Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 36, No. 5, Dec. – Jan. 2014, Pages: 80-87

Hepatoprotective Effects of Kombucha Tea and Silymarin Against Thioacetamide Induced Liver Toxicity in Rats

Najmeh Kabiri[1*], Mahboobeh Ahangar Darabi[2]

[1]Department of Biology, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
[2]Department of Biology, School of Sciences, Isfahan University, Isfahan, Iran

Received: 16 Nov, 2013 Accepted: 8 Jan, 2014

Abstract

Background and Objectives: Silybum marianum and Kombucha tea contain thousands of antioxidant compounds, which known as a drug, used for hepatoprotective agent. Liver exposes to many of oxidant and carcinogen agents; therefore; the antioxidant compounds are beneficial for its natural health. In this study the hepatoprotective effects of silymarin and Kombucha tea against Thioacetamide (TAA) induced liver toxicity in wistar rats were investigated and compared.

Materials and Methods: In this experimental study we used 35 male white wistar rats and they were categorized into seven groups: (I), treated with thioacetamide (TAA) for 3 weeks (II), treated with TAA and silymarin (400mg/kg) (for 3 weeks)(III), treated with silymarin (400mg/kg) then were treatment TAA (for 3 weeks)(IV), treated with TAA and silymarin (200mg/kg) (for 3 weeks)(V), treated with TAA and Kombucha tea (50mg/kg) (for 3 weeks), treated with TAA, silymarin and Kombucha tea (for 3 weeks).

Results: TAA significantly has increase Aspartate aminotransferase **(**AST), Alanine Transaminase (ALT), Alkaline Phosphatase (ALP), Lactate Dehydrogenase (LDH) but not the same for bilirubin. The treatment by silymarin and Kombucha tea produced a significant reduction in serum enzyme levels (AST, ALT, ALP, LDH) and reduction in bilirubin content.

Conclusion: The results show that the protective effects of silymarin and Kombucha tea against the thioacetamide induced hepatotoxicity that may be due to the existence of polyphenol substances in the plants, these substances have an antioxidant function.

Keywords: Hepatoprotective, Thioacetamide, Silymarin, Kombucha tea, Rat

*Corresponding author:
E-mail: kabiri_s97@yahoo.com

مقاله پژوهشی

اثرات محافظت کبدی چای کومبوجا و خارمریم بر مسمومیت ناشی از تیمار با تیواستامید در موش های صحرایی

نجمه کبیری[۱*]، محبوبه آهنگر دارابی[۲]

[۱]کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
[۲]کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

دریافت: ۹۲/۸/۲۵ پذیرش: ۹۲/۱۰/۱۸

چکیده

زمینه و اهداف: خارمریم و چای کومبوجا از گیاهان دارویی حاوی هزاران ترکیب آنتی اکسیدان می باشند که به عنوان یک عامل حفاظت کبدی استفاده می شوند. کبد یکی از اندامهای مهم در بدن که همواره در معرض عوامل اکسیدان و کارسینوژن قرار دارد و بنابراین ترکیبات آنتی اکسیدان برای سلامتی کبد موثر هستند. در این مطالعه اثر خارمریم و چای کومبوجا بر مسمومیت کبدی ناشی از تیواستامید بررسی شده است.

مواد و روشها: در این مطالعه ۳۵ موش صحرایی در ۷ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (گروه ۱)، گروه تیمار شده با تیو استامید(۴۰۰mg/kg) برای سه هفته (گروه ۲)، گروه تیمار شده با تیو استامید و سپس سیلی مارین(۴۰۰mg/kg) برای سه هفته (گروه ۳)، گروه تیمار شده با سیلی مارین (۴۰۰mg/kg) و سپس تیو استامید برای سه هفته (گروه ۴)، گروه تیمار شده با تیو استامید و سپس سیلی مارین (۲۰۰mg/kg) برای سه هفته(گروه ۵)، گروه تیمار شده با تیو استامید و سپس چای کومبوجا (۵۰mg/kg) (گروه ۶) و گروه تیمار شده با تیو استامید و سپس ترکیب خارمریم وچای کومبوجا به مدت سه هفته(گروه ۷).

یافته ها: تیواستامید موجب افزایش سطح افزایش معنی دار آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز (ALP)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) و آلانین ترانسفراز (ALT) و بیلی روبین توتال در گروه کنترل منفی نسبت به گروه کنترل شد. در حالی که درمان با خار مریم و کومبوجا موجب کاهش قابل ملاحظه ای در سطح سرمی آنزیمها (AST, ALT, ALP , LDH) و کاهش سطح بیلی روبین شد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که اثر حفاظتی خارمریم و چای کومبوجا علیه تیواستامید احتمالا" به دلیل وجود ترکیبات پلی فنلی در این گیاهان و عملکرد آنتی اکسیدانی می باشد.

کلید واژها: حفاظت کبدی، تیواستامید، خارمریم، چای کومبوجا، موش

*ایمیل نویسنده رابط: kabiri_s97@yahoo.com

مقدمه

کبد بعنوان یکی از مهمترین اندامهای بدن، که نقش حیاتی در تنظیم پروسه های فیزیولوژی در بدن دارد. کبد در چندین فعالیت حیاتی مربوط به متابولیسم در انسان نقش دارد. بنابراین هر گونه آسیب دیدگی کبد عواقب خطرناکی را به دنبال دارد (۲و۱). بیش از ۲۰۰۰۰ ماده شیمیایی متفاوت که توسط انسان ساخته شده در محیط زندگی وجود دارد. اکثر این ترکیبات در بدن انسان متابولیزه می‌گردند و کبد عضو اصلی است که در این فرایند شرکت می‌کند (۳). یکی از این ترکیبات بیگانه که در صنعت کاربرد زیادی دارد تیواستامید (TAA) است. TAA به صورت پودر سفید یا بی رنگ با بوی ملایمی از مرکاپتان است. این ماده قابل حل در آب و اتانول و به طور اندکی قابل حل در اتر می‌باشد. زمانی که برای تجزیه گرم شود، گازهای سمی اکسیدهای نیتروژن و اکسیدهای سولفور آزاد می‌کند (۴). آلودگی به TAA از طریق تماس با محصول‌هایی که این ماده در آن‌ها به کار رفته است و یا از طریق استنشاق ایجاد می‌شود (۵). TAA باعث تخریب سلول‌های کبدی و القاء سیروز می‌گردد. این ماده یک سم کبدی است و روی سنتز DNA، RNA، پروتئین و محتوای گلوتاتیون تاثیر می‌گذارد که تغییرات درون کبدی را القاء می‌کند (۶).

Ledda-Columbano و همکاران در ۱۹۹۱ در مطالعات هیستوشیمیایی کبد نشان دادند که TAA موجب مرگ سلولهای کبدی می شود (۷).

در دهه‌های اخیر افزایش مصرف مواد را دارویی، شیمیایی و آلودگی‌های ناشی از زندگی شهرنشینی، کبد که یک عضو حیاتی است در معرض خطر جدی قرار داده است. در حال حاضر، سیروز و فیبروز کبدی از مشکلات جهانی محسوب می‌شوند و داروهای شمیایی رایج مورد استفاده برای درمان این بیماری‌ها، خود دارای عوارض جانبی بسیاری هستند (۸). بررسی‌های سال‌های اخیر نیز اثرات درمانی و بخصوص اثر آنتی اکسیدانی بسیاری از ترکیب‌های گیاهی از جمله فلاونوئیدها را اثبات کرده است. یکی از گیاهان با خاصیت آنتی اکسیدانی، گیاه دارویی خارمریم می‌باشد. گیاه خارمریم از تیره کاسنی با نام علمی Silibum marianum می‌باشد، که بذر و میوه آن دارای خاصیت دارویی می‌باشد (۹).

گیاه خار مریم از تیره کاسنی با نام علمی *Silybum marianum* و نام انگلیسی Milk thisyle و با نام‌های ماری تیغال، خار علیص و عکوب در فارسی و عبری شناخته می‌شود (۹). عصاره بذر این گیاه دارای ۴-۱ درصد سیلی مارین است که شامل فلاونوئیدها از جمله سیلی‌بین A و B، سیلی‌دیانین، سیلی‌کریستین و دی هیدروسیلی‌بین است (۱۰). سیلی‌بین موثرترین ماده موجود در سیلی‌مارین است که به عنوان آنتی اکسیدان و محافظ کبد شناخته شده است. Yang و همکاران در ۲۰۰۳ نشان داد که سیلی بین و سیلی مارین بازدارنده رشد سلولها سرطانی در in vitro می باشند (۱۱). کومبوجا یک چای تخمیری سنتی است که دارای گذشته‌ای چندین هزار ساله در شرق می‌باشد و امروزه در غرب نیز کاملاً رایج شده است. محصول نهایی حاصل از فرآیند تهیه آن، یک نوشیدنی اندکی شیرین و اسیدی متشکل از شکر، اسیدهای آلی، اجزاء چای، ویتامین‌ها و مواد معدنی شبیه آب سیب می‌باشد. قارچ کومبوجا یا قارچ منچوری شبیه قارچ‌های معمولی نیست بلکه اجتماعی از چند مخمر و باکتری (*Acetobacter xylinum*) است که آن را برای رشد در چای قرار می‌دهند (۱۷-۱۵). متابولیت‌های اصلی شناسایی شده در نوشیدنی تخمیر شده به این ترتیب می‌باشد: اسیدهای لاکتیک، استیک، گلوکونیک و گلوکورونیک و اتانول وگلیسرول. غلظت و ترکیب متابولیک به منبع قارچ چای، غلظت شکر و دوره زمانی تخمیر بستگی دارد. فرآیند تخمیر، سنتز کمپلکس ویتامین‌های B و اسید فولیک را القاء می‌کند. پلی فنول‌های چای [اپی‌گالوکاتچین گالات (EGCG)، اپی‌گالوکاتچین (ECG)، اپی‌کاتچین (EC) و تئوفیلین (TF)] و اسیدهای آلی اجزاء فعال در چای کومبوجا می‌باشد که دارای گستره‌ای از اثرات مفید می‌باشد (۱۵و۱۶).

اثرات مفید چای کومبو جا به دلیل وجود پلی فنلها، گلوکونیک اسید، لاکتیک اسید، ویتامین ها آمینو اسیدها آنتی بیوتیک ها و سایر مواد مغذی که در طی فرایند تخمیر ایجاد شده اند (۱۷).

مواد و روش ها

بذر گیاه خارمریم از اداره منابع طبیعی اصفهان تهیه شد. در مرحله بعد گیاه خارمریم در هرباریوم گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان به کمک گیاه‌شناسان گروه و کتاب های رده بندی گیاهی شناسایی شد. به منظور تهیه عصاره از بذر گیاه خارمریم استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ گرم بذر خرد شده با ۳۰۰ میلی‌لیتر الکل اتانول ۹۶٪ (۲۴ ساعت) روی دستگاه تکان دهنده قرار داده شد و سپس محلول صاف شد و به تفاله آن ۳۰۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰٪ (۲۴ ساعت) اضافه و روی دستگاه تکان دهنده قرار داده شد. محلول‌های صاف شده با دستگاه روتاری اوپراتور تحت شرایط خلا و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد و حجم آن به یک سوم رسید، پس از آن با کلروفرم دکانته و فاز آبی آن جدا گردید. محصول نهایی بدست آمده در دمای مناسب و شرایط استریل خشک شد. برای تهیه چای کومبوجا ۹ لیوان آب را در جوشانده، سپس از روی شعله برداشته و ۲ عدد چای کیسه‌ای به آن اضافه گردید. پس از کمی سرد شدن ۸۰ گرم شکر به آن شد و سپس در ظرف بلور یا چینی ریخته و قارچ بر روی آن قرار داده شد (چون این قارچ به اکسیژن زیادی نیاز دارد، هر چه سطح تخمیر بزرگ‌تر باشد امکان رشد بهتری دارد). روی ظرف با پارچه تمیز پوشانیده و در داخل انکوباتور با دمای درجه سانتیگراد به مدت یک هفته قرار داده شد. پس از این مدت زمان، چای آماده استفاده می‌باشد.

به منظور انجام آزمایش‌ها از موش های صحرایی نر سفید بالغ با نام علمی *Rattus norvegicus allevias* از نژاد ویستار (Wistar) استفاده شد. موش‌های صحرایی از لانه حیوانات دانشکده پزشکی اصفهان خریداری و در لانه حیوانات زیست شناسی دانشگاه اصفهان نگهداری شدند. وزن موش‌های صحرایی ۳۰۰-۲۲۰ گرم بود. درجه حرارت لانه حدود ۲۳ درجه سانتیگراد به همراه رطوبت مناسب و نور کافی تنظیم شد. قفس‌ها قبل از شروع آزمایش به منظور ضدعفونی شدن با فرمل ۵٪ شسته شدند. تغذیه موش‌های صحرایی با استفاده از مواد غذایی حبه‌ای آماده استاندارد شامل ۲۰٪ پروتئین، ۵۰٪ نشاسته، ۱۰٪ سلولز، ۱۵٪ چربی و مقداری مواد افزودنی مثل ویتامین‌ها انجام گردید.

گروه بندی موش‌های صحرایی

این آزمایش از ۳۵ عدد رت نر سفید نژاد ویستار (۲۵۰-۱۸۰ گرم) استفاده شد. رت‌ها در شرایط استاندارد و یکسان از نظر آب و غذا و رطوبت مناسب و با چرخه روشنایی/ تاریکی ۲۴ ساعته نگهداری شدند. سپس به ۵ گروه به تصادف به ترتیب زیر تقسیم شدند:

گروه ۱: شاهد- تزریق درون صفاقی سرم فیزیولوژی (n=۵)

گروه۲: کنترل مثبت- تزریق درون صفاقی تیواستامید (mg/kg ۴۰۰) به مدت دو هفته و سه روز در میان (n=۵)

گروه۳:تزریق درون صفاقی (۴۰۰mg/kg) TAA، تزریق درون صفاقی عصاره خارمریم (۴۰۰mg/kg) به مدت سه هفته(n=۵)

گروه۴: تزریق درون صفاقی عصاره خارمریم (۴۰۰mg/kg) به مدت سه هفته، تزریق درون صفاقی TAA (۴۰۰mg/kg) (n=۵)

گروه۵: تزریق درون صفاقی (۴۰۰mg/kg) TAA، تزریق درون صفاقی عصاره خارمریم (۲۰۰mg/kg) به مدت سه هفته (n=۵)

گروه ۶: تزریق درون صفاقی (۴۰۰mg/kg) TAA، سپس تیمار با چای کومبوجا (۵۰ mg/kg) به مدت سه هفته (به عنوان نوشیدنی) (n=۵)

گروه ۷: ابتدا تیمار با(۴۰۰ mg/kg) TAA و سپس تیمار با چای کومبوجا و خارمریم (۴۰۰ mg/kg) به صورت همزمان به مدت سه هفته (n=۵)

موش‌های صحرایی هر کدام به طور جداگانه توزیق و روی دم، سر و بدن علامت گذاری شدند. تزریق به طور درون صفاقی انجام شد. هم چنین تمام گروه‌ها به صورت یک روز در میان وزن گردیدند. میزان آب و غذای مصرفی گروه‌ها نیز به طور روزانه اندازه گیری شد. به منظور مشخص کردن دوز مناسب برای TAA و خارمریم ابتدا چند سری آزمایش مقدماتی بر روی موش‌های صحرایی انجام گرفت. با توجه به مطالعات انجام شده بر روی آزمایش‌های قبلی که از دوز پایین TAA برای ایجاد آسیب کبدی و دوز پایین عصاره خارمریم برای سنجش اثر حفاظتی آن بر روی کبد استفاده گردید، در این تحقیق دوز بالای (۴۰۰mg/kg) TAA انتخاب شد؛ به این دلیل که از یک طرف این دوز کشنده نیست و از طرف دیگر باعث ایجاد تغییرات بسیار شدید در کبد می‌گردد. تزریق‌ها به طور درون صفاقی و در ساعات مشخصی از روز انجام گرفت. به منظور یکسان کردن اثر شوک حاصل از تزریق به گروه شاهد به اندازه حجم تزریق شده به سایر گروه‌ها، سرم فیزیولوژی تزریق شد.

برای خونگیری از قلب، ابتدا حیوانات با کلروفرم بیهوش شده، سپس قفسه سینه باز و به طور مستقیم از قلب خون گرفته شد. بعد از حدود ۲۰ دقیقه نمونه‌های خون سانتریفوژ گردید و پلاسما جدا شد. نمونه‌های سرم بدست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. آلکالین فسفاتاز (ALP)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آلانین ترانسفراز (ALT) و بیلی روبین با استفاده از کیت های آزمایشگاهی زیست شیمی اندازه گیری گردید. پس از پایان دوره آزمایش، تمام رات‌ها با کلروفرم بیهوش شدند. پس از کالبد گشایی کبد آن‌ها برداشته و در فرمالین بافر خنثی ۱۰٪ تثبیت شد. پس از گذراندن مراحل آماده سازی بافتی و تهیه بلوک‌های پارافینی، مقاطعی به ضخامت ۶ میکرون بریده شد و به روش هماتوکسیلن و ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شدند. نتایج بدست آمده از تغییرات آنزیم‌های کبدی در گروه‌های کنترل و تیمار به وسیله نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و میانگین‌ها با استفاده از آزمون T-test با یکدیگر مقایسه گردید.

نتایج

آزمون آنالیز واریانس نشان داد که مقدار وزن بدن درگروه کنترل نسبت به کنترل منفی دارای تفاوت معنی داری است ($p<۰/۰۵$) و این مقدار فقط در گروه ۷ (درمانی خارمریم+ کومبوجا) با گروه کنترل منفی و در گروه ۴ با گروه کنترل منفی معنی دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

همچنین مقدار وزن کبد در گروه کنترل نسبت به کنترل منفی تفاوت معنی داری نشان نداد ($p>۰/۰۵$) و این مقدار در سایر گروه ها نیز نسبت به گروه کنترل منفی اختلاف معنی داری نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

درصد میانگین وزن کبد به میانگین وزن بدن در گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی داری را با گروه کنترل منفی نداشت (۰/۰۵ >p).

میزان فعالیت آنزیم هایALT، ALP و AST در گروه کنترل نسبت به گروه کنترل منفی معنی دار می باشد ($p<۰/۰۵$) و مقدار فعالیت آن در گروه‌های دیگر نیز با گروه کنترل منفی تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد ($p<۰/۰۵$). میزان آنزیم LDH در گروه کنترل با کنترل منفی معنی دار نبود ($p>۰/۰۵$) و میزان آنزیم LDH در گروه۴ (پیشگیری خارمریم)، گروه ۵(درمانی خارمریم با دوز ۲۰۰mg)، گروه۶ (کومبوجا) و گروه ۷ (خارمریم+ کومبوجا) تفاوت معنی داری با گروه کنترل منفی داشت ($p<۰/۰۵$). آزمون آنالیز واریانس مشخص نمود که مقدار بیلی‌روبین در گروه کنترل نسبت به گروه کنترل منفی معنی دار نیست ($p<۰/۰۵$) و مقدار آن در سایر گروه‌ها نیز با گروه دوم تفاوت معنی داری را نشان نداد ($p>۰/۰۵$)(جدول ۳-۱).

همانطور که در شکل ۱-۱ دیده می‌شود بافت کبد در گروه کنترل، طبیعی است؛ هسته‌ها در اندازه واقعی هستند و اثری از ضایعاتی نظیر آپوپتوز، سیتولیز و میتوز دیده نمی‌شود. بررسی‌های بافت شناسی در گروه تیمار شده با TAA (شکل۲-۱) نشان می‌دهد که این ماده شیمیایی باعث تغییرات شدیدی در بین سلول‌های کبدی می‌گردد. تغییرات مشاهده شده شامل افزایش تعداد میتوز و سلول‌های آپوپتوزی، تعدد هستک‌ها، بزرگ شدن سلول‌ها و هسته آن‌ها، اسیدوفیل شدن سیتوپلاسم، غیر طبیعی بودن میتوز و سیتولیز می‌باشد. این ضایعات بیشتر در اطراف سیاهرگ‌های مرکزی مشاهده گردید و در فضای پورت نیز واکنش‌های التهابی به ندرت دیده شد. هم‌چنین علاوه بر مطالعه بر روی هپاتوسیت‌ها مطالعاتی بر روی سلول‌های مجاری صفراوی انجام گرفت که بازوفیلی سیتوپلاسم سلول‌های مجاری صفراوی، واکوئولیزه شدن سیتوپلاسم و تغییراتی در اندازه و شکل آن‌ها (که در اثر تیمار با TAA ایجاد می‌گردند) مشاهده نگردید.

تمام گروه‌های تیماری دارای اثر حفاظتی بر روی سلول‌های کبدی می‌باشند که در تمامی آن‌ها تعداد میتوز و آپوپتوز کاهش یافت. اندازه هسته‌ها به حالت طبیعی برگشت و التهاب نیز کمتر مشاهده گردید. در گروه درمان خارمریم هنوز تعدادی از سلول‌ها دارای هسته درشت می‌باشند و میتوز هم تا حدودی مشاهده شد ولی آپوپتوز وجود ندارد (شکل۳-۱).

در گروه ۴ (پیشگیری خارمریم) هنوز تعدادی از سلول‌ها دارای میتوز می‌باشند و تعدادی از هسته‌ها نیز درشت هستند ولی آپوپتوز وجود ندارد (شکل۴-۱).

در گروه۶ (درمانی کومبوجا) هنوز میتوز و بزرگ شدن هسته سلول‌ها وجود دارد ولی آپوپتوز وجود ندارد (شکل۶-۱).

در گروه ۷ (کومبوجا + خارمریم) نیز آپوپتوز و میتوز وجود ندارد ولی تعدادی از هسته‌ها هنوز بزرگ هستند (شکل ۷-۱).

به منظور مقایسه کمی، گروه‌های تیماری بر اساس متغیرهای مهم در آسیب کبدی ایجاد شده با TAA (تعداد میتوز و آپوپتوز، بزرگ شدن هسته، التهاب فضای پورت، نکروز پری پورتال و نکروز در سایر نواحی درجه بندی گردیدند که از بین این متغیرها التهاب در فضای پورت چندان اهمیت ندارد، چون در تمام گروه‌ها تا حدود زیادی مشابه می‌باشد. نوع درجه بندی بر اساس هر متغیر مطابق با جدول های ذیل می باشد که در هرگروه تیماری میزان درجه بنابر هر متغیر تعیین شد و سپس این درجه‌های تعیین شده با یکدیگر جمع گردید و در نهایت نوع درجه بافت بر اساس متغیرهای

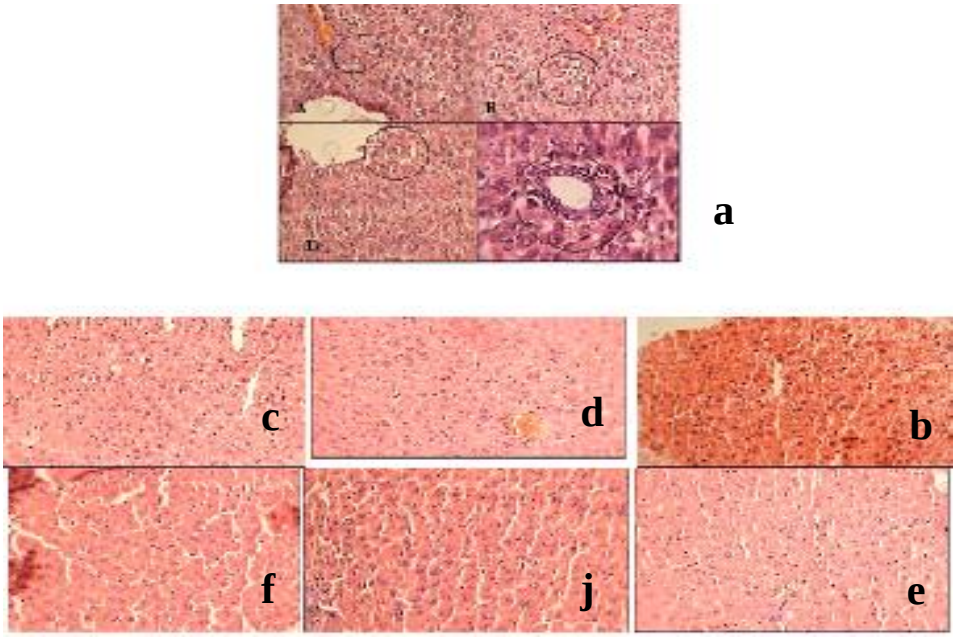
مذکور تعیین شد. در هر گروه آزمایشی میزان هر یک از متغیرها با توجه به درجات آن‌ها تعیین شد و نتایج زیر به دست آمد که گروه کنترل مثبت (تیمار شده با TAA) دارای بیشترین تغییرات تخریب کبدی و بالاترین درجه و گروه ۷ (کومبوجا+سیلی مارین) دارای کمترین درجه و در نتیجه بهترین اثر حفاظتی بر روی کبد را دارا می‌باشد (جدول ۲-۱).

جدول ۱-۱- میزان درجه بندی بافت‌ها

درجه	تعداد میتوز	تعداد آپوپتوز	بزرگ شدن هسته ها	نکروز در اطراف فضای پورت	نکروز در سایر نواحی	درجه التهاب
۰	نبود میتوز	نبود آپوپتوز		وجود نداشت	وجود نداشت	فاقد التهاب
۱	۱-۳	۱ یا کمتر	یک سوم سلول‌ها دارای هسته درشت	خفیف	کانونی	خفیف
۲	۳-۵	۲-۴	نیمی از سلول‌ها دارای هسته درشت	متوسط	در اطراف سیاهرگ‌های مرکزی در بعضی سیاهرگ‌ها	متوسط
۳	<۵	۵-۱۰	تمام سلول‌ها دارای هسته درشت	شدید	در اطراف سیاهرگ‌های مرکزی در اکثریت سیاهرگ‌ها	شدید
۴		<۱۰				

جدول ۲-۱- درجه بندی بافت‌های کبدی در گروه‌های آزمایشی بر اساس متغیرهای مذکور

درجه تعیین شده	گروه های تیمار شده
۱۵	گروه ۲: کنترل مثبت
۶	گروه ۳: درمانی خارمریم (۴۰۰mg/kg)
۷	گروه ۴: پیشگیری خارمریم (۴۰۰mg/kg)
۶	گروه ۵: درمانی خارمریم (۲۰۰mg/kg)
۴	گروه ۷: گروه توام کومبوجا و خارمریم
۶	درمانی کومبوجا



شکل b- برش بافت کبد درگروه کنترل (با بزرگنمایی ۴۰). بافت کبد طبیعی، هسته و هستک‌ها در اندازه طبیعی خود هستند و میتوز و آپوپتوز نیز دیده نمی‌شود.
شکل a: A. برش بافت کبد در گروه کنترل منفی که میتوز غیرطبیعی را نشان می‌دهد (با بزرگنمایی ۴۰). B. برش بافت کبد درگروه کنترل منفی که نشان‌دهنده آپوپتوز است (با بزرگنمایی ۴۰). C. برش بافت کبد درگروه کنترل که التهاب در اطراف فضای پورت را مشخص کرده است (با بزرگنمایی ۱۰۰). D. برش بافت کبد درگروه کنترل منفی که وجود میتوز در سلول‌ها را نشان می‌دهد (با بزرگنمایی ۴۰).
شکل c- برش بافت کبد در گروه درمانی خارمریم (۴۰۰mg/kg) (با بزرگنمایی ۴۰) که هنوز تعدادی از هسته‌ها بزرگ می‌باشند.
شکل d- برش بافت کبد در گروه پیشگیری خارمریم (با بزرگنمایی ۴۰). تعدادی ازسلول‌ها هنوز دارای هسته درشت می‌باشند و میتوز هم دیده شد ولی آپوپتوز وجود ندارد.
شکل e- برش بافت کبد درگروه درمانی خارمریم (۲۰۰mg/kg) (با بزرگنمایی ۴۰) که میتوز و هسته درشت در برخی سلول‌ها مشاهده شد. آپوپتوز مشاهده نگردید.
شکل f- برش بافت کبد درگروه درمانی کومبوجا (با بزرگنمایی ۴۰) که هسته‌ها و هستک‌ها کوچک شده و آپوپتوز دیده نمی‌شود. ولی تعداد اندکی از هسته‌ها درشت هستند.
شکل j- برش بافت کبد درگروه توام کومبوجا+خارمریم (با بزرگنمایی ۴۰) که هنوز بعضی از هسته‌ها درشت می‌باشند. آپوپتوز وجود ندارد.

جدول شماره ۳-۱ -مقادیر مربوط به پارامترهای بیوشیمیایی بافت کبد و وزن بدن و کبد

پارامترهای بیوشیمیایی	گروههای آزمایش						
	گروه۱	گروه۲	گروه۳	گروه۴	گروه۵	گروه۶	گروه۷
ALT (U/L)	۱۴۸±۲۶.۰۵	*۷۶۷±۱۶.۹۷	**۸۹.۶۰±۱۷.۶۵	**۲۰۲.۷۵±۴.۹۹	**۲۷۵±۱۴.۸۶	**۱۲۵۶.۶۷±۳.۰۵	**۱۲۵±۲۹.۱۰
AST (U/L)	۱۸۴.۳۳±۶۲.۳۲	*۶۵۳±۵۳.۰۳۳	**۱۲۵.۸۰±۶.۳۰	**۲۹۶.۲۵±۶۱.۰۴۰	**۳۵۴±۱۱.۸۹	**۱۳۰.۶±۱۴.۵۷	**۲۰۳.۶۷±۴۱.۴۲
ALP (U/L)	۶۱۴.۶۷±۱۹۶.۳۹	*۱۵۹۳.۵±۲۱۴.۲۵	**۶۲۳.۶±۱۶۰.۹۸	**۱۱۹۹.۶۰±۱۷۲.۲۱	۸۳۶.۵**±۱۹.۱۲	**۹۴۷.۳۳±۷.۵	**۶۱۳.۳۳±۱.۵۲
LDH (U/L)	۱۱۱۶.۳۳±۷۴.۲۷	*۱۲۶۹.۰±۶.۳۶	**۸۶۲.۶۰±۲۹۸.۴۵	**۱۷۹۹±۱۳۰.۱۸	**۸۱۹.۵±۴۶.۸۳	**۸۰۸±۱۹۱.۹۰	**۷۴۱.۶۷±۱۳۳.۷۱
بیلی روبین(mg/dl)	۰.۴۸±۰.۰۲	۱.۰۵±۰.۶۳	۰.۶۳±۰.۰۴	۰.۵۵±۰.۱۴۱	۰.۴۵±۰.۱۰	۰.۵۱±۰.۰۲	۰.۴۷۵±۰.۰۲۵
میانگین وزن بدن(g)	۲۴۴.۷۶±۳۲.۷۱	*۱۹۱.۹۳±۱۰.۹۰	۱۹۶.۸۴±۲۸.۰۴	۲۱۶.۲۶±۲۱.۲۵	۱۹۱.۰۹±۱۷.۶۶	۱۸۶.۵۹±۱۸.۷۶	**۲۳۰.۰۸±۱۷.۹
میانگین وزن کبد(g)	۸.۴۷±۰.۳۲	۷.۳۸±۰.۷۲	۷.۳۸±۱.۲۱	۷.۶۸±۰.۶۴	۷.۴±۰.۹۸	۷.۸۷±۰.۵۲	۸.۰۴±۰.۲۷
میانگین وزن بدن(g)/ میانگین وزن کبد(g)	۳.۴۶±۰.۲	۳.۸۴±۰.۱	۳.۷۴±۰.۳	۳۵۵±۰.۱	۳.۸۷±۰.۱	۲.۲۴±۰.۳	۳.۴۹±۰.۴

Alanın amınotransferase (ALT), Aspartatamınotransferase (AST), Alkalınphosphatase (ALP), Lactate dehydrogenase(LDH)
بیلی روبین و
mean ± SD.*P > 0.05 vs. controls.** P > 0.05 vs. TAA

بحث

مطالعات آزمایشگاهی و بالینی متعدد حاکی از آن است که سیلی‌مارین، کبد را در برابر مسمومیت‌های ناشی از تتراکلرید کربن، استامینوفن و تتراکلرومتان محافظت می‌نماید. سیلی‌مارین قادر به خنثی کردن سمیت کبدی چندین عامل شامل Amanita phaloides ، اتانول و پاراستامول می‌باشد. سیلی‌مارین و سیلی‌بین جذب سموم نظیر فالوئیدین یا α- آمانیتین را مهار می‌کند که از اتصال آن‌ها به سطح سلول و انتقال از غشاء جلوگیری می‌کند (۱۸).

نتایج Tsai و همکاران در ۲۰۰۸ نشان داد که سیلی مارین به طور موثری موجب افزایش انحلال تترا کلرید کربن که در ایجاد فیبروز کبدنقش دارد، می گردد (۱۹).

فعالیت محافظت کبدی سیلی مارین به فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و تثبیت کنندگی غشاء توسط این ماده مربوط می‌شود و به همین دلیل است که سطوح سرمی آنزیم‌های آسیب کبدی AST و ALT به طور معنی داری در گروه‌های تیماری کاهش می‌یابد. چنان‌چه در این تحقیق نیز نتایج بیوشیمیایی نشان می‌دهد که سطح افزایش یافته آنزیم‌های AST، ALT و ALP به طور معنی داری در گروه‌های تیمار شده با خارمریم کاهش یافتند. این اثرات مثبت در گروه های درمانی و پیشگیری تقریبا یکسان می باشد و تفاوت معنی داری نیز در دو گروه درمانی مشاهده نشد.

گزارش شده است که سیلی‌مارین با مکانیسم‌های متعددی از جمله تحریک DNA پلیمراز، تثبیت غشای سلولی، مهار ریشه‌های آزاد و افزایش غلظت گلوتاتیون سلولی اثر محافظت کبدی از خود نشان می‌دهد. تحریک DNA پلیمراز توسط سیلی‌مارین موجب افزایش سنتز RNA ریبوزومی و در نتیجه بازسازی سلول‌های کبدی می‌گردد. افزایش غلظت گلوتاتیون سلولی نیز موجب تثبیت سوپراکسید دسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز سلولی می‌شود (۲۰و۲۱).

سیلی‌مارین دارای اثرات محافظت سلولی، ضد التهابی و ضد سرطانزایی می‌باشد (۲۲).

سیلی‌مارین هم‌چنین با مهار چرخه لیپوکسیژناز (۵lipoxygenase-) و مهار لوکوترین و ریشه آزاد در سلول‌های کوپفر کبد موش موجب کاهش التهاب کبدی می‌شود. به علاوه سیلی‌بین در سلول‌های هپاتوسیت موش از تولید پراکسیداسیون لیپید و آسیب سلولی پیشگیری می‌کند (۹و۲۳).

نتایج مطالعات نشان داده است که اثر سیلی مارین بر L–آرژنین که موجب آسیب ژنی در سلولهای لنفوسیت در محیط کشت می‌شود (۲۴).

Paulin و همکاران (۲۰۰۱) و SaiRam و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که چای کومبوجا از سمیت کبدی القاء شده با پاراستامول و استرس اکسیداتیو ایجاد شده با کرومات (به ترتیب) در موش‌های صحرایی سفید ممانعت می‌کند (۲۵و۲۶).

در سال ۱۹۵۱ مرکز تحقیقات سرطان شناسی علوم در مسکو دریافت که مصرف روزانه کومبوجا به مقاومت بی‌نهایت بالا نسبت به سرطان ارتباط دارد. مشاهده شده که بیمارانی که از سرطان رنج می‌برند، L– لاکتیک اسید را در بافت‌های همبندشان ندارند و دارای pH خون بالاتر از ۶ یا ۷/۵ می‌باشند. کومبوجا می‌تواند pH خون و غلظت اسید لاکتیک را تعدیل کند. به طور خلاصه می‌توان گفت که اثرات مفید کومبوجا به حضور پلی فنول‌های چای، گلوکونیک اسید، گلوکورونیک اسید، لاکتیک اسید، ویتامین‌ها، آمینو اسیدها، آنتی بیوتیک‌ها و گستره‌ای از میکرو مغذی‌های تولید شده در طول تخمیر مربوط می‌باشد (۱۵و۱۶).

در سال ۲۰۱۰ نتایج بافت شناسی نشان داد که چای کومبوجا از آسیب کبدی ناشی از آفلاتوکسین جلوگیری می‌کند (۲۷).

نتایج مطالعات Bhaltacharya و همکاران در ۲۰۱۱ نشان داد که چای کومبوجا اثر بهبود دهنده قوی تری بر فشارهای اکسیداتیو ناشی از تری بوتیل هیدرو پراکساید (TBHP) نسبت به چای سیاه دارد(۲۸). Ibrahim و همکاران در ۲۰۱۳ نشان دادند که چای کومبوجا اثر حفاظتی بر فشارهای اکسیداتیو ایجاد شده توسط کادمیم و پرتوهای گاما بر کبد و کلیه دارد (۲۹). تحقیقات Gharib در ۲۰۱۰ نشان داد که کومبوجا موجب بهبود آسیب های ناشی از آلاینده‌های محیطی مانند تری کلرو اتیلن(TCE) می شود و برای افرادی که در معرض این آلاینده‌ها می باشند مفید می باشد (۳۰).

میزان وزن کبد دراین تحقیق نشان می دهد که مقدار آن در گروه های تیماری تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارد واین مقدار درگروه پیشگیری کومبوجا نسبت به سایر گروه ها بیشتر می‌باشد.

مقایسه وزن بدن در طول آزمایش تغییرات چندانی را در بین گروه ها نشان نمی‌دهد. میانگین وزن بدن در گروه‌ها حاکی از این است که موش‌های صحرایی در گروه تیماری کومبوجا دارای وزن بیشتری نسبت به گروه تیماری خارمریم می‌باشند.

هم‌چنین در این تحقیق میزان مصرف روزانه آب و غذا نشان می‌دهد که مقادیر آن در زمان تزریق TAA کاهش یافت، اما پس از شروع دوره های تیماری با چای کومبوجا افزایش نشان می‌دهد که گروه ۷ (کومبوجا+ خارمریم) نسبت به بقیه گروه‌ها بیشتر خوردند و میزان میانگین آب و کومبوجا (در گروه‌های نوشنده کومبوجا) در گروه‌های تیماری خارمریم بیشتر از گروه‌های تیماری کومبوجا بود. هم‌چنین میانگین وزن کبد درگروه پیشگیری کومبوجا و میانگین وزن بدن در گروه درمانی کومبوجا +خارمریم نسبت به بقیه گروه‌ها بیشتر بود و میانگین وزن بدن موش‌های صحرایی در گروه درمانی کومبوجا کمتر از بقیه می‌باشد.

Jayabalonو همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که زمانی تیمار با چای کومبوجا شروع شد، یک اثر اصلی معنی دار روی مصرف غذا به تنهایی وجود داشت. موش های ماده تیمار شده بیشتر و موش‌های نر کمتر از گروه کنترل غذا خوردند. موش‌هایی که کومبوجا نوشیدند بیشتر خوردند و نوشیدند. موش‌های تیمار شده با کومبوجا طولانی‌تر از کنترل‌های تیمار نشده زندگی کردند (میانگین عمر نرها= ۲۶ روز بیشتر از کنترل و میانگین عمر ماده ها= ۱۴ روز بیشتر از کنترل). مصرف طولانی مدت کومبوجا کسب وزن را در موش‌ها متوقف کرد. یک دلیل احتمالی برای این نتیجه این است که گزانتین آزاد شده از چای متابولیسم را افزایش می‌دهد. در همین تحقیق تفاوت‌های آشکاری در مغز (کاهش)، وزن کبد (افزایش) و طول طحال (افزایش) در موش‌های تیمار شده کومبوجا مشاهده شد (۱۶) که این نتایج موید نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر می‌باشد.

نتیجه گیری

این تحقیق نشان داد که چای کومبوجا باعث کاهش معنی داری در میزان فعالیت آنزیم‌های AST، ALT، ALP می‌باشد که این نشان‌دهنده اثر حفاظتی چای کومبوجا بر روی سلول‌های کبدی آسیب دیده می‌باشد. نتایج بافت شناسی نیز موید اثر مثبت چای کومبوجا در برابر آسیب‌های ایجاد شده توسط TAA می‌باشد که این اثر در گروه پیشگیری بهتر از گروه درمانی مشاهده شد. نتایج بافت شناسی و بیوشیمیایی نشان دادند که گروه پیشگیری کومبوجا نسبت به بقیه گروه‌ها نیز دارای اثرات حفاظتی بهتر و بیشتری بر روی سلول‌های کبدی آسیب دیده می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این پژوهش در قالب طرح شمار ه ۸۱۱۲۳ با حمایت مالی دانشگاه اصفهان و مرکز قلب و عروق انجام شده است .بدین وسیله از تمام کسانی که به هر نحوی در انجام این طرح مارا یاری نمودند قدردانی می‌شود.

References

1. Shahani S. Evaluation of hepatoprotective efficacy of APCL-A poly-herbal formulation in vivo in rats. *Indian Drug* 1999; **36**: 628-631.
2. Subramoniam, A, Pushpangadan P. Development of phytomedicine for liver diseases. Indian *Journal of Pharmacology* 1999; **31**: 166-175.
3. Czekaj P. Moleculare and cellular mechanisms of chemically induced hepatocarcinogenesis. *Environmental Studies* 2004; **5**: 477-486.
4. Aftab A, Pillai K, Najmi Sh, Pal SN, Balani D. Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post-treaetment against thioacetamide induced hepatic damage. *Ethno pharmacology* 2002; **19**: 35-41
5. Mehmetic G, Ozdemirler G, Koak N, Cerikbas V, Vysal M. Role of carnosine in preventing thioacetamide-induced liver injury in the rat. *Peptid* 2007; In press.
6. Fan S, Chen H, Wang Ch, Tseng W, Hsu H, Weng Ch. Toona Sinensis Roem (Meliaceae) leaf extract alleviates liver fibrosis via veducing TGF β1 and collagen. *Food and Chemical Toxicology* 2007; **45**: 2228-2236.
7. Ledda-Columbano G.M, Coni P, Curto M, Giacomini L, Faa G, Oliverio S, et.al. Induction of two different modes of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide. *Am J Pathol* 2007; **139**: 1099-1109.
8. Lukivskaya O, Knas M, Dudzik D, Borzim-Kluczyk M, Lis R, Buko V, et.al. Effects of statins on liver fibrosis reversibility and activities of lysosomal exoglycosidases. *Experimental & Clinical Hematology* 2007; **3**: 14-17.
9. Kiruthigu PV, Shafreen RB, Pandian SK, Aruma MS, Gorinda S, Pandimaderi K. Protective effect of silymarin on erythrocyte haemolysate against benzo(a)pyren and exogenous reactive oxygen species (H_2O_2) induced oxidative stress. *Chemospher* 2007; **68**: 1511-1518.
10. Hassan EF, Khamis E, El-Kimary E, A.baray M. Development of differentiation of silymarin/vitamin E acetate mixture in pharmaceuticals. *Talanta* 2007; **9265**: 1-6.
11. Li Y, Su JJ, Qin L, Yang Ch, Luo D, Ban K, et.al. Chemo preventive effect of oltipraz on AFB1-induced patocarcinogenesis in tree shrew model. *World Journal of Gastroenterology* 2000; **6**: 647-650.
12. Kurtzman CP, Robertt CJ, Basehoar-Powers E. Zygosaccharomyces kombuchaensis, new ascosporogenous yeast from kombucha tea. *FEMS Yeast Research* 2001; **1**: 133-138.

13. Toeh A, Heard G, Cox J. Yeast ecology of kombucha fermentation. International *Journal of Food Microbiology* 2004; **95**: 119-126.
14. Malbaša R, Lončar ES, Vitas JS, Ćanadanović-Brunet JM. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry* 2011: **127**: 1727-1731.
15. Dufresne C, Farnworth E. Tea, kombucha and health: a review. *Food Res Int* 2000; **33**: 409-421.
16. Jayabalon R, Marimuthu S, Swaminathan K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry* 2007; **102**: 392-398.
17. Vijayaraghavan R, Singh M, Rao PV L, Bhattacharya R, Kumar P, Sugendran K, et.al. Subacute (90 days) oral toxicity studies of Kombucha Tea. *Biomedical and Environmental Sciences* 2000; **13**: 293-299.
18. Fraschini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of silymarin. *Clin Drug Invest* 2002; **22**: 51-65.
19. Tsai JH, Liu J Y, Wu TT, Ho PC, Huang CY , Shyu J, et al. Effects of silymarin on the resolution of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Journal of Viral Hepatitis* 2008; **15**: 508-514
20. Han M, Yoon W, Lee H, Han S-B, Lee K, Park S-K, et.al. Tropical application of silymarin reduces chemical-induced irritant contact dermatitis in BALB/C mice. *International Immunopharmacology* 2007; **7**: 1651-1658.
21. Wu J, Lin L, Hang Sh, Chi CH, Tsai T. Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. Journal of *Pharmaceutical and Biochemical Analysis* 2007; **45**: 635-647.
22. Bongiovanni GA, Soria EA, Eynard AR. Effects of the plant flavonoids silymarin and quercetin on arsenite-induced oxidative stress in CHO-K1 cells. *Food and Chemical Toxicology* 2007; **45**: 971-976.
23. Subramanian S, Vaughn K, Juliecarrier D, Clausen E. Pretreatment of milk thistle seed to increase the silymarin yeild: an alternative to petroleum ether defatting. *Bioresource Technology* 2007; In press.
24. Yurtcu E, Kasapoglu E, ŞAHİN FI. Protective effects of β-carotene and silymarin on human Lymphocytes. *Turk J Bio* 2012; **l36**: 47-52.
25. Sai Ram M, Anju B, Paulin T, Prasad AK, Kain SS, Mongia S, et.al. Effect of Kombucha tea on chromat (VI) – induced oxidative stress in albino rats. *Journal of Ethno pharmacology* 2000; **71**: 235-240.
26. Pauline TP, Dipti B, Anju S, Kavimani SK, Sharma AK, Kain S K, et.al. Studies on toxicity, anti-stress and hepato-protective properties of Kombucha tea. *Biomed Environ Sci* 2001; **14**: 207-213.
27. Jayabalan R, Baskaran S, Marimuthu S, Swaminathan K, Yun SE, Korean J. Effect of Kombucha Tea on Aflatoxin B*1* Induced Acute Hepatotoxicity in Albino Rats-prophylactic and Curative Studies *Soc Appl Biol Chem* 2010; **53**(4): 407-416.
28. Bhattacharya S, Manna P, Gachhui R, Sil PC. Hepatocytes. Indian. *J Exp Biol* 2011; **49**(7): 511-524.
29. Ibrahim NK. Possible Protective Effect of Kombucha Tea Ferment on Cadmium Chloride Induced Liver and Kidney Damage in Irradiated Rats. I International *Journal of Biological and Life Sciences* 2013; **9**: 1.
30. Gharib OA. Review Article: Does kombucha tea attenuate the hepatonepherotoxicity induced by a certain environmental pollutant? *Egypt. Acad J Biolog Sci* 2010; **2**(2): 11-18.