۰ دقیقه قبل از القای استرس مزمن، روزانه برای ۲۱ روز به‌صورت درون صفاقی به حیوانات تزریق گردید. در انتها و پس از بی‌هوشی عمیق و خون‌گیری از قلب حیوانات، نمونه‌های سرم خون جهت ارزیابی سطح آنزیم‌های کبدی، مورد استفاده قرار گرفتند. در گروه شاهدتزریق میزان AST، ALT و ALP، نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار را نشان دادند ($p < 0/001$)، عصاره یونجه زرد در دوز ۵۰ (mg/Kg)، آنزیم‌های AST و ALP را نسبت به گروه شاهدتزریق ($p < 0/05$ ، $p < 0/001$) و آنزیم ALT را نسبت به شاهدتزریق ($p < 0/05$ ، $p < 0/001$) تجویز دوزهای ۲۵ و ۱۰۰ (mg/Kg) از عصاره، میزان آنزیم ALT را نسبت به گروه شاهدتزریق کاهش معنی‌دار داد ($p < 0/001$ ، $p < 0/01$). اما دو آنزیم دیگر تفاوت معنی‌دار را نسبت به گروه شاهدتزریق نداشتند. بنابراین عصاره یونجه زرد می‌تواند در دوز متوسط و در این استرس، میزان بالای آنزیم‌های کبدی خون را تا حدودی کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی

استرس مزمن، آنزیم‌های کبدی خون، مدل حیوانی، یونجه زرد.

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲. گروه زیست‌شناسی، واحد ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی، ایذه، ایران.

نویسنده مسئول:

سعید ولی‌پور چهارده چریک

رایانامه: Sa.valipour@iau.ac.ir

استناد به این مقاله:

مردانی‌نیا، مدینه؛ ولی‌پور چهارده چریک، سعید و حسین‌زاده، حامد (۱۴۰۴). تأثیر عصاره هیدروالکلی یونجه زرد (*Melilotus officinalis*) بر آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی نر بالغ تحت استرس مزمن. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۴(۵۵)، ۳۷-۴۷.

مقدمه

استرس یک عامل خطر شناخته‌شده برای بیماری‌های قلبی عروقی و متابولیک است. استرس مزمن یک وضعیت طولانی مدت با پاسخ ناسازگار شناخته شده است که حاکی از اثرات مضر بر مکانیسم‌های بدن می‌باشد (Noushad *et al.*, 2021). استرس مداوم یا طولانی مدت طیف پیچیده‌ای از واکنش‌های بیولوژیکی و رفتاری را آغاز می‌کند که منجر به فعال شدن محور قشر آدرنال - هیپوفیز - هیپوتالاموس و تحریک سیستم عصبی سمپاتیک با افزایش سطوح اپی‌نفرین، کورتیزول و سایتوکین‌های التهابی می‌شود که همگی می‌توانند باعث ایجاد بیماری کبدی شوند. علاوه بر این، استرس می‌تواند منجر به رفتارهای ناسالم از جمله مصرف الکل، مصرف دخانیات و رژیم غذایی نامناسب شود که با کبد چرب نیز مرتبط است (Kang *et al.*, 2020). بیش‌تر اندام‌های داخلی بدن توسط اعصاب سمپاتیک و پاراسمپاتیک عصب‌دهی می‌شوند. این اعصاب از طریق عصب‌دهی مستقیم و آزادسازی انتقال دهنده‌های عصبی مانند کاتکول آمین‌ها و استیل‌کولین نقش محوری در هومئوستاز بافت دارند. فیبرهای سیستم عصبی سمپاتیک (SNS) در طول استرس مزمن فعال می‌شوند و انتقال دهنده‌های عصبی کاتکول آمین را آزاد می‌کنند که بر روی گیرنده‌های آدرنرژیک برای تنظیم رفتار بیولوژیکی سلولی اثر می‌کنند (Noushad *et al.*, 2021).

کبد اندام داخلی اصلی بدن دارای سلول‌هایی است که دلیل عملکرد دقیق آن هستند. کبد به‌طور جداگانه تا ۵۰۰ عملکرد را معمولاً با تعامل با سایر سیستم‌ها و اندام‌ها انجام می‌دهد. وظیفه اصلی کبد سم‌زدایی مواد سمی از بدن و متابولیسم کردن مواد بلعیده شده شامل غذا، مکمل‌های غذایی، الکل یا داروها است. همچنین، کبد ذخیره گلیکوژن و تجزیه گلبول‌های قرمز خون را تنظیم می‌کند، پروتئین‌های پلازما تولید می‌کند و هورمون‌ها را متابولیزه و غیرفعال می‌کند. آسیب ایجادشده در کبد سمیت کبدی است و از مواد شیمیایی ناشی می‌شود. سمیت کبدی همچنین به‌عنوان اختلال در عملکرد یا تخریب کبد به‌دلیل مصرف بیش از حد داروها و یا آنتی‌بیوتیک‌هایی که به‌عنوان هپاتوتوکسین‌ها شناخته می‌شوند، تعریف می‌گردد. آسیب کبدی همچنین می‌تواند در نتیجه استرس اکسیداتیو ایجاد شود که با فعال شدن آنزیم‌های سیستم CYP 450 مانند CYP2E ایجاد می‌شود (Ahsan *et al.*, 2017). از آنجایی که کبد اعمال متفاوت بیوشیمیایی، تولیدی

و ترشحی را بر عهده دارد، از آنزیم‌های کبدی به‌عنوان شاخص ارزیابی بیوشیمیایی در تشخیص نارسایی‌های کبدی استفاده می‌شود. مهم‌ترین این شاخص‌ها، تعیین فعالیت آمینوترانسفرازهای سرمی باشند که نشان‌دهنده صدمه به هپاتوسیت‌ها هستند. آلانین آمینوترانسفراز (ALT) یک آنزیم محلول در سیتوپلاسم سلول است که ترانس آمیناسیون قابل‌برگشت L-آلانین و ۲-اکسو گلوکاترات را به پیروات و گلوکاتامات کاتالیز می‌کند. آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز (AST) در سیتوپلاسم و میتوکندری سلول‌های بافت قلب، کبد و عضلات وجود دارد در صورتی که این بافت‌ها دچار ضایعه شوند میزان AST سرم افزایش می‌یابد. آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) آنزیم دیگری است که در نارسایی‌های کبد ارزش تشخیصی دارد. فعالیت این آنزیم نیز در اختلالات هپاتیک افزایش می‌یابد. آلکالین فسفاتاز در بافت‌های مختلف بدن به نسبت‌های متفاوت منتشر است ولی بافت‌های استخوان، کبد، روده و کلیه و جفت از این آنزیم بسیار غنی هستند، آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP نشانگر سلامت کبد می‌باشند. افزایش سرمی این آنزیم‌ها منعکس‌کننده آسیب کبد است و احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی در نتیجه نشت آن‌ها از سیتوزول کبدی به داخل جریان خون می‌باشد. لذا، اولین گام در تشخیص آسیب کبدی انجام آزمایش ساده خون است که حضور آنزیم‌های کبدی مشخص را نشان می‌دهد (Karimi Dehkordi *et al.*, 2021). علاوه بر این، چندین مطالعه ارتباط بین نشانگرهای بیولوژیکی استرس، مانند کورتیزول و تغییرات ضربان قلب، با بیماری کبد یا ارتباط استرس ایجاد شده با مرگ و میر مرتبط با کبد را ارزیابی کرده‌اند (Kang *et al.*, 2020). این مشخص شده است که یک دوره استرس، باعث بدتر شدن نشانه‌های بالینی و پارامترهای بیوشیمی کبدی در بیماران مبتلا به هپاتیت ویروسی مزمن نوع B یا C، هپاتیت الکلی، استئاتوهپاتیت غیرالکلی و هپاتیت خودایمن شده است. همچنین، آسیب مزمن کبدی می‌تواند به‌صورت فیروز، کلستاز، نکروز و سیروز ظاهر شود (Joung *et al.*, 2019). فیروز کبد یک مرحله اجتناب‌ناپذیر در بیماری‌های مزمن مختلف کبدی است که به‌دلیل طولانی شدن دوره و حتی پیشرفت غیرقابل کنترل به سیروز تبدیل می‌شود. فیروز کبدی فشار روحی و روانی سنگینی را بر بسیاری از بیماران وارد می‌کند. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که نسبت بیماران مبتلا به فیروز و سیروز کبدی که

اختلالات روانی مانند افسردگی و اضطراب را تجربه می‌کنند، به ۵۰ درصد می‌رسد که به نوبه خود شرایط درمانی بیماری‌های کبدی و کیفیت زندگی بیماران را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Bajaj et al., 2017). در سال‌های اخیر، تأثیر استرس روانی مزمن بر تشدید هپاتیت و پیشرفت فیروز کبدی به عنوان یک عامل مرتبط شناخته شده است (Ishtiaq et al., 2018). استراتژی‌های مختلفی جهت کاهش آثار استرس بر بافت‌های غیرهدف به کار گرفته شده است که از این بین می‌توان به استفاده از گیاهان دارویی با هدف افزایش سطح آنتی‌اکسیدانی بافت و پیشگیری یا درمان بیماری‌های ناشی از عدم تعادل سیستم اکسیداتیو-آنتی‌اکسیداتیو مفید اشاره کرد (Moradi et al., 2019).

گیاه یونجه زرد یا شبدر زرد یا ملیوتوس با نام علمی *Melilotus officinalis* L. از خانواده Fabaceae است. این گیاه اغلب دو ساله به ارتفاع ۳۰ الی ۱۰۰ سانتی‌متر، منشعب، بی‌کرک و پرگل است. این گیاه بومی مناطق جنوب و مرکز اروپا، جنوب غرب و مرکز آسیا، هندوستان و ایران است (Jasicka et al., 2017) و از زمان‌های بسیار قدیم به عنوان یک گیاه دارویی شناخته می‌شده است. بقراط، پدر علم پزشکی، از گیاه شبدر شیرین برای درمان زخم‌های پوستی استفاده می‌کرد، در حالی که دیوسکوریدس گیاه شبدر را یک داروی نرم کننده و ضدادم توصیف کرد. گیاه‌شناس معروف فرانسوی، لکلرک، اثرات آرام‌بخش و ضداسپاسم شبدر شیرین را توصیف کرد (Bunney et al., 1992). در طب مدرن، شبدر شیرین هنوز هم برای حمایت از درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود. یونجه زرد حاوی ویتامین‌ها (کاروتن، توکوفرول، اسید اسکوربیک، نیاسین، فیلوکینون)، آنزیم آمیلاز، اسیدهای آمینه مانند لیزین، آرژنین، هیستیدین، آدنین، فیل‌آلانین، آسپاراژین و سیستین، اسیدفسفریک، منیزیم، آهن و نیز روغن‌های چرب از جمله اسیدهای لینولئیک، اولئیک، پالمیتیک و سایر اسیدها می‌باشد. همچنین، ساقه و برگ *Melilotus officinalis* حاوی، فلاونوئیدها (هیپروسید، روتین، کوئرستین، ایزو کوئرستین، کامفرول و کوئرستین)، ساپونین‌های تری‌ترین، تانن‌ها، رزین‌ها، کربوهیدرات‌ها (فروکتوز، گالاکتوز، آرابینوز)، آلكالوئیدها، اسیدهای کربوکسیلیک فنل و در ریشه مواد معطر، اسید ملیوتیک و کومارین هستند. وجود این ترکیبات باعث شده است فرآورده‌های حاصل از آن در صنایع دارویی، غذایی، دام و طیور، آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار بگیرد (Kang et al., 2020). در یک

پژوهش که به بررسی فرمولاسیون‌های جدید ژل و کرم حاوی عصاره یونجه زرد پرداخته شد، تجزیه و تحلیل شیمیایی عصاره، وجود ترکیبات ارزشمندی مانند کومارین، کوئرستین، اسیدگالیک و اسید پاراکوماریک را تأیید کرد. فرمولاسیون‌های تهیه‌شده در شرایط تعریف شده به مدت شش ماه از پایداری فیزیکی و شیمیایی خوبی برخوردار بودند و در آزمایش‌های حیوانی هیچ گونه نشانه‌های حساسیت یا تحریک پوستی نشان ندادند و ژل تهیه‌شده، اثر قابل توجهی در کاهش التهاب داشت که با اثر داروی ضدالتهابی هیدروکورتیزون قابل مقایسه بود (Bradic et al., 2024). کومارین موجود در این گیاه همچنین در درمان واریس و هموروئید مؤثر است. علاوه بر خواص دارویی گزارش شده، یونجه برای افزودن طعم و عطر به غذاها و نوشیدنی‌ها نیز استفاده می‌شود. گیاه شبدر شیرین دارویی حاوی کومارین است که در صورت فاسدشدن یا آسیب دیدن گیاه به دیکومارین تجزیه می‌شود. این ترکیب به عنوان رقیق کننده و ضدانعقاد خون در سموم موش و همچنین برای درمان بیماری‌های انسان استفاده می‌شود (Jasicka-Misiak et al., 2017). باوجود این که گیاهان دارویی بسیاری از مواد فعال بیولوژیکی و ارزشمند هستند که اثرات مفید آن‌ها بر سلامت مصرف‌کنندگان ثابت شده است. از طرفی با توجه به تأثیر استرس روانی مزمن بر تشدید هپاتیت و فیروز کبدی (Ishtiaq et al., 2018)، اطلاعات در مورد اثرات دارویی تجویز عصاره هیدروالکلی یونجه زرد (*Melilotus officinalis*) بر آنزیم‌های کبدی که از شاخص‌های سلامت کبد است، در موش‌های صحرایی نر بالغ تحت استرس مزمن گزارش نشده است که نیاز به مطالعه دارد.

روش‌شناسی پژوهش

در این پژوهش تجربی از گیاه یونجه زرد یا شبدر شیرین زرد با نام علمی *M. officinalis* استفاده شد که از منطقه سبزکوه استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از تأیید بیوسیستماتیکی در هرباریوم مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری با کد هرباریومی D-7142 و انتقال به آزمایشگاه، در شرایط سایه و دمای اتاق خشک و سپس پودر گردیدند. عصاره‌گیری با استفاده از اتانول ۷۰ درصد انجام شد. پس از جداسازی ذرات درشت و عبور از صافی، ماده صاف‌شده تغلیظ گردید. عصاره حاصل در ظرف شیشه‌ای مسطح ریخته شد و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری به‌طور کامل

حیوانات با تزریق درون صفاقی کتامین/زایلین به‌صورت عمیق بی‌هوش شدند و جهت ارزیابی شاخص‌های لپیدی خون، با شکافتن قفسه سینه، خون‌گیری از قلب آن‌ها انجام شد. نمونه‌های خون به مدت یک ساعت در محیط آزمایشگاه جهت عمل لخته‌شدن نگه‌داری و سپس به کمک سانتریفیوژ، سرم از خون جدا گردید و جهت سنجش سطح آنزیم‌های کبدی، مورد استفاده قرار گرفت. ارزیابی آنزیم‌های کبدی خون با استفاده از کیت‌های سنجش بیوشیمیایی شرکت Bionik ایران به شماره H917-S با دستگاه اتوآنالایزر ادویا ساخت شرکت زیمنس و به روش نورسنجی (آنزیمی برای اندازه‌گیری فتومتریک) به انجام رسید.

داده‌های به‌دست‌آمده از این پژوهش با بکارگیری نرم‌افزار آماری SPSS (ویرایش ۲۱) بررسی شدند. با توجه به این‌که داده‌های به‌دست‌آمده کمی بود، توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov توزیع نرمال آن‌ها تأیید گردید ($P > 0.05$). داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) تحلیل شدند. همچنین نتایج به دست آمده به همراه محاسبات آماری مربوطه به‌صورت خطای معیار میانگین $\pm$ میانگین (Mean $\pm$ SEM) گزارش شدند. در تمام موارد اختلاف بین گروه‌ها با $P < 0.05$ معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌های پژوهش

شکل (۱) میزان آنزیم کبدی آسپارات ترانس آمیناز یا SGOT (AST) خون در گروه‌های مختلف موش‌های بزرگ آزمایشگاهی مورد پژوهش در روز ۲۱ پس از شروع القای استرس و شروع درمان را نشان می‌دهد که در آن استرس مزمن سبب افزایش معنی‌دار در میزان آنزیم کبدی SGOT خون در گروه شاهد تزریق نسبت به گروه کنترل شده است ($P < 0.05$) و تجویز دوزهای مختلف عصاره یونجه زرد در گروه‌های درمان، سبب کاهش در میزان آنزیم کبدی خون نسبت به شاهد تزریق گردید که این کاهش فقط در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

در شکل (۲) سطح آنزیم کبدی آلانین ترانس آمیناز SGPT (ALT) خون در گروه‌های مختلف مورد مطالعه در روز ۲۱ پس از القای استرس و شروع درمان نشان داده شده است. در اثر استرس مزمن، میزان میزان آنزیم کبدی SGPT (ALT) خون در گروه شاهد تزریق نسبت به گروه کنترل

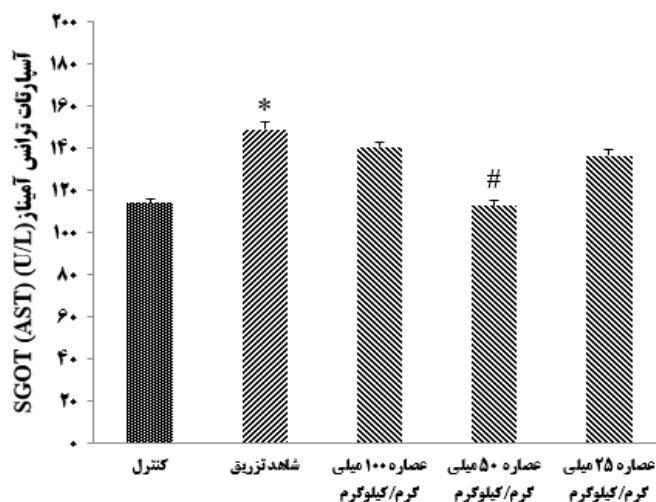
خشک گردید. عصاره خشک شده تا زمان استفاده، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Servat Yari et al., 2016). این مطالعه تجربی براساس مجوز شماره IR.SKU.REC.1400.068 تاریخ ۱۴۰۰/۱۱/۱۹ کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه شهرکرد انجام شد. در این مطالعه از موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ نژاد ویستار خریداری شده از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۵۰ گرم به‌عنوان مدل تجربی استفاده گردید. حیوانات در شرایط استاندارد 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی (۱۹-۷) و ۱۲ ساعت تاریکی، در قفس‌های پلاستیکی با بستر پوشالی در اتاق حیوانات آزمایشگاهی گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی ایذه با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. عصاره گیاهی روزانه و برحسب مقادیر مورد نظر جهت تزریق در دمای آزمایشگاه در سالیन نرمال با حجم ۱۰ میلی‌لیتر بر هر کیلوگرم وزن بدن، حل و استفاده شد. حیوانات به‌طور تصادفی به پنج گروه هشت‌تایی در گروه‌های زیر تقسیم‌بندی شدند:

گروه ۱- کنترل: بدون دریافت هرگونه دارو و یا استرس؛ گروه ۲- شاهد تزریق: نرمال سالین به‌عنوان حلال عصاره را نیم ساعت قبل از القای استرس و به‌صورت درون صفاقی، به مدت ۳ هفته دریافت کردند. گروه‌های درمان شده ۳، ۴ و ۵ که دوزهای مختلف از عصاره یونجه زرد را به‌صورت درون صفاقی و براساس مقادیر استفاده‌شده در دیگر پژوهش‌ها دریافت کردند (Soto-Angona et al., 2020). برای تعیین مؤثرترین مقدار، ابتدا دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم و سپس براساس نتایج حاصل از این تجویز به ترتیب دوزهای ۵۰ و ۲۵ (میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) نیم ساعت قبل از القای استرس، به مدت ۳ هفته دریافت نمودند.

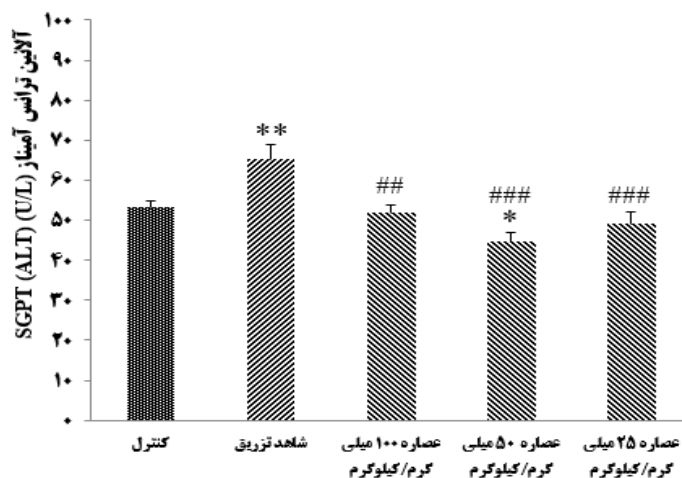
به‌منظور القای استرس به‌روش استاندارد بی‌حرکتی، از مقیدکننده (Restrainer) خریداری شده از شرکت برج صنعت با جنس ماکرولون شفاف، استفاده شد که در آن موش‌های بزرگ آزمایشگاهی، فاقد توانایی حرکت بودند. حیوانات مورد آزمایش روزانه از ساعت ۱۰ صبح و نیم ساعت قبل از القای استرس، حلال و یا عصاره‌های مختلف را به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند و به مدت دو ساعت در درون مقیدکننده قرار داده شدند. این روند بی‌حرکت‌شدن حیوانات به مدت سه هفته انجام گردید (Kang et al., 2020). در پایان القای استرس و تجویز دارو،

مقدار آنزیم کبدی آلکالین فسفاتاز (ALP) خون در گروه‌های مختلف موش‌های بزرگ آزمایشگاهی مورد مطالعه در ۲۱ روز پس از القای استرس و شروع درمان در شکل (۳) نشان داده شده است. در همه گروه‌ها در اثر استرس مزمن، میزان آنزیم کبدی ALP خون نسبت به گروه کنترل افزایش نشان دادند ($P<0/001$). گروه دریافت‌کننده دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره یونجه زرد، کاهش معنی‌دار در میزان آنزیم کبدی ALP خون نسبت به گروه شاهد تزریق ($\#P<0/05$) را نشان داد که نسبت به گروه کنترل همچنان بالا بود.

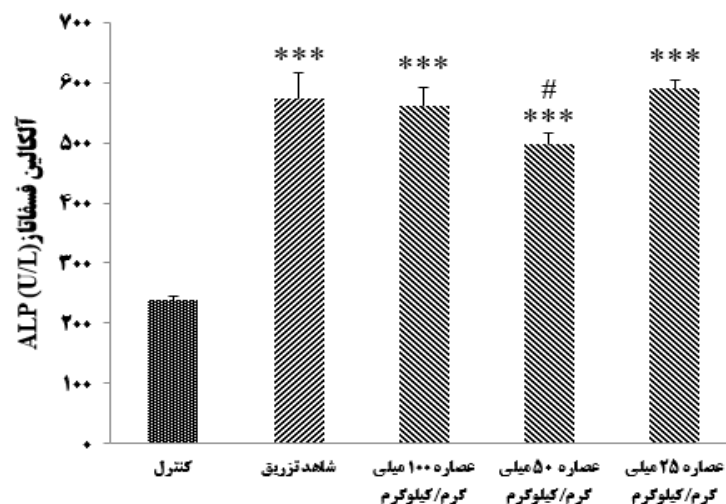
افزایش معنی‌دار را نشان داد ($P<0/01$). در گروه‌های درمان‌شده با دوزهای ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره یونجه زرد، کاهش معنی‌دار در میزان آنزیم کبدی SGPT (ALT) خون نسبت به گروه شاهد تزریق (به ترتیب $\#P<0/01$ و $###P<0/001$) دیده شد. البته میزان آنزیم کبدی SGPT (ALT) در گروه دریافت‌کننده دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل نیز داشتند ($P<0/05$).



شکل ۱. مقایسه میزان آنزیم کبدی SGOT (AST) خون در پایان هفته سوم پس از شروع درمان (دریافت عصاره) در گروه‌های کنترل، شاهد تزریق و گروه‌های دریافت‌کننده استرس بی‌حرکتی درمان‌شده با دوزهای مختلف عصاره یونجه زرد (* و #): به ترتیب بیان‌گر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و گروه شاهد تزریق). جهت تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از تست تعقیبی حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) استفاده شد.



شکل ۲. مقایسه میزان آنزیم کبدی SGPT (ALT) خون در پایان هفته سوم پس از شروع درمان (دریافت عصاره) در گروه‌های کنترل، شاهد تزریق و گروه‌های دریافت‌کننده استرس بی‌حرکتی درمان‌شده با دوزهای مختلف عصاره یونجه زرد (* و #): به ترتیب بیان‌گر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و گروه شاهد تزریق). جهت تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از تست تعقیبی حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) استفاده شد.



شکل ۳. مقایسه میزان آنزیم کبدی آلکالین فسفاتاز (ALP) خون در پایان هفته سوم پس از شروع درمان (دریافت عصاره) در گروه‌های کنترل، شاهد تزریق و گروه‌های دریافت‌کننده استرس بی‌حرکتی درمان‌شده با دوزهای مختلف عصاره یونجه زرد (* و # به ترتیب بیان‌گر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و گروه شاهد تزریق). جهت تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از تست تعقیبی حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) استفاده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی یونجه زرد بر آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی نر بالغ قرار گرفته در معرض استرس مزمن بود و نتایج این پژوهش نشان دادند که قرار گرفتن در معرض استرس مزمن سبب افزایش سطح آنزیم‌های کبدی در خون می‌شود و تجویز دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم از این عصاره اثر بیش‌تری بر سطح آنزیم‌های کبدی خون دارد.

مطالعات نشان داده‌اند که قرار گرفتن در معرض استرس برای طولانی مدت، تولید رادیکال‌های آزاد را القا می‌کند که منجر به تغییر و تبدیل‌های زیان‌آور در غشاهای پروتئین‌ها و آنزیم‌ها می‌شود (Dröge, 2002). استرس، همچنین باعث اختلال در عملکرد آنزیم‌های کبدی می‌گردد (Avci et al., 2006) که در راستای نتایج این پژوهش می‌باشد.

بررسی‌هایی که با مدل‌های مختلف حیوانی صورت گرفته است به این نتیجه رسیده‌اند که استرس اکسیداتیو با ایجاد بیش از اندازه گونه‌های فعال اکسیژن، به مولکول‌ها و سلول‌ها و بافت‌های مختلف آسیب وارد می‌کند (Furukawa et al., 2017).

مطالعات جدیدتر نشان داده‌اند که استرس مزمن علاوه بر فعال‌سازی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) و سیستم عصبی سمپاتیک، می‌تواند از طریق مسیرهای مولکولی خاصی به سلول‌های کبدی آسیب برساند. شواهد حاکی از آن است که استرس روانی مزمن منجر به افزایش سطح استرس

اکسیداتیو در کبد شده و با ایجاد اختلال در عملکرد میتوکندری، تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول را برهم می‌زند. این وضعیت که با افزایش شاخص‌هایی مانند مالون‌دی‌آلدهید (MDA) و کاهش فعالیت آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) در بافت کبد همراه است، زمینه‌ساز التهاب و آپوپتوز هپاتوسیت‌ها می‌شود (Yener et al., 2024). همچنین، استرس مزمن می‌تواند مسیرهای التهابی در کبد را از طریق فعال‌سازی کمپلکس NLRP3 اینفلامازوم و افزایش سایتوکاین‌های التهابی نظیر IL-1 β و IL-18 تشدید کند. فعال‌شدن این مسیرها نه تنها به گسترش آسیب کبدی کمک می‌کند، بلکه در بروز اختلالات متابولیکی مانند کبد چرب غیرالکلی نیز نقش دارد (Shen et al., 2025).

لذا استفاده از روش‌های درمانی مناسب برای مقابله با آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو ضروری است. بیماری‌های کبدی روز به روز در حال افزایش بوده و تهدیدی جدی برای سلامتی زندگی انسان‌ها هستند. برای درمان این بیماری‌ها توجه انسان به سوی داروهای گیاهی معطوف شده است که نسبت به داروهای مصنوعی بسیار ایمن‌تر و مقرون به صرفه‌تر می‌باشند (Ahsan et al., 2017). این پیشنهاد شده است که با توجه به عوارض جانبی کم‌تر و در دسترس بودن، بهتر است برای پیشگیری و یا جلوگیری از پیشرفت بعضی از آسیب‌ها، به جای

درمان با داروهای شیمیایی از درمان‌های طبیعی مانند گیاهان دارویی استفاده شود (Bathaie & Mousavi, 2010). پژوهش‌ها نشان داده‌اند تجویز عصاره آبی زعفران به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا، تأثیر مثبتی در کاهش آسیب‌های کبدی در موش‌های دیابتی از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو دارد (Roshanas et al., 2018). آنزیم‌های ALT و AST دو شاخص وضعیت مناسب و قابل اعتماد سلامت کبد هستند و اگر کبد آسیب ببیند، این آنزیم‌ها از سیتوزول به جریان خون نشت می‌کنند، بنابراین غلظت آن‌ها بالاتر از سطح طبیعی افزایش می‌یابد. استفاده از فرآورده‌های گیاهی برای کاهش اثرات استرس اکسیداتیو می‌تواند یکی از راه‌کارهای درمانی عملی و ارزشمند باشد (Unsal, 2018). با بررسی فعالیت محافظت کبدی عصاره متانولی گیاه یونجه زرد در برابر آسیب کبدی ناشی از پاراستامول و تتراکلرید کربن، نشان داده شد که این عصاره گیاهی در دوزهای خوراکی انتخاب شده ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با کاهش سطح آنزیم‌های نشانگر سرمی مانند بیلروبین تام، SGPT، SGOT، ALP، آلبومین و پروتئین کل در مقایسه با داروی استاندارد و گروه کنترل منفی، اثرات محافظت کننده کبدی قابل‌توجهی دارد (Ahsan et al., 2017). یونجه یا طلای سبز به دلیل خواص متعدد و داشتن پروتئین، کلسیم و ویتامین‌های مختلف در طب سنتی جایگاه ویژه‌ای دارد. این گیاه دارای آنزیم‌هایی مانند آمیلاز، اینورتاز و پکتیناز است که نقش مهمی در هضم و افزایش رشد دارند. یونجه حاوی اسیدهای آمینه‌های Arg، His، Asp، Phe و Cys و ویتامین‌های نیاسین، اسید پانتوتیک، بیوتین، اسید فولیک و همچنین مواد معدنی، و ساپونین است (Raeeszadeh et al., 2021).

عملکرد حفاظت کبدی عصاره متانولی آبی گیاه یونجه زرد را می‌توان با اثر حفاظت کبدی کپسول فیتنول که یک فرآورده پزشکی جدید حاوی عصاره‌هایی از گیاهان دارویی مختلف از جمله گیاه یونجه زرد است، مرتبط دانست که قبلاً به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی بابت وجود فلاونوئیدها و تانن‌ها گزارش شده بود (Mgeer et al., 2017). نتایج حاصل از یک پژوهش نشان داد که اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره یونجه به صورت وابسته به دوز است. مقدار IC₅₀ عصاره بیش از ویتامین C بود که اهمیت آنتی‌اکسیدانی عصاره را در مقایسه با ویتامین C نشان داد. همچنین در این مطالعه افزایش وابسته به دوز در غلظت TAC در سرم حیوانات تیمار شده با عصاره مشاهده شد (Raeeszadeh et al., 2024).

(et al., 2021). علاوه بر این، یونجه حاوی سیستمین است که نقش مهمی در افزایش مکانیسم‌های سم‌زدایی آسیب‌های درون‌زا در بدن دارد. همچنین، قرار گرفتن در معرض استرس اکسیداتیو می‌تواند بر وضعیت سیستمین تأثیر بگذارد. سیستمین و گروه‌های تیول آن می‌توانند جیوه را جذب کرده و آسیب گروه‌های تیول و پروتئین‌ها را در اندام‌های بدن از جمله کبد و کلیه کاهش دهند (Mesquita et al., 2016). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی یونجه (مانند فنل‌ها و فلاونوئیدها) و فیتواستروژن‌ها نیز می‌توانند در بهبود آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی کبد و کلیه از جمله گلوتاتیون، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز مؤثر باشند (Raeeszadeh et al., 2021).

پژوهش‌های جدیدتر نیز نشان دادند عصاره هیدروالکلی یونجه زرد سرشار از ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدی نظیر کوئرستین، روتین و اسیدهای فنولیک است که خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی قوی دارند. مکانیسم اصلی اثر محافظتی این ترکیبات، از جمله کومارین و کورستین موجود در یونجه زرد، تا حد زیادی به توانایی آن‌ها در تنظیم مسیر پیام‌رسان Keap1/Nrf2 نسبت داده می‌شود. این مسیر، کلیدی‌ترین سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن است. ترکیبات زیست فعال موجود در گیاهانی مانند یونجه زرد با مهار پروتئین Keap1 باعث آزادسازی فاکتور رونویسی Nrf2 و انتقال آن به هسته سلول می‌شوند. در هسته، Nrf2، بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی متعددی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون S-ترانسفراز را افزایش می‌دهد (Pu et al., 2025). مطالعات جدید تأیید کرده‌اند که مصرف عصاره یونجه زرد می‌تواند بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با مسیر Nrf2 را تعدیل کرده و با تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی درون سلولی، از کبد در برابر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت کند (Brdic et al., 2024). همچنین، اثرات ضدالتهابی این عصاره از طریق مهار مسیر NF- κ B و کاهش تولید سیتوکاین‌های پیش‌التهابی، نقش مهمی در کاهش هپاتیت ناشی از استرس مزمن ایفا می‌کند (Nameni et al., 2024).

با بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گیاه یونجه بر تست‌های عملکردی کبد، فاکتورهای بیوشیمیایی خون و سیستم انعقادی در موش صحرایی نر نشان داده شد که عصاره یونجه به‌طور قابل توجهی سطح سرمی ALT، ALP و غلظت گلوکز خون را در مقایسه با گروه کنترل کاهش می‌دهد. علاوه بر این، یونجه به صورت وابسته به دوز سطح پروتئین کل، فیبرینوژن و سدیم پلاسما را در

جزئی در شاخص پروترومبین نسبت به گروه کنترل شد. افزایش لخته شدن خون تحت‌تأثیر عصاره یونجه زرد نیز ممکن است به دلیل عملکرد غیرطبیعی کبد یا اثر رقیق‌کنندگی خون توسط مواد زیست‌فعال عصاره باشد. مصرف مزمن عصاره یونجه زرد منجر به کاهش معنی‌دار سطح هموگلوبین و محتوای مونوسیت نسبت به مقادیر کنترل گردید. بنابراین، تجویز مزمن عصاره به حیوانات آزمایشگاهی اثر خود را به صورت اختلال در عملکرد کبد و تغییر در سیستم انعقاد خون نشان داد. پژوهش‌های دیگر اثرات فارماکولوژیک در تجویز مزمن عصاره یونجه زرد نیز نشان دادند که تجویز مزمن عصاره یونجه زرد منجر به کاهش الگوهای رفتار اکتشافی جهت‌گیری و افزایش سطح اضطراب شد. بنابراین، تجویز مزمن عصاره به حیوانات آزمایشگاهی، اثر سمی آن را نشان داد که در کاهش الگوی رفتار اکتشافی آشکار می‌شود (Schepetova et al., 2021).

براساس یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان بیان کرد که عصاره یونجه زرد به‌ویژه در دوزهای میانی باعث بهبود میزان آنزیم‌های کبدی خون در حیوانات تحت استرس مزمن بی‌حرکتی می‌شود. این اثر احتمالاً به دلیل دارا بودن ترکیبات زیست‌فعال متعدد صورت گرفته است. بنابراین استفاده از عصاره یونجه زرد می‌تواند در اصلاح شرایط حاصل از استرس اکسیداتیو، مفید و مؤثر واقع گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از نتایج حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی جانوری می‌باشد و هزینه انجام آن توسط دانشگاه شهرکرد تأمین گردید و از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایذه که شرایط مناسب برای انجام این کار پژوهشی را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی‌دار افزایش داد (Servat Yari et al., 2016). همچنین مطالعه انجام شده به منظور بررسی پتانسیل درمانی عصاره گیاهی یونجه زرد برای درمان مولتیپل اسکلروزیس در موش‌های ماده آنسفالومیلیت خودایمنی، نشان داد تجویز پیشگیرانه یونجه زرد علائم بالینی بیماری و نیز به طور قابل توجهی بیان ژن سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند IL-6، TNF- α و IFN- γ را کاهش داد. این عصاره همچنین بیان برخی ژن‌ها را به عنوان سیتوکین ضدالتهاب افزایش داد. بیان ژن گلوکوتایون پراکسیداز و کاتالاز به عنوان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، در گروه درمان به طور معنی‌داری بیش تر بود. ارزیابی آسیب‌شناسی، برش‌های جسم پینه‌ای با غلاف میلین حفظ شده را در گروه تحت درمان در مقایسه با موش‌های آنسفالومیلیت خودایمنی نشان داد. این محققان معتقدند که ویژگی‌های تعدیل‌کننده ایمنی و آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاهی یونجه زرد شدت آنسفالومیلیت خودایمنی را بهبود می‌بخشد (Hassani et al., 2020).

در این پژوهش از دوزهای ۲۵ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نیز استفاده شد. نتایج نشان دادند که فقط در یک آنزیم (ALT) سبب کاهش نسبت به گروه شاهد تریق شدند. کم‌اثر بودن دوز ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به دوز ۵۰ قابل توجیه است، اما اثر کم‌تر دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم را می‌توان به اثرات سمی دوز بالا نسبت داد که نیاز به بررسی بیش‌تر دارد.

در یک مطالعه نشان داده شده است که فعالیت آنزیم‌هایی مانند AST و آلکالین فسفاتاز تحت‌تأثیر تجویز طولانی‌مدت عصاره یونجه زرد به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. درحالی‌که فعالیت ALT در مقایسه با شاخص‌های مشابه در حیوانات گروه کنترل به طور قابل توجهی کاهش یافت. آنزیم‌های ALT و AST وضعیت عملکرد کبد را نشان می‌دهند. بنابراین تغییر آن‌ها تحت‌تأثیر عصاره یونجه زرد ممکن است نشان‌دهنده آسیب کبدی باشد. در این مطالعه، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با تجویز طولانی‌مدت عصاره یونجه زرد افزایش یافت. تجویز مزمن عصاره یونجه زرد در حیوانات با کاهش

منابع

- Ahmadi, A., Servat-Yari, K., Kashefi, H., Monbari, M. N., Rostami, A., & Moloudi, M. R. (2016). The effect of hydroalcoholic extract of alfalfa on liver function tests, blood biochemical factors and coagulation system in male rats. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, 21(6), 16-26.
- Ahsan, H., Khan, K. U., Khan, I. U., Saleem, M., Khadija, H. A., & Sharif, A. (2017). Evaluation of hepatoprotective activity of *Melilotus officinalis* L. against paracetamol and carbon tetrachloride induced hepatic injury in mice. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 74(3), 903–909.
- Avci, G., Kupeli, E., Eryavuz, A., Yesilada, E., & Kucukkurt, I. (2006). Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3), 418–423.

- Bajaj, J. S., Ellwood, M., Ainger, T., Burroughs, T., Fagan, A., Gavis, E. A., ..., & Wade, J. B. (2017). Mindfulness-based stress reduction therapy improves patient and caregiver-reported outcomes in cirrhosis. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 8(7), e108.
- Bathaie, S. Z., & Mousavi, S. Z. (2010). New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(8), 761–786.
- Bradic, J., Petrovic, A., Nikolic, M., Nedeljkovic, N., Andjic, M., Kladar, N., ..., & Kocovic, A. (2024). Newly Developed Semi-Solid Formulations Containing *Melilotus officinalis* Extract: Characterization, Assessment of Stability, Safety, and Anti-Inflammatory Activity. *Pharmaceutics*, 16(8), 1003.
- Bradic, J., Petrovic, A., Nikolic, M., Nedeljkovic, N., Andjic, M., Kladar, N., Bolevich, S., Jakovljevic, V., & Kocovic, A. (2024). Newly developed semi-solid formulations containing *Melilotus officinalis* extract: Characterization, assessment of stability, safety, and anti-inflammatory activity. *Pharmaceutics*, 16(8), 1003.
- Bunney, S., Stodola, J., Volák, J., & Severa, F. (1992). The illustrated encyclopedia of herbs: *Their medicinal and culinary uses*. Chancellor Press.
- Chorepsima, S., Tentolouris, K., Dimitroulis, D., & Tentolouris, N. (2013). *Melilotus*: Contribution to wound healing in the diabetic foot. *Journal of Herbal Medicine*, 3(3), 81–86.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., ..., & Shimomura, I. (2017). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1752–1761.
- Hassani, M., Soleimani, M., Esmaeilzadeh, E., Zare-Abdollahi, D., & Khorshid, H. R. (2020). Healing influence of *Melilotus officinalis* herbal extract on experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 19(4), 321–332.
- Ishtiaq, S. M., Khan, J. A., & Arshad, M. I. (2018). Psychosocial-stress, liver regeneration and weight gain: A conspicuous pathophysiological triad. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(1), 1–8.
- Jasicka-Misiak, I., Makowicz, E., & Stanek, N. (2017). Polish yellow sweet clover (*Melilotus officinalis* L.) honey, chromatographic fingerprints, and chemical markers. *Molecules*, 22(1), 138.
- Joung, J. Y., Cho, J. H., Kim, Y. H., Choi, S. H., & Son, C. G. (2019). A literature review for the mechanisms of stress-induced liver injury. *Brain and Behavior*, 9(3), e01235. <https://doi.org/10.1002/brb3.1235>
- Kang, D., Zhao, D., Ryu, S., Guallar, E., Cho, J., Lazo, M., ..., & Sung, E. (2020). Perceived stress and non-alcoholic fatty liver disease in apparently healthy men and women. *Scientific Reports*, 10(1), 38.
- Karimi Dehkordi, M., Rezaei, F., & Almasi, M. (2021). Investigating the effect of lemon balm and nail extracts on liver function and physiological changes in rats. *Journal of Animal Biology*, 14(3), 99–109 (in Persian).
- Mesquita, M., Pedroso, T. F., Oliveira, C. S., Oliveira, V. A., dos Santos, R. F., Bizzi, C. A., & Pereira, M. E. (2016). Effects of zinc against mercury toxicity in female rats 12 and 48 hours after HgCl₂ exposure. *EXCLI Journal*, 15, 256–271. <https://doi.org/10.17179/excli2016-107>
- Moradi, M., Shakerian, S., & Nikbakht, M. (2019). The effect of eight weeks of high-intensity interval training and crocin consumption on oxidative stress in liver tissue of male rats induced by chronic doxorubicin. *Feiz Journal of Kashan University of Medical Sciences*, 23(5), 485–494. (in Persian)
- Nameni, F., Akbari, G., Hadavand, V., Entezari, H., Molaii, S., & Ghadami, N. (2024). Effect of *Melilotus* Extract and Exercise on Oxidative Stress and Neuroinflammation in an Alzheimer's Mouse Model. *Jentashapir Journal of Cellular and Molecular Biology*, 15(2), e146344.
- Noushad, S., Ahmed, S., Ansari, B., Mustafa, U. H., Saleem, Y., & Hazrat, H. (2021). Physiological biomarkers of chronic stress: A systematic review. *International Journal of Health Sciences*, 15(5), 46–59.
- Pu, X., Lu, C., Yang, X., He, H., Chen, X., Wang, R., ..., & Li, Y. (2025). Unveiling the hepatoprotective mechanisms of *Desmodium heterocarpon* (L.) DC: Novel flavonoid identification and Keap1/Nrf2 pathway activation. *Phytomedicine*, 136, 156323.
- Raeeszadeh, M., Moradi, M., Ayar, P., & Akbari, A. (2021). The antioxidant effect of *Medicago sativa* L. (alfalfa) ethanolic extract against mercury chloride (HgCl₂) toxicity in rat liver and kidney: an in vitro and in vivo study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, Article ID.
- Raeeszadeh, M., Mortazavi, P., & Atashin-Sadafi, R. (2021). The antioxidant, anti-inflammatory, pathological, and behavioural effects of *Medicago sativa* L. (Alfalfa) extract on brain injury caused by nicotine in male rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, Article ID.
- Roshanas, F., Ashrafi, N., Amin Lari, M., & Talibanzadeh, S. (2018). Investigating the effect of saffron aqueous extract on oxidative stress parameters and important biochemical enzymes of liver tissue in streptozotocin-treated diabetic rats. *Journal of Arak University of Medical Sciences*, 21(5), 77–87.
- Sadeghi, T., Shariati, M., & Mokhtari, M. (2016). The effect of hydroalcoholic extract of *Passiflora* leaf on liver function tests in adult male rats. *Journal of Animal Biology*, 8(4), 85–96. (in Persian)
- Schepetova, E., Abdurakhmanova, N., Lomteva, N., Kondratenko, E., & Kasimova, S. (2021). Pharmacological effects at the chronic administration of *Melilotus officinalis* L. extract. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 848(1), 012345.

- Servatyari, K., Ahmadi, A., Kashefi, H., Manbari, M. N., Rostami, A., & Moulodi, M. R. (2017). The effect of hydroalcoholic extract of *Medicago sativa* on liver function tests, blood biochemical factors and coagulation system in male rats. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, 21(6), 16–26. (In Persian)
- Shen, Y., et al. (2025). Schisandrin C Improves Chronic Stress-Induced Dyslipidemia in Mice by Regulating Pyroptosis and Autophagy Levels. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, e2501041.
- Soto-Angona, Ó., Anmella, G., Valdés-Flórida, M. J., De Uribe-Viloria, N., Carvalho, A. F., Penninx, B. W., & Berk, M. (2020). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) as a neglected metabolic companion of psychiatric disorders: Common pathways and future approaches. *BMC Medicine*, 18(1), 261.
- Unsal, V. (2018). Natural phytotherapeutic antioxidants in the treatment of mercury intoxication—A review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 8(3), 365–376.
- Yener, M. D., Çolak, T., Özsoy, Ö. D., & Eraldemir, F. C. (2024). Alterations in Catalase, Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Malondialdehyde Levels in Serum and Liver Tissue Under Stress Conditions. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*, 87(2), 145-152.