

مطالعه اثرات محافظتی عصاره الکلی سیاهدانه، در مقابل سمیت کبدی ریفامپین در موش صحرایی

مهرداد نشاط قراملکی^{۱*}، داریوش مهاجری^۲

چکیده

زمینه و هدف: داروی ضد سل ریفامپین، برای کبد سمی است. این مطالعه با هدف تعیین اثرات پیشگیرانه عصاره سیاهدانه (*Nigella sativa* Linn) از سمیت کبدی ریفامپین در موش صحرایی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار به طور تصادفی به چهار گروه مساوی تقسیم شدند: ۱- گروه شاهد؛ ۲- گروه داروی سمی؛ ۳- گروه شاهد مثبت و ۴- گروه تحت درمان با عصاره که به ترتیب نرمال سالین، ریفامپین (با دوز ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، سیلیمارین (با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) توأم با ریفامپین و عصاره الکلی سیاهدانه (دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به علاوه ریفامپین را از طریق گاوژ به مدت یک ماه دریافت کردند. در پایان، سطح سرمی آلانین آمینو ترانسفراز، آسپاراتات آمینو ترانسفراز، آلکالین فسفاتاز، بیلی روبین، آلبومین و پروتئین موشها اندازه گیری شد. میزان مالون دی آلدئید و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز کبد اندازه گیری شد. آسیب شناسی بافتی جهت ارزیابی درجات مختلف آسیب کبد انجام گرفت. گروهها با آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی مقایسه شدند.

یافته ها: سیلیمارین و عصاره سیاهدانه به طور معنی داری میزان سرمی آنزیمهای شاخص عملکرد کبد، بیلی روبین و میزان مالون دی آلدئید کبد را کاهش و سطوح آلبومین، پروتئین سرم و سطوح کبدی آنزیمهای آنتی اکسیدانی را در موشهای تیمار شده با ریفامپین افزایش داد ($p < 0.01$). در آسیب شناسی بافتی، سیلیمارین و عصاره سیاهدانه، آسیب ناشی از ریفامپین را بهبود بخشید. نتایج هیستوپاتولوژی با یافته های بیوشیمیایی هم راستا بود.

نتیجه گیری: طبق نتایج این مطالعه، عصاره سیاهدانه با خواص آنتی اکسیدانی، کبد را در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از ریفامپین محافظت می کند.

کلید واژه ها: سیاهدانه؛ ریفامپین؛ کبد؛ آنتی اکسیدانها؛ موش صحرایی.

^۱ استادیار بیماری های داخلی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

^۲ استاد پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

مهرداد نشاط قراملکی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

neshatpetvet@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۲۷

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Neshat Gharamaleki M, Mohajeri D. The study of the protective effect of black cumin (*nigella sativa* linn.) ethanolic extract against rifampin-induced hepatotoxicity in rats. Qom Univ Med Sci J 2015;8(5):73-84.

مقدمه

کبد یکی از اندام‌های حیاتی بدن بوده و به‌عنوان اولین سد دفاعی، نقشی ممتاز و اساسی در سم‌زدایی عوامل توکسیک، آلاینده‌های محیطی و داروهای شیمیایی دارد. نارسایی حاد کبد در اثر عوامل متعددی از جمله هپاتیت‌های ویروسی، سموم، داروها و ایسکمی ایجاد می‌شود. آسیب کبد در اثر این عوامل اغلب به شکل نکرز هپاتوسیت‌ها بروز می‌کند. استرس اکسیداتیو نقش اساسی را در صدمات بافت کبد در اثر داروها و سموم برعهده دارد. این درحالی است که آسیب‌های کبدی در اثر عوامل ویروسی و ایمونولوژیک عمدتاً از طریق فعال‌سازی مسیر آپوپتوزی مرگ سلول اتفاق می‌افتد (۱). بیماری سل که به‌عنوان یک مسئله بهداشت عمومی در سراسر جهان مطرح بوده و با شیوع بیماری ایدز، یکی از عوامل عمده مرگ و میر در مبتلایان به شمار می‌رود (۲)، با ریفامپین قابل درمان است. ریفامپین یک عامل سمی بسیار قوی برای کبد به شمار می‌رود (۳). هپاتیت بالینی در ۱/۱ درصد از افراد مسنی که با ریفامپین درمان شده‌اند، گزارش شده است (۴)، ولی از آنجا که ریفامپین اغلب همراه با سایر داروها نظیر ایزونیاژید (Isoniazid) و پیرازینامید (Pyrazinamide) برای درمان بیماری سل تجویز می‌شود، لذا میزان وقوع واقعی هپاتیت در اثر مصرف ریفامپین ناشناخته باقی مانده است (۵). مکانیسم آسیب کبدی ناشی از ریفامپین نیز هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است. تحقیقات نشان داده‌اند ریفامپین از طریق آسیب اکسیداتیو باعث پراکسیداسیون لیپیدی و تخلیه آنتی‌اکسیدان تری‌پتید گلوتاتیون (GSH) و آنزیم‌های پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد می‌شود (۶). آنتی‌اکسیدان‌ها عواملی هستند که حتی در مقادیر ناچیز می‌توانند بدن را در مقابل انواع مختلف آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن محافظت کنند (۷). بنابراین گیاهان دارویی که سرشار از مواد آنتی‌اکسیدانی هستند، به دلیل سهولت دسترسی، کاهش عوارض جانبی و قیمت مناسب به‌عنوان جایگزین‌های شایسته داروهای شیمیایی، همواره مورد توجه بوده و از چند دهه اخیر به‌طور خاص مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند. اگرچه عوامل دارویی متنوعی برای درمان انواع بیماری‌ها وجود دارد، لکن اغلب بیماران قادر به تحمل اثرات جانبی داروهای شیمیایی نیستند و از سوی دیگر، اکثر گیاهان

اثرات جانبی بسیار اندکی در روی بیماران به جای می‌گذارند. بنابراین، جستجو برای یافتن دارویی مفید با منشأ گیاهی در پیشگیری از سمیت کبدی ریفامپین از اهمیت بالینی ویژه‌ای برخوردار است (۸). سیاهدانه (*Nigella sativa* Linn.) از خانواده آلاله (*Ranunculaceae*) به‌طور معمول به‌عنوان دانه سیاه در طب سنتی شناخته شده است. در هند، کشورهای عربی، اروپا و ایران از دانه یا روغن آن به‌طور سنتی در درمان بیماری‌هایی مانند آسم، فشار خون، دیابت، التهاب، تومور، سرفه، برونشیت، سردرد، آگزما، تب، سرگیجه، اختلالات گوارشی، ناتوانی جنسی و آنفلوانزا استفاده می‌شود، همچنین به‌عنوان داروی ضدنفخ، مدر، شیرافزا، قاعده‌آور و ضدانگل نیز کاربرد دارد (۹). اثرات سودمند این بذر گیاهی و یا ترکیبات آن، طی مطالعات متعدد بالینی، به‌ویژه تجربی نشان داده شده است که از جمله می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدان (۱۰)، ضدالتهابی (۱۱) و ضدسرطانی (۱۲) آن اشاره نمود. روغن سیاهدانه و تیموکینون (یکی از ترکیبات آلکالوئیدی مؤثر در سیاهدانه) از طریق غیرآنزیماتیک؛ پراکسیداسیون چربی‌ها را در لیپوزوم مهار می‌کند (۱۳). ترکیبات دیگر سیاهدانه مانند کینون، کارواکرول، تی‌آنتول و ۴ - ترپینئول در اتصال رادیکال‌های آزاد به یکدیگر فوق‌العاده مؤثر هستند (۱۴). با توجه به اثرات مفید و متعدد درمانی سیاهدانه، به‌خصوص اثرات آنتی‌اکسیدانی آن، گمان می‌رود عصاره بذر این گیاه بتواند بافت کبد را در برابر سمیت کبدی ریفامپین در موش صحرایی محافظت کند. در هر صورت با توجه به بررسی منابع، مطالعه‌ای در رابطه با اثرات محافظتی عصاره الکلی سیاهدانه در برابر سمیت کبدی ریفامپین یافت نشد. بنابراین، این مطالعه با هدف تعیین اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظت از کبدی عصاره الکلی بذر سیاهدانه در برابر سمیت کبدی ریفامپین در موش صحرایی صورت گرفت.

روش بررسی

مطالعه حاضر به روش تجربی (سال ۱۳۹۲) در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز انجام شد. در این مطالعه، تمام ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی توسط کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی مرکز

تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز مورد تأیید قرار گرفت. سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی مورد بررسی نیز با استفاده از کیت‌های تجاری موجود

(Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China) انجام شد. برای انجام این مطالعه، تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی 20 ± 200 گرم، به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

۱- گروه شاهد (Control)؛ ۲- گروه داروی سمی (Toxicant)؛ ۳- گروه شاهد مثبت (Positive Control)؛ ۴- گروه درمان با عصاره (Extract Treatment).

شرایط تغذیه و نگهداری برای تمام گروه‌ها یکسان (به‌صورت ۱۲ ساعت روشنائی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای 21 ± 2 درجه سانتیگراد) در نظر گرفته شد. جیره غذایی یکسان و آب به‌طور آزاد در دسترس حیوان قرار گرفت. بذر خالص و تازه سیاهدانه از یک عطاری معتبر در تبریز خریداری و پس از تأیید توسط گروه فارماکوکونوزی دانشگاه علوم پزشکی تبریز استفاده شد. برای تهیه عصاره سیاهدانه، ابتدا بذر گیاه به‌صورت پودر درآمد و سپس عصاره اتانولی به روش سوکسله با استفاده از ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ برای ۱۰۰ گرم وزن خشک بذر گیاه تهیه گردید. عصاره در حمام بخار به‌صورت نیمه‌جامد تغلیظ شد.

گروه شاهد روزانه و به‌مدت ۳۰ روز، نرمال سالین را (به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌طور خوراکی (گاواژ) دریافت کردند؛ گروه داروی سمی، داروی ریفامپین را روزانه (به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نرمال سالین) به‌صورت گاواژ به‌مدت ۳۰ روز دریافت کردند؛ گروه تیمار، عصاره الکلی سیاهدانه را (با دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نرمال سالین) روزانه و به‌مدت ۳۰ روز به‌صورت گاواژ و ۴۵ دقیقه قبل از مصرف ریفامپین (به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) دریافت کردند؛ گروه سیلیمارین نیز به‌عنوان رفرانس، داروی سیلیمارین (Silymarin) را روزانه و به‌مدت ۳۰ روز (به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نرمال سالین) به شکل گاواژ و ۴۵ دقیقه قبل از مصرف ریفامپین دریافت کردند. لازم به ذکر است که این میزان مصرف داروی ریفامپین بسیار بیشتر از

دوز مصرف آن در درمان موارد بالینی بیماری سل در انسان می‌باشد؛ چراکه در حیواناتی نظیر موش‌های صحرایی که دارو را به‌سرعت متابولیزه می‌کنند، دوزهای بالاتر مورد نیاز است (۱۵). در پایان دوره آزمایش و ۲۴ ساعت پس از آخرین گاواژ، جهت اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی شامل: آلانین آمینو ترانسفراز (Alanine Aminotransferase; ALT)، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (Aspartate Amino Transferase; AST) (۱۶)، آلکالین فسفاتاز (Alkaline Phosphatase; ALP) (۱۷)، آلبومین (Albumin; Alb)، پروتئین تام (Total Protein, TP) (۱۸) و بیلی‌روبین تام (Total Bilirubin, TB) (۱۹)، نمونه خون ناشتا از سینوس پشت کره چشم (Retro-orbital Plexus) گرفته شد و سرم نمونه‌های خون با سانتریفوژ (سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه، به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد) جدا گردید. برای تعیین وضعیت آنتی‌اکسیدانی کبد، همه موش‌ها همزمان با ایجاد دررفتگی در مهره‌های گردن (Cervical Dislocation) به‌راحتی کشته شدند. کبد موش‌ها سریعاً خارج و در سالین بسیار سرد شستشو داده شد، سپس هموژنات ۱۰٪ در ۱/۱۵ (w/v) کلرور پتاسیم تهیه گردید. هموژنات با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. از محلول رویی جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی از طریق اندازه‌گیری مقدار مالون دی‌آلدئید (Malondialdehyde, MDA)، همچنین برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide Dismutase, SOD)، کاتالاز (Catalase, CAT)، گلوکاتایون پراکسیداز (Glutathione Peroxidase, GPX) و گلوکاتایون ردوکتاز (Glutathione Reductase GR) استفاده گردید. پراکسیداسیون چربی در کبد با روش رنگ‌سنجی (Colorimetrically)، به‌وسیله اندازه‌گیری TBARS (Thiobarbituric Acid Reacting Substances) طبق روش Fraga و همکاران (سال ۱۹۸۸) انجام شد (۲۰). به‌طور خلاصه، ۰/۱ میلی‌لیتر هموژنات بافتی با ۲ میلی‌لیتر معرف TCA-HCl (Trichloroacetic Acid) TBA، به نسبت ۳۷ درصد TBA، ۰/۲۵ مول HCL و ۱۵ درصد TCA، به نسبت ۱:۱:۱ مخلوط شد و پس از ۱۵ دقیقه قرارگیری در بن‌ماری

جوش خنک شده و با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شد. شدت جذب محلول رویی شفاف در ۵۳۵ نانومتر در مقابل بلانک اندازه گیری شد. مقادیر به صورت نانومول بر ۱۰۰ گرم بافت بیان شدند. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به وسیله روش Nishikimi و همکاران تعیین گردید (۲۱). به طور خلاصه، در حدود ۵ میکروگرم از پروتئین های تام هریک از هموژنات های کبدی با بافر پیروفسفات سدیم، فنازین متوسولفات (Phenazine Methosulfate; PMT) و نیترو - بلوترازولیوم (Nitro-blue Tertazolium; NBT) مخلوط شد. در ادامه، با افزودن نیکوتین آمید - آدنین دی نوکلئوتید (Nicotinamide-adenine Dinucleotide; NADH) واکنش صورت گرفت. مخلوط واکنش در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه انکوبه و با افزودن یک میلی لیتر اسید استیک گلاسیال متوقف گردید. شدت جذب مخلوط رنگزای تشکیل شده در ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. هر واحد از فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به صورت غلظت آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از تولید رنگ تا ۵۰٪ در یک دقیقه، تحت شرایط مطالعه تعیین گردید. فعالیت کاتالاز به وسیله روش Claiborne و براساس تجزیه پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت (۲۲). به طور خلاصه، مخلوط مورد سنجش متشکل از ۱/۹۵ میلی لیتر بافر فسفات (pH=۷، ۰/۰۵ مول)، یک میلی لیتر پرکسید هیدروژن (۰/۰۱۹ مول) و ۰/۰۵ میلی لیتر PMS (۰/۱۰٪) در حجم نهایی ۳ میلی لیتر بود. تغییرات در جذب، در ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. در نهایت نتیجه به شکل "فعالیت کاتالاز در دقیقه" محاسبه گردید. فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز با استفاده از روش Rotruck و همکاران (۲۳) و براساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت.

(گلوکاتایون اکسید) $\rightarrow 2H_2O + GSSG$ (گلوکاتایون احیا) $H_2O_2 + 2GSH$
گلوکاتایون پراکسیداز در هموژنات بافتی، گلوکاتایون را اکسیده کرده که به طور همزمان پراکسید هیدروژن به آب احیا شد. این واکنش پس از ۱۰ دقیقه با تری کلرو استیک اسید متوقف و گلوکاتایون باقیمانده با محلول دی تیویس نیترو بنزوئیک اسید (Dithiobis Nitrobenzoic Acid, DTNB) مجدداً فعال و منجر به تشکیل ترکیب رنگی شد که با اسپکتروفتومتر

در ۴۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. مخلوط واکنشگر متشکل از ۰/۲ میلی لیتر اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (Ethylenediamine Tetra-acetic Acid, EDTA) ۰/۸ میلی مول، ۰/۱ میلی لیتر آزید سدیم (Sodium Azide) ۱۰ میلی مول، ۰/۱ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۲/۵ میلی مول و ۰/۲ میلی لیتر هموژنات بود که در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ متوقف و لوله ها با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. ۳ میلی لیتر دی سدیم هیدروژن ۰/۸ میلی مول و ۰/۱ میلی لیتر DTNB ۰/۰۴ درصد به محلول شناور افزوده شد و بلافاصله رنگ حاصله در ۴۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز به صورت میلی گرم پروتئین در دقیقه بر میکرومول گلوکاتایون اکسید بیان گردید. فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز با استفاده از روش Mohandas و همکاران (۲۴) براساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت.



در حضور گلوکاتایون ردوکتاز، گلوکاتایون اکسیده، احیا و همزمان NADPH به $NADP^+$ اکسیده شد. فعالیت آنزیم در دمای اتاق و با ناپدید شدن میزان NADPH در دقیقه با اندازه گیری اسپکتروفتومتری کاهش جذب نوری در ۳۴۰ نانومتر تعیین گردید. برای آسیب شناسی بافتی کبد، از سمت دیافراگمی لوب چپ کبد، نمونه گرفته شد. نمونه ها در فرمالین بافری ۱۰٪ پایداری شدند، سپس برش هایی با ضخامت ۵ میکرون و با روش رنگ آمیزی معمول همتوکسیلین - ائوزین از بافت ها تهیه گردید (۲۵). مقاطع آسیب شناسی به وسیله یک مقیاس نیمه کمی (Semiquantitative Scale) و به صورت دوسوکور از نظر آسیب مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات هیستوپاتولوژی مورد مشاهده براساس شدت ضایعه، از ۰-۳ (صفر: حالت طبیعی؛ ۱: دژنراسانس هیدروپیک خفیف، عدم پرولیفراسیون سلول های کوپفر و عدم نکروز؛ ۲: دژنراسانس هیدروپیک متوسط، پرولیفراسیون سلول های کوپفر و عدم نکروز یا نکروز جزئی؛ ۳: دژنراسانس هیدروپیک شدید، پرولیفراسیون سلول های کوپفر و نکروز) درجه بندی شدند (۲۶). برش ها با بزرگنمایی ۱۰۰ و در ۵ میدان میکروسکوپی، به طور تصادفی با میکروسکوپ نوری مدل

یافته‌ها

در موش‌های گروه داروی سمی (دریافت‌کننده ریفامپین)، سطوح سرمی آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) و بیلی‌روبین تام سرم (TB) در مقایسه با گروه شاهد، به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) افزایش و میزان پروتئین تام (TP) و آلومین سرم (Alb)، به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) کاهش یافت. در گروه شاهد مثبت، درمان با سیلیمارین، سطوح افزایش‌یافته سرمی آنزیم‌های ALT، AST و ALP و بیلی‌روبین تام سرم در ریفامپین را به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) و تا حد طبیعی کاهش و مقادیر کاهش‌یافته پروتئین تام و آلومین سرم را به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) و تا سطوح طبیعی خود افزایش داد. در گروه تیمار با عصاره سیاهدانه نیز مقادیر افزایش‌یافته آنزیم‌های مارکر و بیلی‌روبین تام سرم، به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) کاهش و مقادیر کاهش‌یافته پروتئین تام و آلومین سرم، به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) افزایش یافت (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: تأثیر عصاره سیاهدانه بر شاخص‌های سرمی آسیب کبد در سمیت کبدی ریفامپین در موش صحرایی

گروه‌ها	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (IU/L)	TB (mg/dl)	Alb (g/dl)	TP (g/dl)	شاخص‌ها
شاهد (تیمار با نرمال سالین)	54/2 ± 3/6 ^b	84/7 ± 2/3 ^b	189/5 ± 9/1 ^b	0/8 ± 0/0 ^b	4/3 ± 0/4 ^b	8/0 ± 0/5 ^b	
داروی سمی (تیمار با ریفامپین)	81/9 ± 4/1 ^{acd}	110/2 ± 4/6 ^{acd}	277/4 ± 11/5 ^{acd}	1/3 ± 0/1 ^{acd}	2/1 ± 0/2 ^{acd}	5/3 ± 0/2 ^{acd}	
شاهد مثبت (تیمار با ریفامپین + سیلیمارین)	65/7 ± 2/8 ^b	82/9 ± 1/5 ^b	201/8 ± 7/3 ^b	0/8 ± 0/0 ^b	4/4 ± 0/3 ^b	7/1 ± 0/4 ^b	
تیمار با ریفامپین + عصاره	61/5 ± 3/1 ^b	81/3 ± 2/7 ^b	215/6 ± 8/4 ^b	0/9 ± 0/0 ^b	4/5 ± 0/2 ^b	6/9 ± 0/3 ^b	

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد (Mean ± SEM) برای ۱۰ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است.

a: اختلاف معنی‌دار با گروه ۱؛ b: اختلاف معنی‌دار با گروه ۲؛ c: اختلاف معنی‌دار با گروه ۳؛ d: اختلاف معنی‌دار با گروه ۴؛ ($p < 0.05$).

تا حد طبیعی افزایش و مقادیر افزایش‌یافته MDA را به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) و تا سطوح طبیعی خود کاهش داد. در گروه تیمار با عصاره سیاهدانه نیز مقادیر کاهش‌یافته آنزیم‌های SOD، CAT، GPx، GR به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) افزایش و مقادیر افزایش‌یافته MDA به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.01$) (جدول شماره ۲).

نیکون (ECLIPSE E200، ساخت کشور ژاپن) بررسی شدند. از مناطق آسیب‌دیده تصاویری با وضوح ۵ مگاپیکسل تهیه گردید. داده‌های به دست آمده کمی، به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد (Mean ± SEM) ارائه شد و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳، آزمون آماری واریانس یک‌طرفه، آزمون تعقیبی توکی و کلموگروف - اسمیرنوف تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه درجات هیستوپاتولوژی کبد بین گروه‌های مورد مطالعه با آزمون ناپارامتری کروسکال والیس (Kruskal-Wallis H Test) صورت گرفت که در صورت معنی‌دار بودن آزمون فوق، با استفاده از آزمون ناپارامتری یومان - ویتنی با اصلاح بونفرونی (Bonferroni Correction) مقایسات زوجی انجام شد. سطح معنی‌داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

در موش‌های گروه داروی سمی (دریافت‌کننده ریفامپین)، سطوح کبدی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD، CAT، GPx، GR) در مقایسه با گروه شاهد، به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) کاهش و MDA به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) افزایش یافت. در گروه شاهد مثبت، سیلیمارین، سطوح کاهش‌یافته آنزیم‌های SOD، CAT، GPx، GR در اثر ریفامپین را به‌طور معنی‌دار ($p < 0.01$) و

جدول شماره ۲: تأثیر عصاره جای سبز بر فعالیت آنژی اکسیداتیوی کبد در آسیب ناشی از ریفامپین در موش صحرایی

گروه‌ها	فراسنجه‌ها				
	GR (U/mg protein)	GPx (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/g protein)
شاهد (تیمار با نرمال سالین)	۱۲۳/۷±۴/۹ ^b	۱۶/۸±۱/۲ ^b	۶۵/۱±۳/۱ ^b	۱۵/۶±۰/۴ ^b	۳/۳±۰/۱ ^b
داروی سمی (تیمار با ریفامپین)	۹۸/۹±۲/۶ ^{acd}	۱۲/۴±۰/۶ ^{acd}	۵۲/۸±۱/۱ ^{acd}	۱۰/۹±۰/۴ ^{acd}	۵/۲±۰/۲ ^{acd}
شاهد مثبت (تیمار با ریفامپین+سیلیمارین)	۱۱۵/۲±۳/۵ ^b	۱۷/۳±۱/۴ ^b	۶۳/۴±۱/۹ ^b	۱۴/۹±۰/۴ ^b	۳/۱±۰/۱ ^b
تیمار با ریفامپین+عصاره	۱۱۸/۴±۳/۱ ^b	۱۸/۱±۱/۱ ^b	۶۲/۲±۱/۲ ^b	۱۴/۴±۰/۵ ^b	۳/۰±۰/۲ ^b

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف استاندارد (Mean±SEM) برای ۱۰ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است.

a: اختلاف معنی‌دار با گروه ۱؛ b: اختلاف معنی‌دار با گروه ۲؛ c: اختلاف معنی‌دار با گروه ۳؛ d: اختلاف معنی‌دار با گروه ۴، (p<۰/۰۵).

نتایج آسیب‌شناسی بافتی کبد در گروه‌های مختلف در جدول شماره ۳ رتبه‌بندی و مقایسه شده است.

جدول شماره ۳: تأثیر عصاره سیاهدانه بر آسیب بافت کبد ناشی از ریفامپین در موش صحرایی

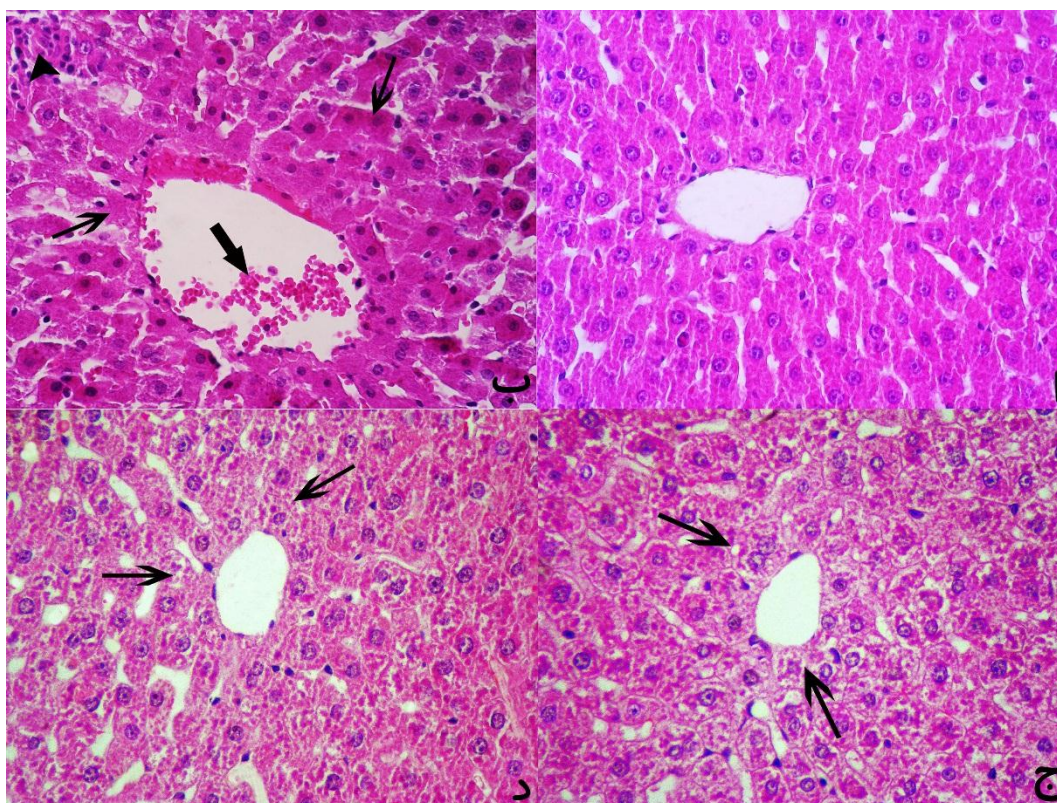
گروه	درجه آسیب بافتی
۱	۰/۰±۰/۰ ^a
۲	۲/۶۵±۰/۱۸ ^b
۳	۰/۲۶±۰/۱۴ ^a
۴	۰/۳۲±۰/۱۵ ^a

a و b: حروف غیر مشابه، نشانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵).

گروه‌ها: ۱) سالم، تیمار با نرمال سالین؛ ۲) داروی سمی، تیمار با ریفامپین (دوز ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم)؛ ۳) شاهد مثبت، تیمار با ریفامپین (دوز ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم)+سیلیمارین (دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم)؛ ۴) تیمار با ریفامپین (دوز ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم)+عصاره الکلی سیاهدانه (دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم).

ارتشاح سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای در فضاهای پورتال و پرخونی سینوزوئیدها نیز در این گروه مشخص بود (شکل ب). در نمونه‌های بافتی گروه درمان با سیلیمارین و گروه تیمار با عصاره سیاهدانه، آسیب بافتی در تعداد اندکی از موش‌ها و فقط به شکل تغییرات دژنراتیو خفیف هپاتوسیت‌ها مشاهده گردید (شکل ج و د)، که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین این گروه‌ها و گروه شاهد وجود نداشت.

در مطالعات میکروسکوپی، نمونه‌های بافتی کبد در گروه شاهد سالم، ساختار بافتی کاملاً طبیعی داشتند (شکل الف). در نمونه‌های بافتی گروه داروی سمی (دریافت‌کننده ریفامپین)، تغییرات دژنراتیو متوسط تا شدید در نواحی مرکز لوبولی که تا نواحی پورتال نیز گسترش یافته بود، مشاهده گردید. در موارد شدید، نکروز سلول‌های کبدی در اطراف وریدچه مرکزی نیز مشاهده شد. افزایش منتشر سلول‌های کوپفر کبدی همراه با



شکل: نمای ریزی از بافت کبد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - انوزین، درشتنمایی $\times 400$).

الف: (گروه شاهد): هپاتوسیت‌ها و ساختار بافت کبد طبیعی می‌باشند. ب: (گروه دریافت‌کننده ریفامپین): وریدچه مرکزی پر خون بوده (پیکان ضخیم) و تکروز هپاتوسیت‌ها (پیکان‌های نازک) در اطراف وریدچه مرکزی و از بین رفتن نظم رو به مرکز ستون‌های سلولی مشخص می‌باشد. افزایش سلول‌های کوپفر کبدی (نوک پیکان) در محل تکروز سلول‌ها قابل مشاهده است. ج: (گروه شاهد مثبت): در بافت کبد بجز واکونولاسیون و تغییرات خفیف دژنراتیو هپاتوسیت‌ها (پیکان‌ها) ضایعه پاتولوژیک خاصی مشاهده نمی‌شود. د: (گروه تیمار با عصاره سیاهدانه): تغییرات دژنراتیو خفیف بوده و واکونولاسیون ملایم هپاتوسیت‌ها (پیکان‌ها) مشاهده می‌شود.

بحث

در بررسی حاضر، مصرف ریفامپین باعث افزایش معنی‌دار سطوح سرمی آنزیم‌های ALT، AST، ALP، بیلی‌روبین تام و کاهش معنی‌دار پروتئین تام و آلبومین سرم موش‌های صحرایی در مقایسه با گروه شاهد شد که با یافته‌های سایر محققین همخوانی داشت (۲۸، ۲۷). همچنین، داروی سیلیمارین تأثیر بسیار خوبی بر بهبود وضعیت تغییرات شاخص‌های آسیب کبد در اثر ریفامپین داشت که از این لحاظ با نتایج بررسی Tasduq و همکاران در سال ۲۰۰۵ همخوانی داشت (۲۸).

بدین ترتیب نتایج به دست آمده نشان داد عصاره سیاهدانه از لحاظ محافظت در برابر سمیت کبدی ریفامپین، با داروی استاندارد سیلیمارین برابری می‌کند. در بررسی آسیب کبد نیز سنجش سطوح سرمی آنزیم‌های ALT، AST، ALP به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. وقوع نکروز و آسیب

غشای سلول باعث رها شدن این آنزیم‌ها به گردش خون می‌شود. افزایش سطح سرمی AST، آسیب کبد در اثر هپاتیت‌های ویروسی، انفارکتوس‌های قلبی و صدمات عضلانی را نشان می‌دهد. ALT که باعث تبدیل آلانین به پیرووات و گلوتامات می‌شود، برای سلول‌های کبدی اختصاصی‌تر بوده و شاخص مناسب‌تری برای تشخیص آسیب در بافت کبد است. افزایش سطوح سرمی آنزیم‌های فوق، نشان‌دهنده نشت سلولی بوده که به دلیل آسیب ساختار غشای هپاتوسیت‌ها و اختلال در عملکرد آن است (۲۹). میزان ALP، بیلی‌روبین، آلبومین و پروتئین تام سرم نیز با عملکرد سلول‌های کبدی در ارتباط است. افزایش سطح سرمی ALP، در اثر افزایش تولید در حضور فشار فزاینده صفراوی رخ می‌دهد (۳۰). بازگشت مقادیر افزایش‌یافته آنزیم‌های سرمی شاخص آسیب کبد در اثر ریفامپین به‌حالت طبیعی خود به‌وسیله عصاره سیاهدانه می‌تواند در اثر جلوگیری از

نشت آنزیم‌های داخل سلولی به دلیل حفظ یک پارچگی غشای سلول و یا نوزایش و ترمیم سلول‌های آسیب دیده کبد باشد (۳۱). برگشت به مقادیر طبیعی سطوح سرمی ALP، بیلی روبین و پروتئین تام؛ بهبود زود هنگام مکانیسم‌های عملکردی و ساختاری سلول‌های کبدی را نشان می‌دهد. در بررسی حاضر، مصرف ریفامپین باعث تغییرات دژنراتیو گسترده و نکروز نواحی مرکز لوبولی کبد موش‌های صحرایی شد. تغییرات دژنراتیو و نکروز در اطراف وریدچه مرکزی لوبول‌های کبدی می‌تواند در اثر مسمومیت اتفاق افتد (۳۲). بنابراین، در مطالعه حاضر آسیب‌شناسی بافتی کبد، اثرات مستقیم و نمادین سمی ریفامپین را نشان داد که با نتایج بررسی Tandon و همکاران در سال ۲۰۰۸ همخوانی داشت (۳۳). با مصرف عصاره سیاهدانه در کنار ریفامپین، فقط تغییرات دژنراتیو خفیف مشاهده شد و اثری از نکروز دیده نشد که این خود اثرات حفاظتی و پیشگیرانه عصاره سیاهدانه را در برابر سمیت کبدی ریفامپین نشان می‌داد. در هر صورت، یافته‌های آسیب‌شناسی بافتی این مطالعه در توافق با نشانی‌ها و شواهد، با نتایج بیوشیمیایی به دست آمده همخوانی داشت و آنها را مورد تأیید قرار داد. در مطالعه حاضر، مصرف ریفامپین افزایش قابل توجه میزان مالون دی‌آلدئید و کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز را به همراه داشت. نتایج بررسی حاضر از این لحاظ با یافته‌های Tasduq و همکاران، Santhosh و همکاران همخوانی داشت (۲۷، ۲۸). ریفامپین یک القاکننده قوی سیستم سیتوکروم P450 است که تولید متابولیت‌های سمی از داروها و اتصال کووالان آنها به ماکرومولکول‌های کبدی را سبب می‌شود (۳۴). بنابراین، تبدیل ریفامپین به متابولیت‌های فعال که قادر به اتصال به ماکرومولکول‌های موجود در هیپاتوسیت‌ها هستند، منجر به آسیب کبد می‌شود (۳۵). تحقیقات نشان داده است استرس اکسیداتیو، مکانیسم اصلی ریفامپین در ایجاد اثرات سمی در کبد موش‌های صحرایی است (۳۶). یافته‌های مطالعه حاضر مکانیسم فوق را مورد تأیید قرار داد؛ چراکه در بافت کبد موش‌های دریافت‌کننده ریفامپین، افزایش معنی‌داری در میزان پراکسیداسیون لیپیدی مشاهده گردید که خود به موازات کاهش قابل ملاحظه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بررسی شد.

به نظر می‌رسد رادیکال‌های آزاد حاصل از واکنش متابولیت‌های ریفامپین با اکسیژن باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی شده که خود منجر به تشکیل پراکسیدهای لیپیدی (مالون دی‌آلدئید) و در نهایت از بین رفتن یک پارچگی غشای هیپاتوسیت‌ها و آسیب کبد می‌شود. افزایش میزان مالون دی‌آلدئید در موش‌های دریافت‌کننده ریفامپین، نشان‌دهنده افزایش واکنش‌های پراکسیداسیونی است که به ضعف مکانیسم‌های تدافعی آنتی‌اکسیدانی منجر می‌شود و بدین ترتیب ممانعت از تشکیل مفرط رادیکال‌های آزاد مقدور نخواهد بود (۳۷). به عبارتی دیگر، افزایش میزان مالون دی‌آلدئید در کبد در اثر ریفامپین، نشان‌دهنده افزایش پراکسیداسیون لیپیدی است که منجر به آسیب بافت کبد، همچنین بی‌کفایتی مکانیسم‌های تدافعی آنتی‌اکسیدانی در ممانعت از تشکیل بی‌رویه رادیکال‌های آزاد می‌شود. سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز؛ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که یک سیستم تدافعی را علیه گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) تشکیل داده‌اند (۳۸). کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شاخصی حساس در آسیب سلول‌های کبدی به شمار می‌رود (۳۹). این آنزیم یکی از مهم‌ترین عوامل در سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی است. سوپراکسید دیسموتاز، آنیون سوپراکسید را با تبدیل به پراکسید هیدروژن پاکسازی نموده و بدین ترتیب اثرات سمی آن را کاهش می‌دهد (۴۰). در مطالعه حاضر، میزان سوپراکسید دیسموتاز در موش‌های دریافت‌کننده ریفامپین به دلیل تشکیل فراوان آنیون‌های سوپراکسید، همچنین فعالیت آنزیم‌های پاک‌کننده پراکسید هیدروژن؛ یعنی کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که به نظر می‌رسد غیرفعال شدن سوپراکسید دیسموتاز با آنیون‌های افزایش‌یافته سوپراکسید، منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌های کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز شده است. همچنین در مطالعه حاضر مصرف عصاره سیاهدانه مانع از کاهش سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز شد که این امر نیز ممکن است در اثر پاکسازی رادیکال‌های آزاد به‌وسیله عصاره باشد که منجر به حفظ و بقای این آنزیم‌ها شده است. کاتالاز آنزیمی آنتی‌اکسیدان بوده که به‌طور گسترده در بافت‌های بدن وجود دارد و دارای بیشترین

آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز و گلوکاتیون ردوکتاز و میزان مالون دی‌آلدئید تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج به دست آمده در این مطالعه، اثرات پیشگیرانه و محافظتی عصاره سیاهدانه را در برابر سمیت کبدی ریفامپین مورد تأیید قرار داد، به‌طوری‌که اثرات محافظتی فوق با اثرات داروی استاندارد سیلیمارین در این زمینه برابری نموده و قابل‌مقایسه بود. همچنین با توجه به نتایج به دست آمده، اثرات مفید سیاهدانه را می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی ترکیبات موجود در عصاره کاهش استرس‌های اکسیداتیو مرتبط دانست. در نهایت، پیشنهاد می‌گردد بعد از انجام کارآزمایی‌های بالینی تصادفی، عصاره سیاهدانه جهت پیشگیری از آسیب‌های جبران‌ناپذیر کبد، متعاقب مصرف داروی ریفامپین مورد استفاده قرار گیرد. در هر صورت، شناخت دقیق ماده یا مواد مؤثر اصلی این عصاره، تعیین دقیق مکان و مکانیسم یا مکانیسم‌های مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن در این مورد، نیاز به مطالعات گسترده‌تری دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی (به شماره ۲۷۳۶۹-۱۳/۱۱/۵ مورخه: ۹۲/۶/۲۰) که با بودجه پژوهشی و حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به انجام رسیده است، می‌باشد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز تشکر و قدردانی می‌گردد.

فعالیت در کبد و گویچه‌های قرمز می‌باشد. کاتالاز پراکسید هیدروژن را تجزیه کرده و باعث محافظت بافت‌ها از رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل می‌شود (۴۱). بنابراین، کاهش فعالیت کاتالاز ممکن است منجر به برخی اثرات مخرب ناشی از رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن گردد. گلوکاتیون ردوکتاز یک آنزیم سیتوزولی در سلول‌های کبدی است که در کاهش گلوکاتیون اکسید (GSSG)، به‌عنوان محصول نهایی فعالیت گلوکاتیون پراکسیداز بر گلوکاتیون احیا (GSH) دخالت دارد (۳۷). در مطالعه حاضر متعاقب مصرف ریفامپین، کاهش قابل‌توجهی در فعالیت گلوکاتیون پراکسیداز کبد حاصل شد که این امر می‌تواند منجر به دسترسی گلوکاتیون ردوکتاز به سوپسترا شده و بدین ترتیب فعالیت گلوکاتیون ردوکتاز کاهش یابد. مصرف عصاره سیاهدانه در کنار ریفامپین فعالیت گلوکاتیون ردوکتاز را مجدداً برقرار می‌سازد که مصرف گلوکاتیون اکسید جهت تشکیل گلوکاتیون احیا و افزایش سم‌زدایی متابولیت‌های فعال به‌وسیله کونژوگاسیون با گلوکاتیون احیا برقرار می‌شود. نتایج مطالعه حاضر، گزارش سایر محققین را در خصوص اثرات آنتی‌اکسیدانی سیاهدانه و پاکسازی رادیکال آزاد به‌وسیله این عصاره تأیید می‌کند (۴۳،۴۲). همچنین نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر در مورد اثرات آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین نیز با یافته‌های دیگران مطابقت دارد (۴۵،۴۴). بنابراین، به جرأت می‌توان گفت که خصوصیت آنتی‌اکسیدانی داروی سیلیمارین در گروه شاهد مثبت باعث جبران فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شده است. در هر صورت، نتیجه مهم مطالعه حاضر این بود که بین عصاره سیاهدانه و داروی سیلیمارین از لحاظ تأثیر بر فعالیت

References:

1. Rebecca T. Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. J Clin Invest 2003;112(7):978-80.
2. Gajalakshmi V, Peto R, Kanaka TS, Jha P. Smoking and mortality from tuberculosis and other diseases in India: Retrospective study of 43000 adult male deaths and 35000 controls. Lancet 2003;362(9383):507-15.
3. Parthasarathy R, Sarma GR, Janardhanam B, Ramachandran P, Santha T, Sivasubramanian S, et al. Hepatic toxicity in South Indian patients during treatment of tuberculosis with short-course regimens containing isoniazid, rifampicin and pyrazinamide. Tubercle 1986;67(2):99-108.

4. Steel MA, Burk RF, Desprez RM. Toxic hepatitis with isoniazid and rifampin. A meta-analysis. *Chest* 1991; 99(2):465-71.
5. Bachs L, Parés A, Elena M, Piera C, Rodés J. Effects of long-term rifampicin administration in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1992 Jun;102(6):2077-80.
6. Sodhi CP, Rana SF, Attri S, Mehta S, Yaiphei K, Mehta SK. Oxidative-hepatic injury of isoniazid-rifampicin in young rats subjected to protein and energy malnutrition. *Drug Chem Toxicol* 1998 Aug;21(3):305-17.
7. Rafieian-Kopaie M, Baradaran A. Plants antioxidants: From laboratory to clinic. *J Nephropathol* 2013;2(2):152-3.
8. Suresh RN, Vandana SP. Hepatoprotective effect of Ginkgoselect Phytosome® in rifampicin induced liver injury in rats: Evidence of antioxidant activity. *Fitoterapia* 2008;79(6):439-45.
9. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res* 2003;17(4):299-305.
10. Kanter M, Coskun O, Budancamanak M. Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L and *Urtica dioica* L on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *World J Gastroenterol* 2005;11(42):6684-8.
11. Al-Ghamdi MS. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *J Ethnopharmacol* 2001;76(1):45-8.
12. Al-Johar D, Shinwari N, Arif J, Al-Sanea N, Jabbar AA, El-Sayed R, et al. Role of *Nigella sativa* and a number of its antioxidant constituents towards azoxymethane-induced genotoxic effects and colon cancer in rats. *Phytother Res* 2008;22(10):1311-23.
13. Houghton PJ, Zarka R, De las Heras B, Hoult JRS. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med* 1995;61(1):33-6.
14. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res* 2000;14(5):323-8.
15. Pellikan EW. Toxicity in chemotherapy. In: Schmitzer RJ, Hawking F, editors. *Experimental Chemotherapy*. New York: Academic Press; 1963. p. 25.
16. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* 1957;28(1):56-63.
17. Kind PR, King EJ. Estimation of plasma phosphates by determination of hydrolyzed phenol with antipyrin. *J Clin Pathol* 1954;7(4):322-6.
18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
19. Malloy HT, Evelyn KA. The determination of bilirubin level with the photoelectric colorimeter. *J Biol Chem* 1937;119(2):481-4.
20. Fraga CG, Leibovitz BE, Tappel AL. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: Characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic Biol Med* 1988;4(3):155-61.

21. Nishikimi M, Appaji N, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 1972;46(2):849-54.
22. Claiborne A. Catalase activity. In: Boca Raton FL, editor. *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*. Florida: CRC Press, Boca Raton; 1985. p. 283-4.
23. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973;179(73):588-90.
24. Mohandas J, Marshall JJ, Duggin GG, Horvath JS, Tiller DJ. Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. *Cancer Res* 1984;44(11):5086-91.
25. Lee G, Luna HT. *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*. 3rd ed. New York: The Blakiston Division, McGraw-Hill Book Company; 1988. p. 32-107.
26. Kart A, Cigremis Y, Karaman M, Ozen H. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. *Exp Toxicol Pathol* 2010;62(1):45-52.
27. Santhosh S, Sini TK, Anandan R, Mathew PT. Hepatoprotective activity of chitosan against isoniazid and rifampicin-induced toxicity in experimental rats. *Eur J Pharmacol* 2007;572(1):69-73.
28. Tasduq SA, Peerzada K, Koul S, Bhat R, Johri RK. Biochemical manifestations of anti-tuberculosis drugs induced hepatotoxicity and the effect of silymarin. *Hepatol Res* 2005;31(3):132-5.
29. Drotman R, Lawhan G. Serum enzymes are indications of chemical induced liver damage. *Drug Chem Toxicol* 1978;1(2):163-71.
30. Muriel P, Garcapiña T, Perez-Alvarez V, Mourelle M. Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. *J Appl Toxicol* 1992;12(6):439-42.
31. Thabrew MI, Joice PD, Rajatissa, W. A comparative study of the efficacy of Pavetta indica and Osbeckia octanda in the treatment of liver dysfunction. *Planta Med* 1987;53(3):239-41.
32. Cullen JM. Liver, Biliary system, and Exocrine pancreas. In: McGavin MD, Zachary JF, editors. *Pathologic basis of veterinary disease*. 4th ed. London: Mosby; 2007. p. 403-6.
33. Tandon VR, Khajuria V, Kapoor B. Hepatoprotective activity of Vitex negundo leaf extract against anti-tubercular drugs induced hepatotoxicity. *Fitoterapia* 2008;79(7-8):533-8.
34. Powell-Jackson PR, Tredger JM, Smith HM, Davis M, Williams R. Effect of isoniazid administration on selected rat and mouse hepatic microsomal mixed-function oxidases and in vitro [14C] acetylhydrazine-derived covalent binding. *Biochem Pharmacol* 1982;31(24):4031-4.
35. Georgieva N, Gadjeva V, Tolekova A. New isonicotinoylhydrazones with SSA protect against oxidative-hepatic injury of isoniazid. *Trakia Jsci* 2004;2(1):37-43.
36. Attri S, Rana SV, Vaiphei K, Sodhi CP, Kaytal R, Goel RC, et al. Isoniazid and rifampicin induced oxidative hepatic injury protection by N-acetylcysteine. *Hum Exp Toxicol* 2000;19(9):517-22.
37. Naik SR. Antioxidants and their role in biological functions: An overview. *Indian Drugs* 2003;40(9):501-16.

38. Lil JL, Stantman FW, Lardy HA. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Arch Biochem Biophys 1988;263(1):150-6.
39. Wendel A, Jaeschke H, Gloger M. Drug-induced lipid peroxidation in mice--II. Protection against paracetamol-induced liver necrosis by intravenous liposomally entrapped glutathione. Biochem Pharmacol 1982;31(22):3601-5.
40. Curtis SJ, Mortiz M, Sondgrass PJ. Serum enzyme derived from liver cell fractions. The response of carbon tetrachloride intoxication in rats. Gastroenterology 1972;62(1):84-92.
41. Chance B, Greenstein DS, Roughton RJW. The mechanism of catalase action. 1. Steady-state analysis. Arch Biochem Biophys 1952;37(2):301-21.
42. Nagi MN, Alam K, Badary OA, al-Shabanah OA, al-Sawaf HA, al-Bekairi AM. Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. Biochem. Mol Biol Int 1999;47(1):153-9.
43. Beckstrom Sternberg SM, Duke JA. Potential for synergistic action of phytochemicals in spices. In spices herbs and edible fungi. Oxford: Elsevier Science; 1994. p. 201-23.
44. Kabiri N, Ahangar-Darabi M, Setorki M, Rafieian-kopaei M. The effect of silymarin on liver injury induced by Thioacetamide in rats. J Herb Med Pharmacol 2013;2(2):29-33.
45. Pradeep K, Mohan CVR, Gobianand K, Karthikeyan S. Silymarin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. Euro J Pharmacol 2007;560(2-3):110-6.