اثر عصاره زنجبیل بر تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد و آنزیم‌های ALT، AST و ALK در موش‌های صحرایی تیمار شده با آزاتیوپرین

فاطمه یزدان‌پرست، وحید حمایت‌خواه جهرمی*

گروه زیست‌شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

*مسئول مکاتبات:dr.hemayatkhah@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۷/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۱۲/۱۷

چکیده

آزاتیوپرین کاربرد وسیعی در درمان بیماری‌های خود ایمنی و پیوند اعضا دارد. نتایج مطالعات حاکی از اثرات سوء این دارو بر عملکرد و ساختار کبد می‌باشد. زنجبیل گیاهی با خواص آنتی اکسیدانی قوی و اثرات محافظتی در برابر توکسین‌های مختلف می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر عصاره زنجبیل بر تغییرات کبدی ناشی از مصرف آزاتیوپرین در موش های صحرایی صورت گرفته است. در این تحقیق تجربی، ٥٦ سر موش صحرایی ماده بالغ از نژاد ویستار به ۷ گروه ۸ تایی شامل ۱- کنترل (آب و غذای معمولی) ۲- شاهد (آب مقطر به عنوان حلال دارو) ۳- آزاتیوپرین (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ٤- عصاره هیدروالکلی زنجبیل (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ٥- آزاتیوپرین (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با عصاره زنجبیل(۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، ٦- آزاتیوپرین (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با عصاره زنجبیل (۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم) ۷- آزاتیوپرین (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با عصاره زنجبیل (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. عصاره زنجبیل به روش گاواژ و آزاتیوپرین به روش داخل صفاقی به حیوانات تجویز شد. تیمار حیوانات به مدت بیست روز انجام شد و در بیست و یکمین روز پس از شروع آزمایش و پس از توزین حیوانات، خونگیری از قلب انجام گرفت و غلظت سرمی آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) به روش الایزا اندازه‌گیری شد. کبد حیوان جدا شد و برش‌های بافتی از آن تهیه گردید. نتایج با آزمون آماری ANOVA و تست دانکن در سطح معنی‌داری $p \leq ۰/۰۵$ تجزیه و تحلیل شد. در گروه‌های دریافت کننده همزمان زنجبیل با آزاتیوپرین کاهش معنی‌دار میانگین غلظت سرمی ALT، AST و ALP در مقایسه با گروه آزاتیوپرین مشاهده گردید. در گروه‌های دریافت کننده همزمان زنجبیل با آزاتیوپرین میزان تخریب بافت کبد نسبت به گروه آزاتیوپرین کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان داد. با توجه به نتایج این تحقیق مشخص گردید که عصاره هیدروالکلی زنجبیل توانسته بر بافت کبد اثر محافظتی داشته باشد و از شدت آثار تخریبی آزاتیوپرین بر بافت کبد بکاهد.

کلمات کلیدی: زنجبیل، آزاتیوپرین، کبد، موش صحرایی.

مقدمه

زنجبیل (*Zingiber officinale*) از تیره زنجبیل و گیاه بومی هندوستان بوده و از دیرباز مورد استفاده مردم ایران، هند و چین بوده است. زنجبیل به عنوان داروی ضدنفخ، عرق‌آور، ضدتشنج، محرک گردش خون و در درمان روماتیسم و التهاب کاربرد داشته است. زنجبیل محتوی ۲/۳ درصد پروتئین، ۰/۹ درصد

چربی، ۱/۲ درصد مواد معدنی، ۲/٤ درصد فیبر و ۲/۳ درصد کربوهیدرات می‌باشد. کانی‌های موجود در زنجبیل شامل آهن، کلسیم و فسفر می‌باشد. هم‌چنین دارای ویتامین‌هایی از قبیل نیاسین، ویتامین C و E، تیامین و ریبوفلاوین می‌باشد (۱۰).

هپاتوسیت‌ها سلول‌های پیچیده متابولیکی حاوی مقادیر زیادی آنزیم هستند. این آنزیم‌ها در اثر آسیب کبدی به داخل پلاسما نشت می‌کنند و می‌توانند برای تشخیص و تعیین آسیب کبدی مفید باشند. حساس‌ترین و پرمصرف‌ترین آنزیم‌های تشخیصی کبد، آمینوترانسفرازها هستند. آسپارتات آمینوترانسفراز AST (SGOT) یک آنزیم میکروزومی است که به مقدار زیاد در کبد یافت می‌شود و ضمن تخریب بافت کبدی به مقدار زیاد در خون آزاد می‌شود (١٤). آلانین آمینوترانسفراز (ALT یا SGPT) یک آنزیم اختصاصی کبد است که در سیتوزول وجود دارد و به عنوان شناساگر سلول‌های کبدی تعیین مقدار می‌گردد (١٤).

بالاترین میزان ALT و AST به علت مرگ گسترده سلول‌های کبدی (نکروز گسترده کبد) ایجاد می‌گردد. افزایش خفیف تا متوسط آنزیم‌های کبدی معمولاً اتفاق می‌افتد. معمول‌ترین حالت افزایش خفیف تا متوسط آنزیم‌های کبدی، کبد چرب است. در ایالات متحده آمریکا شایع‌ترین علت ایجاد کبد چرب استفاده نابجا از الکل است. سایر دلایل کبد چرب شامل دیابت ملیتوس و چاقی هستند هپاتیت C مزمن هم چنین یکی از مهم‌ترین دلایل ایجاد افزایش خفیف تا متوسط آنزیم‌های کبدی است (۲۳). آزاتیوپرین موجب تولید رادیکال آزاد در اندام‌ها و بافت‌های بدن می‌گردد که یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده سمیت در اندام‌ها می‌باشد (۲۱). Sun و همکارانش نشان دادند که استفاده از داروی آزاتیوپرین موجب تغییر در میزان آنزیم‌های کبدی و افزایش آلانین‌آمینوترانسفراز و آلکالین‌فسفاتاز و مالونیل دی آلدهید و کاهش میزان گلوتاتیون می‌شود (۲۷).

Watanabe و همکارانش ثابت کردند که مصرف خوراکی آزاتیوپرین موجب افزایش آلکالین فسفاتاز و گاما گلوتامین ترانس پپتیداز در کبد گشته، هم‌چنین مصرف این دارو موجب نکروز مرکز لوبولی و پرولیفراسیون و شبکه آندوپلاسمی خشن می‌شود (۲۸).

همچنین نشان داده شده که آزاتیوپرین در محیط کشت هپاتوسیت‌های موش‌های صحرایی از طریق گلوتاتیون و آسیب به میتوکندری موجب آسیب به کبد می‌گردد (١٦).

Manju و Nalini تأثیر ۱۵ هفته مصرف زنجبیل را بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و شاخص پراکسیداسیون لیپیدی موش‌های دارای سرطان کولون مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که سطوح TBARS به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در موش‌های تیمار شده با زنجبیل کاهش معنی‌داری پیدا کرد (۱۷).

Abdel-Azeem و همکاران نشان دادند در رت‌های دچار آسیب کبدی القا شده توسط استامینوفن، تجویز عصاره زنجبیل سبب کاهش معنی‌داری در سطوح آنزیم‌های کبدی AST، ALT و آلکالین فسفاتاز (ALP) شد. همچنین بر پایه نتایج این مطالعه ترکیبات فعال موجود در زنجبیل قادربه کاهش سطوح استرس اکسیداتیو و اعمال اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۱).

برخی مطالعات حیوانی نشان داده است که زنجبیل قادر به کاهش میزان نکروز و فیبروز سلول‌های کبدی می‌باشد. مکانیسمی که برای این اثر محافظتی بیان شده است اثر بر روی فاکتور تکثیر سلول هسته‌ای آنتی‌ژن (Proliferating cell nuclear antigen PCNA) می‌باشد. آنتی‌ژن PCNA یک پروتئین

هسته‌ای می‌باشد که در تنظیم فرایند تکثیر سلولی نقش دارد. در اختلالات آسیب کبدی مانند کبد چرب غیرالکلی و به ویژه سیروز کبدی میزان بیان PCNA افزایش می‌یابد که نهایتاً سبب افزایش بیش از حد و بدون کنترل تکثیر بافتی جهت جایگزینی با بافت آسیب‌دیده شده و سبب پیشرفت فیبروز کبدی می‌شود. درمان با زنجبیل سبب کاهش میزان بیان فاکتور PCNA شده و از تشدید فرایند فیبروز کبدی جلوگیری می‌کند (۲).

خوشوقتی و خشنود به بررسی تأثیر پودر زنجبیل بر شاخص‌های بیوشیمیایی کبدی، کلیوی و پانکراسی در موش صحرایی پرداختند و بیان کردند که مصرف خوراکی پودر زنجبیل حتی با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۸ روز هیچ‌گونه اثر جانبی بر کبد، کلیه و پانکراس ندارد (۱۵).

شریعت‌زاده و همکاران نشان دادند که عصاره‌ی زنجبیل با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فلاونوئیدی خود تا حدود زیادی قادر به جبران اثرات سیتوتوکسیتی نانوذرات نقره بر روی فعالیت آنزیم‌های کبدی، فاکتورهای هماتولوژی، شاخص‌های استرس اکسیداتیو خون و میزان آپوپتوزیس در بافت کبد می‌باشد (۲٤).

تحقیقات در شرایط آزمایشگاهی نشان داده است که ریزوم زنجبیل در حفاظت از سلول‌های عصبی موثر است و در درمان بیماری آلزایمر مفید است. مطالعات نشان داده‌اند که جینجرول (Gingerol) از اجزاء اصلی ریزوم زنجبیل که دارای اثرات ضد التهابی و ضددرد است (۲۲).

Minaiyan و همکاران به بررسی اثرات آنتی‌اولسروژنیک عصاره زنجبیل پرداختند. عصاره زنجبیل با خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد جلوی تخریب سلولی ناشی از اثر رادیکال‌های آزاد را می‌گیرد. علاوه بر این عصاره زنجبیل سبب مهار پروستاگلاندین‌ها می‌گردد که از جمله فاکتورهای مهم در ایجاد کولیت اولسراتیو به شمار می‌آیند (۱۸).

هدف از این تحقیق تعیین اثر آزاتیوپرین بر تغییرات بافتی کبد در موش‌های تیمار شده، تعیین اثر آزاتیوپرین بر تغییرات آنزیمی کبد (ALT، AST و ALK) در موش‌های تیمار شده با آزاتیوپرین بود.

مواد و روش کار

حیوانات مورد استفاده در این تحقیق ٥٦ سر موش صحرایی ماده بالغ از نژاد ویستار بود که از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی جهرم تهیه شد. بعد از اینکه حیوانات به دقت توزین شدند سعی شد هر گروه در محدوه وزنی مناسبی قرار گیرند.

گروهای مطالعه: هفت گروه ۸ تایی در قالب گروه‌های کنترل، شاهد و تجربی بر اساس محدوه وزنی مناسب مشخص شدند.

گروه کنترل: در طول پژوهش فقط از آب و غذای معمولی استفاده کرد و هیچ تیماری در این گروه انجام نشد.

گروه شاهد: هم حجم مواد داده شده به حیوانات، آب مقطر را به عنوان حلال دارو و عصاره دریافت کرد.

گروه آزاتیوپرین: داروی آزاتیوپرین با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی به مدت ۲۰ روز دریافت کردند.

گروه تجربی ۱: داروی آزوتیوپرین با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی و عصاره‌ی هیدروالکلی زنجبیل را به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت گاواژ به مدت ۲۰ روز دریافت کردند.

گروه تجربی ۲: داروی آزوتیوپرین با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون‌صفاقی و

عصاره‌ی هیدروالکلی زنجبیل را به میزان ۱۰۰ میلی-گرم بر کیلوگرم به صورت گاواژ به مدت ۲۰ روز دریافت کردند.

گروه تجربی ۳: داروی آزوتیوپرین با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی و عصاره‌ی هیدروالکلی زنجبیل را به میزان ۲۰۰ میلی-گرم بر کیلوگرم به صورت گاواژ به مدت ۲۰ روز دریافت کردند.

روش تهیه عصاره زنجبیل: به مقدار مساوی آب و الکل را به پودر زنجبیل اضافه نموده (۵۰ درصد آب، ۵۰ درصد الکل) و به مدت ٤٨ ساعت در مکانی مناسب و در دمای اتاق قرار داده و روزی چند مرتبه به هم زده شد تا تمامی مواد قابل حل در آب و الکل حل گردند. پس از ٤٨ ساعت محلول را صاف کرده و مایع زیر صافی را به مدت یک هفته در محیط آزمایشگاه و دمایی حدود ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا آب و الکل آن تبخیر شده و مایع به صورت محلول کاملا غلیظ شده و تیره رنگ در آید. سپس این محلول غلیظ و تیره که تقریباً ۲۵۰ گرم وزن داشت درون بخچال قرار داده شد و روزانه مقادیر لازم برداشته و به گروه‌های تجربی به صورت گاواژ داده شد.

طریقه گاواژ کردن حیوانات: جهت خوراندن محلول از سرنگ معمولی دو میلی لیتر مجهز به Feeding needle یا gavage needle استفاده گردید. دقت لازم به عمل می‌آمد تا محلول کاملا بلعیده شود و از دهان بیرون ریخته نشود.

روش بیهوش کردن موش‌ها: بعد از ١٤ روز آزمایش و تیمار دارویی، جهت بیهوش کردن حیوانات، ابتدا پنبه آغشته به اتر را در داخل ظرف مخصوص بیهوشی (جار) انداخته سپس یک حیوان درون ظرف انداخته شد. پس از ظاهر شدن علایم بیهوشی که شامل کاهش تحرک تا بی‌حرکتی کامل، کاهش تعداد ضربان قلب و کاهش تعداد حرکات تنفسی در هر دقیقه بود حیوان بیهوش شده از ظرف خارج شد و روی دستگاه مخصوص تشریح جهت خونگیری قرار داده شد.

روش خون‌گیری: پس از قرار دادن حیوان بر روی میز تشریح ابتدا به کمک پنس و اسکالپل پوست ناحیه قفسه سینه، سپس جناغ و دنده‌ها را برش داده و با کنار کشیدن جناغ و دنده‌ها توسط پنس، دیافراگم را نیز برش داده تا قلب نمایان گردد. سپس سرنگ انسولین cc ۵ را وارد بطن قلب کرده و با دقت خونگیری شد. خون گرفته شده را بدون افزودن ماده ضد انعقاد درون لوله آزمایش ریخته و به منظور انعقاد به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از وقوع انعقاد لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج کردن لوله از دستگاه سانتریفیوژ سرم خون روی بخش لخته شده را با دقت توسط پیپت پاستور جدا شد و به لوله‌های آزمایش دیگری منتقل گردید سپس درب آن‌ها توسط پارافیلم مسدود گردید و پس از زدن برچسب حاوی اطلاعات مربوط به هر گروه بر روی لوله، لوله‌ها را درون فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا قبل از مرحله اندازه‌گیری آنزیمی نگهداری شدند.

اندازه‌گیری غلظت آنزیم‌های AST و ALT: اندازه-گیری آنزیم‌های ALT و AST با روش بافر فسفات German Society of Clinical) DGKC Chemistry)، آنزیم آلکالین فسفاتاز با روش ρ-Nitrophenylphosphate AMP با استفاده از کیت تجاری پارس آزمون، ایران انجام گرفت.

روش تهیه نمونه‌های بافتی کبد: پس از خونگیری از قلب حیوان، کبد هر حیوان خارج شد و سپس در ظرف حاوی سرم فیزیولوژی قرار داده شد تا تمامی

بافت‌های اضافی و خونی که بافت چسبیده است جدا شود. سپس با ترازوی دیجیتالی ۰/۰۰۱ توزین و در ظرف‌های حاوی تثبیت کننده فرمالین ۱۰ درصد قرار داده تا جهت تهیه بافت و مقطع‌گیری آماده شوند.

پاساژ بافتی: با استفاده از دستگاه پردازشگر بافتی یا Autotechnicon طی مراحل زیر انجام گرفت: ۱- فیکس کردن، ۲- آب‌گیری، ۳- شفاف‌سازی، ٤- آغشته‌سازی و ۵- قالب‌گیری. این دستگاه محتوی ۱۲ ظرف بود که دو عدد از آ نها واجد سیستم گرم کننده بود و جهت ذوب پارافین به‌کار می‌رفتند. دمای این دو ظرف بر اساس نقطه ذوب پارافین تنظیم شده بود و ۱۰ ظرف باقیمانده جهت محلول‌های فیکساتیو، آبگیری و شفاف‌سازی به کار رفتند. دستگاه یک درپوش مرکزی داشت که جهت پوشاندن همه ظروف و ممانعت از بخار شدن محتوای آنها به کار می‌رفت و جابه‌جایی نمونه‌ها نیز به واسطه همین سرپوش انجام می‌شد. جهت نگه‌داری نمونه‌ها از سبدهای فلزی خاص (Basket) استفاده می‌شد. با شروع کار دستگاه سرپوش به گردش درآمده و سبد فلزی محتوی نمونه‌ها روی ظروف محتوی محلول‌های مختلف جابجا می‌شد. در مدت توقف بافت در محلول سرپوش به آرامی بالا و پایین رفته، در نتیجه نسوج به طور مداوم در محلول جابجا می‌شدند و این امر موجب تسریع جایگزینی محلول‌ها در نمونه‌ها می‌شد. جهت کنترل اتوماتیک زمان جابجایی سرپوش، از یک صفحه مدور دارای زمان ٢٤ ساعت به صورت ۱۲ ساعت روز با رنگ روشن و ۱۲ ساعت شب با رنگ تیره استفاده می‌شد. به این صورت که دندانه‌های منظم روی ساعات دلخواه ایجاد و درگیری زبانه‌ی تعبیه-شده روی دندانه ایجاد شده موجب جابجایی سرپوش می‌شود.

روش مطالعه بافت کبد: درجه التهاب پورتال و نکروز سلول‌های کبدی بررسی شد و به صورت عدم وجود تغییرات هیستولوژیک (درجه صفر)، تغییرات هیستولوژیک جزیی (درجه یک)، تغییرات هیستولوژیک متوسط (درجه دو)، تغییرات هیستولوژیک شدید (درجه سه) درجه‌بندی شدند (۲۰).

روش آنالیز آماری: نتایج در هر دو بخش سرولوژی و هیستولوژی به صورت میانگین ± انحراف از میانگین بیان شده است. روش مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های بخش سرولوژی استفاده از طرح دو عاملی با اندازه‌گیری‌های تکراری روی یک عامل بود و نتایج در هر یک از واحدهای زمانی بین گروه‌ها و در هر گروه در واحدهای زمانی مختلف مقایسه شدند. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های بخش هیستولوژی با استفاده از طرح کاملا تصادفی، نتایج بین گروه‌ها مقایسه گردید. برای مقایسه میانگین‌ها در هر دو بخش درون و بین گروه‌های آزمایشی از نرم‌افزار SPSS یک طرفه و آزمون ANOVA و روش پس آزمون دانکن استفاده شد. معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

تغییرات غلظت سرمی آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) در گروه‌ها: تغییرات غلظت سرمی آنزیم AST در گروه‌های آزمایشی مختلف است (نمودار ۱ و جدول ۱). نتایج نشان داد که غلظت سرمی آنزیم AST در گروه تجربی دریافت-کننده دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آزاتیوپرین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است ($p<۰/۰۵$). غلظت سرمی آنزیم AST در گروه تجربی دریافت کننده دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل نسبت به گروه کنترل و گروه آزاتیوپرین کاهش معنی‌داری را نشان داد

($p<۰/۰۵$). غلظت سرمی آنزیم AST در گروه تجربی دریافت کننده آزاتیوپرین به همراه دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل نسبت به گروه آزاتیوپرین تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. اما غلظت سرمی آنزیم AST در گروه تجربی دریافت‌کننده آزاتیوپرین به همراه دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل و در گروه تجربی دریافت کننده آزاتیوپرین به همراه دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل نسبت به گروه آزاتیوپرین کاهش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) را نشان داد (نمودار و جدول ۱).

تغییرات غلظت سرمی آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در گروه‌ها: نمودار ۲ و جدول ۱بیانگر تغییرات غلظت سرمی آنزیم ALT در گروه‌های آزمایشی مختلف است. غلظت سرمی آنزیم ALT در گروه تجربی دریافت کننده دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم آزاتیوپرین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) را نشان داد. هم‌چنین غلظت سرمی آنزیم ALT در گروه تجربی دریافت کننده دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل نسبت به گروه آزاتیوپرین کاهش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) را نشان داد. غلظت سرمی آنزیم ALT در گروه تجربی دریافت کننده آزاتیوپرین به همراه دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل و گروه تجربی دریافت کننده آزاتیوپرین به همراه دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل نسبت به گروه آزاتیوپرین تفاوت معنی‌داری را نشان داد. اما غلظت سرمی آنزیم ALT در گروه تجربی دریافت کننده آزاتیوپرین به همراه دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل نسبت به گروه آزاتیوپرین کاهش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) را نشان داد (نمودار ۲ و جدول ۱).

تغییرات غلظت سرمی آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در گروه‌ها: نمودار ۳ و جدول ۱ بیانگر تغییرات غلظت سرمی آنزیم ALP در گروه‌های آزمایشی مختلف است. نتایج نشان داد غلظت سرمی آنزیم ALP در گروه تجربی دریافت‌کننده دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آزاتیوپرین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) داشته است. همچنین غلظت سرمی آنزیم ALP در گروه تجربی دریافت-کننده دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل نسبت به گروه آزاتیوپرین کاهش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) را نشان داد. غلظت سرمی آنزیم ALP در گروه تجربی دریافت کننده آزاتیوپرین به همراه دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل و گروه تجربی دریافت کننده آزاتیوپرین به همراه دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل نسبت به گروه آزاتیوپرین تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. اما غلظت سرمی آنزیم ALP در گروه تجربی دریافت کننده آزاتیوپرین به همراه دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل نسبت به گروه آزاتیوپرین کاهش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) را نشان داد (جدول ۱و نمودار ۳).

نتایج مربوط به بافت‌شناسی: در گروه‌های کنترل (شکل ٤a)، شاهد (شکل شماره ٤b) و دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل (شکل ٤c)، ساختار بافت کبد کاملا سالم و طبیعی بود و هیچ گونه اثری از پرخونی و اتساع عروق، تخریب سلولی، به هم ریختگی نظم سلولی و ارتشاح سلول-های آماسی در مقاطع بافتی این گروه‌ها مشاهده نشد. در گروه دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم آزاتیوپرین در مقایسه با گروه کنترل، پرخونی و اتساع عروق، تخریب سلولی، به هم ریختگی نظم سلولی، روشن شدن رنگ سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها، ارتشاح سلول

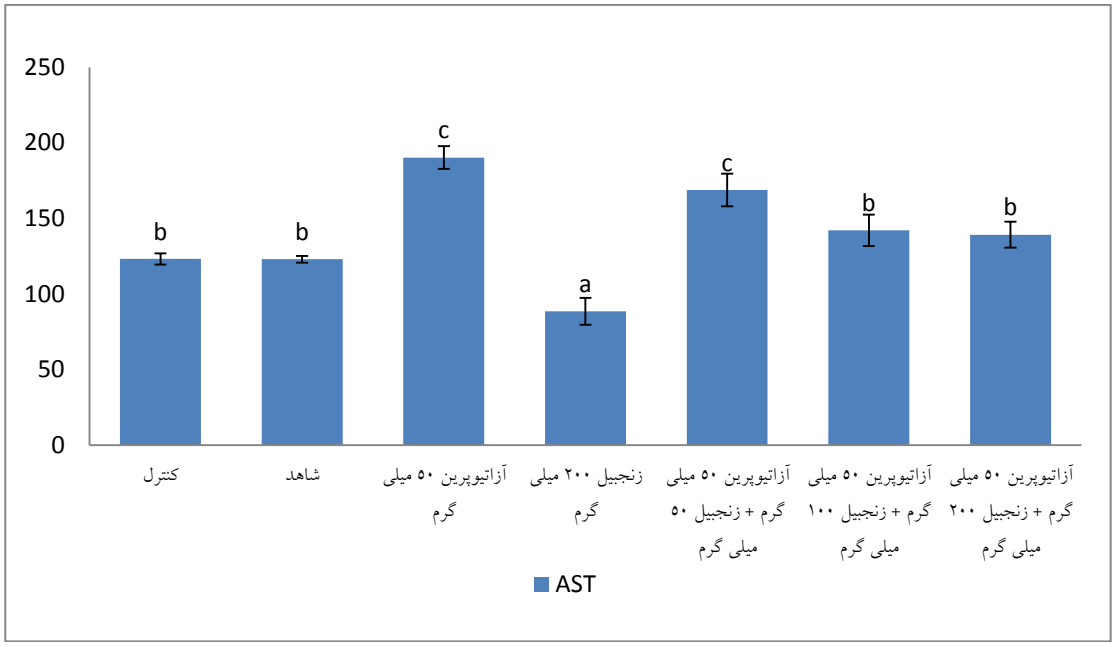
های آماسی در اطراف ورید مرکز لبولی در بافت کبد مشاهده گردید (شکل ٤d). در گروه دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره زنجبیل به همراه آزاتیوپرین، اتساع عروق، ارتشاح سلول‌های آماسی در اطراف ورید مرکز لبولی و فضای پورت در بافت کبد مشاهده گردید (شکل ٤e).

در گروه دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره زنجبیل به همراه آزاتیوپرین در مقایسه با گروه آزاتیوپرین، ارتشاح کمتر سلول‌های آماسی در اطراف ورید مرکز لبولی و فضای پورت، تیره‌تر شدن رنگ سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها در بافت کبد مشاهده گردید که نشان‌دهنده کاهش اثرات تخریبی آزاتیوپرین به وسیله دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره زنجبیل بر بافت کبد می‌باشد (شکل ٤f). در گروه دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره زنجبیل به همراه آزاتیوپرین در مقایسه با گروه آزاتیوپرین، ارتشاح بسیلر خفیف سلول‌های آماسی در اطراف فضای پورت، تیره‌تر شدن و طبیعی شدن رنگ سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها در بافت کبد مشاهده گردید که نشان دهنده کاهش بیشتر اثرات تخریبی آزاتیوپرین به وسیله دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره زنجبیل نسبت به دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره زنجبیل می‌باشد (شکل ٤g).

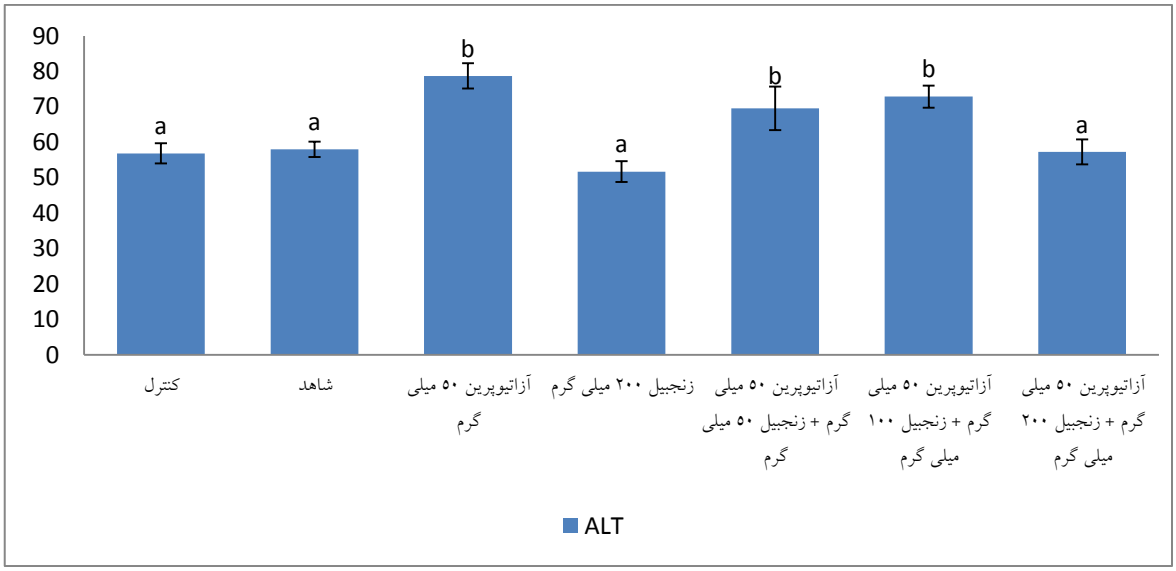
جدول ۱- تغییرات غلظت سرمی فاکتورهای بیوشیمایی سرم خون در گروه‌های مختلف

گروه‌ها	آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) IU/L	آلانین آمینوترانسفراز (ALT) IU/L	آلکالین فسفاتاز (ALP) IU/L
کنترل	۱۲۳/۲۸±۳/٦۸b	۵۸/۸۵±۲/۸۲a	۳۲٦/۸۵±۲۵/۹۱a
شاهد	۱۲۳/۲۸±۳/٦۸b	۵۸/۸۵±۲/۸۲a	۳۲٦/۸۵±۲۵/۹۱a
۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آزاتیوپرین	۱۹۰/۲۸±۷/۵۱c	۷۸/۷۱±۳/۵۸b	۵۲۸/۲۸±٤۵/۵۵b
۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره زنجبیل	۸۸/۵۷±۸/۹۰a	۵۱/۷۱±۲/۹٦a	۳۳۸/٤۲±۱۳/٦۸a
آزاتیوپرین + ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره زنجبیل	۱٦۸/۸۵±۱۰/۸۱c	٦۹/۵۷±٦/۱۳b	۵۱۲/۸۵±۲۹/۱٤b
آزاتیوپرین + ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره زنجبیل	۱٤۲/۱٤±۱۰/۳۵b	۷۲/۸۵±۳/۱۵b	٤٦۹/۲۸±۱۲/۱۳b
آزاتیوپرین + ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره زنجبیل	۱۳۹/۲۸±۸/٦۱b	۵۷/۲۸±۳/۵۰a	۳٤۳/۰۰±۳۸/۲۱a

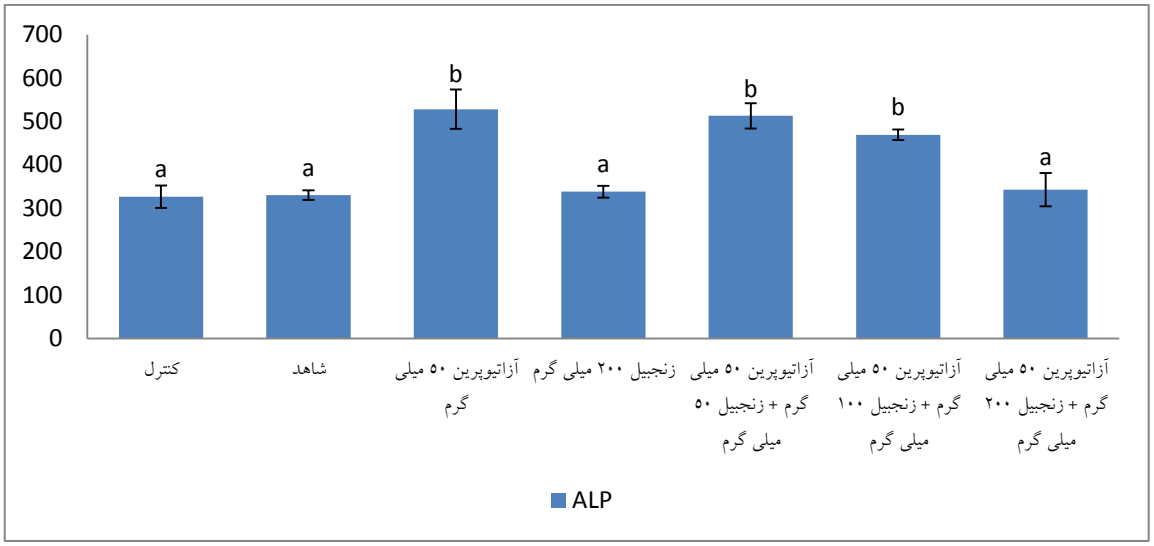
بر اساس آزمون دانکن میانگین‌های موجود در هر ستون که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، در سطح ۵٪ آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. میانگین ها به صورت Mean±SEM ارایه شده است.



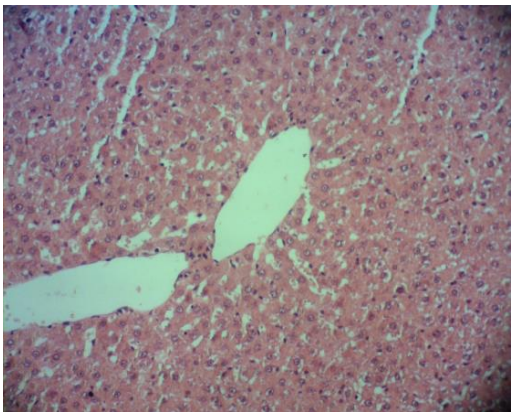
نمودار ۱- نمودار مقایسه غلظت سرمی آنزیم AST در گروه‌های آزمایشی مختلف (حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است)



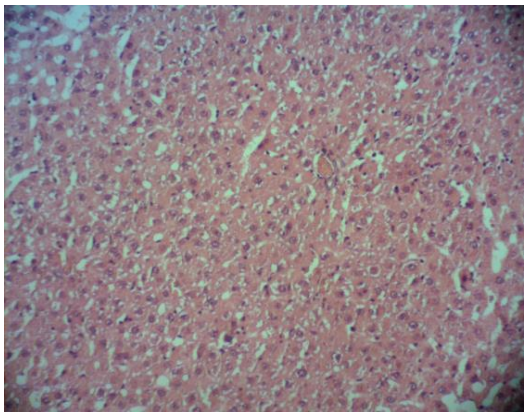
نمودار ۲- نمودار مقایسه غلظت سرمی آنزیم ALT در گروه‌های آزمایشی مختلف (حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار است)



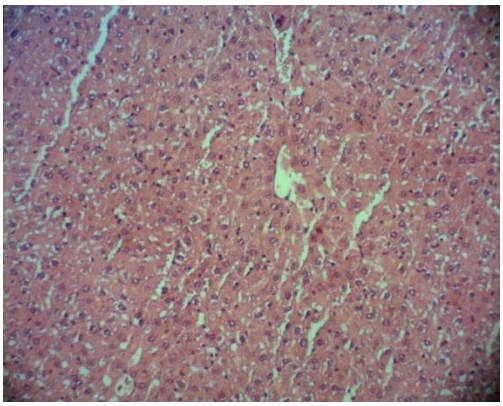
شکل ۳- مقایسه غلظت سرمی آنزیم ALP در گروه‌های آزمایشی مختلف (حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار است)



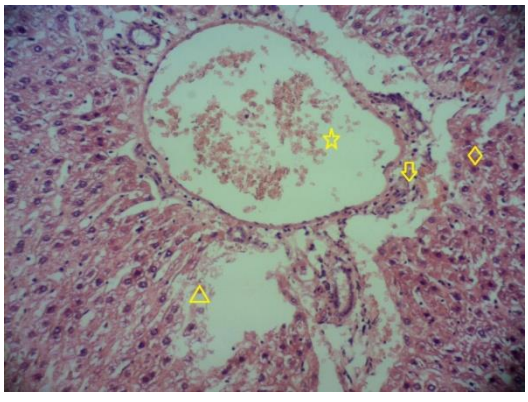
a: گروه کنترل



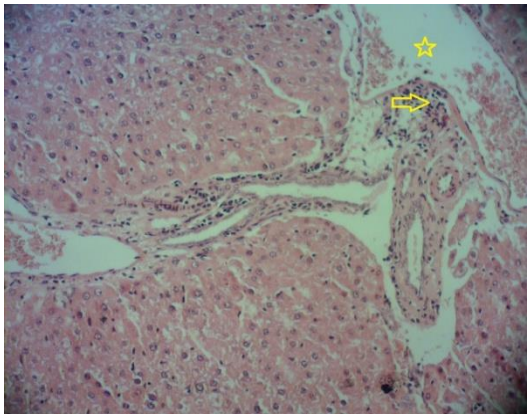
b: گروه شاهد



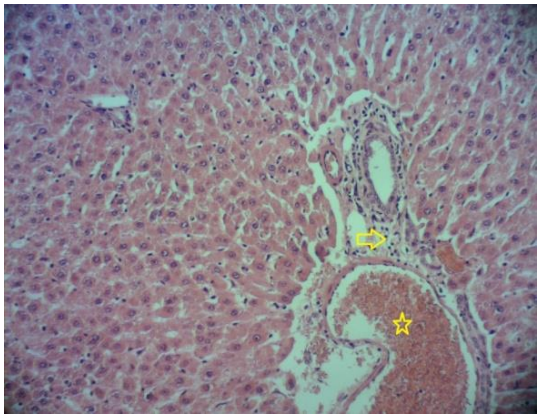
c: گروه دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل



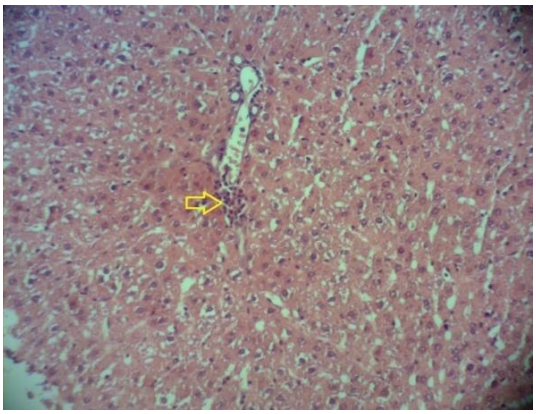
d: کبد گروه دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم آزاتیوپرین



e: کبد گروه دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل به همراه آزاتیوپرین



f: گروه دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل به همراه آزاتیوپرین



g: گروه دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی زنجبیل به همراه آزاتیوپرین

شکل ٤- نمای میکروسکوپی از بافت کبد (هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی x ۱۰۰)

بحث

بر اساس نتایج مطالعه حاضر میزان غلظت سرمی آنزیم‌های ALT،AST و ALP در گروه دریافت‌کننده دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آزاتیوپرین افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل (سالم) نشان داد. کار آمینوترانسفرزها انتقال عامل آمین از یک مولکول دهنده به یک مولکول گیرنده در متابولیسم پروتئین‌ها است (۳). آنزیم AST در تمام سلول‌های بدن به ویژه سلول های قلب، کبد، عضله اسکلتی و کلیه وجود دارد. آنزیم ALT نیز به طور طبیعی در کبد یافت می شود. اگر چه نمی‌توان گفت که این آنزیم منحصراً در کبد قرار دارد اما کبد جایی است که در برگیرنده بیش‌ترین غلظت این آنزیم است و بنابراین نشانگر اختصاصی‌تری برای آسیب کبدی است (٦). آنزیم ALP نیز که به طور فراوان در بافت کبد و استخوان یافت می‌شود، یک آنزیم هیدرولاز است که مسئول گروه‌های فسفات در انواع مولکول‌ها مانند پروتئین‌ها و اسیدهای نوکئیک می‌باشد (۲٦). با آسیب سلول‌های کبدی میزان این آنزیم‌ها در خون بالا می‌رود (۱۲). بنابراین در مطالعه حاضر آزاتیوپرین موجب آسیب سلول‌های کبدی و در نتیجه افزایش آنزیم‌های AST، ALT و ALP گردیده است.

نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات پیشین که نشان دهنده ایجاد سمیت کبدی توسط آزاتیوپرین می‌باشد، همخوانی دارد. نتایج مطالعه Sun و همکارانش نشان داد که استفاده از داروی آزاتیوپرین موجب تغییر در میزان آنزیم‌های کبدی و افزایش آلانین آمینو ترانسفراز و آلکالین فسفاتاز و مالون دی آلدهید و کاهش میزان گلوتاتیون می‌شود (۲۷).

Watanabe و همکارانش ثابت کردند که مصرف خوراکی آزاتیوپرین موجب افزایش آلکالین فسفاتاز و گاما گلوتامین ترانس پپتیداز در کبد گشته، همچنین مصرف این دارو موجب نکروز مرکز لوبولی و پرولیفراسیون و شبکه آندوپلاسمی خشن می‌شود (۲۸).

Lee و همکارانش نشان دادند که آزاتیوپرین در محیط کشت هپاتوسیت‌های موش‌های صحرایی از طریق گلوتاتیون و آسیب به میتوکندری موجب آسیب به کبد می‌گردد (۱۶). مشخص شده است آزاتیوپرین موجب تولید رادیکال آزاد در اندام‌ها و بافت‌های بدن می‌گردد که یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده سمیت در ارگان‌ها می‌باشد (۲۱). مصرف این دارو موجب تشکیل رادیکال‌های آزاد شده که در نقش دهنده الکترون، برای تکمیل الکترون‌های حلقه خارجی خود به پروتئین‌ها و لیپوپروتئین‌های غشای سلولی متصل و اثر سیتوتوکسیک ایجاد می‌کنند. همچنین با اتصال به اسیدهای نوکلئیک موجود در DNAو RNA باعث ایجاد آسیب می‌شوند. بنابراین اثرات هپاتوتوکسیسیتی مشاهده شده در گروه آزاتیوپرین در مطالعه حاضر، با افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و همچنین کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بافت کبد مرتبط می‌باشد.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، تجویز عصاره هیدروالکلی زنجبیل به همراه آزاتیوپرین به صورت وابسته به دوز، موجب کاهش معنی‌دار سطوح سرمی آنزیم‌های AST، ALT و ALP نسبت به گروه آزاتیوپرین گردید. این نتایج بیانگر تأثیر مثبت عصاره زنجبیل در کاهش عوارض مخرب آزاتیوپرین بر عملکرد کبد می‌باشد. نتایج مطالعات متعدد نشان می‌دهد که زنجبیل، استرس اکسیداتیو القا شده توسط هپاتوتوکسین‌های مختلف را به وسیله افزایش فعالیت یا افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، کاهش می‌دهد.

نتایج مطالعه Abdel-Azeem و همکاران نشان داد تجویز عصاره زنجبیل به همراه استامینوفن، سبب کاهش معنی‌داری سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی AST و ALP نسبت به گروه استامینوفن می‌گردد (۱) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

شریعت‌زاده و همکاران نشان دادند که عصاره‌ی زنجبیل با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فلاونوئیدی خود تا حدود زیادی قادر به جبران اثرات سیتوتوکسیتی نانوذرات نقره بر روی فعالیت آنزیم‌های کبدی، فاکتورهای هماتولوژی، شاخص‌های استرس اکسیداتیو خون و میزان آپوپتوزیس در بافت کبد می‌باشد (۲٤).

Motawi و همکاران نیز دریافتند که عصاره‌ی اتانولی زنجبیل احتمالاً یکی از کاندیداهای درمانی فیبروز کبدی است که توسط تتراکلرید کربن (CCL4) ایجاد می‌شود و علت افزایش سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز است (۱۹).

علاوه بر این، در مطالعات متعدد نشان داده شده است که برخی از گیاهان و ترکیبات آنتی اکسیدانی دارای اثرات محافظتی در برابر عوارض کبدی ناشی از آزاتیوپرین می‌باشند. Amin و Hamza نشان دادند که سه گیاه چای ترش (*Hibiscus sabdariffa*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis*) و مریم گلی (*Salvia officinalis*) قادر هستند به واسطه خواص آنتی‌اکسیدانی خود، عوارض کبدی ناشی از

آزاتیوپرین را کاهش دهند (٤). در دو مطالعه مجزای صورت گرفته توسط عمواغلی تبریزی و همکاران نشان داده شده است که تزریق ویتامین‌های E و A نیز می‌توانند اثرات اکسیدانی ناشی از آزاتیوپرین را بر طرف نمایند و افزایش آنزیم‌های کبدی متعاقب تجویز دارو را کاهش دهند (٥). بنابراین کاهش عوارض مخرب آزاتیوپرین بر کبد توسط عصاره زنجبیل در مطالعه حاضر نیز با خواص آنتی اکسیدانی این گیاه مرتبط می‌باشد.

زنجبیل دارای فعالیت آنتی اکسیدان قوی در محیط In vitro و In vivo در مقابل رادیکال‌های آزاد می‌باشد. عصاره زنجبیل با داشتن ترکیباتی چون شوگااول، جینجرول و زینجیبرون خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای دارد که می‌تواند با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما منجر به کاهش استرس اکسیداتیو شود. مشخص شده که ٦ جینجرول دارای عمل آنتی‌اکسیدان در محیط In vitro و In vivo است و به عنوان یک عامل مؤثر برای جلوگیری از تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و حفاظت سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو محسوب می‌شود (١٣).

ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدها نظیر کوئرستین نیز به عنوان دیگر ترکیبات شناخته شده در گیاه زنجبیل، به دلیل فعالیت آنتی اکسیدانی قوی نقش ایمنی سلولی در برابر استرس اکسیدایتو دارند. این ترکیبات می‌توانند سلول را در برابر تخلیه گلوتاتیون احیاء، با افزایش ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (گلوتاتیون، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسید و کاتالاز) محافظت نمایند (٩). فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی اساساً به واسطه خواص احیاکنندگی آن‌ها است که اجازه می‌دهد آن‌ها به عنوان احیاکننده، دهنده هیدروژن و غیرفعال کننده اکسیژن تنها، عمل کنند (١١). حضور دو گروه هیدروکسیل (OH) مجاور هم باعث افزایش قدرت احیاکنندگی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی در کوئرستین شده است (٢٥). این ترکیبات دارای اثرات حفاظتی بر روی کبد در برابر آسیب‌های ناشی از سموم کبدی و رادیکال‌های آزاد هستند (٨).

نتایج میکروسکوپی مطالعه حاضر نشان داد دوز ٥٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم آزاتیوپرین باعث پرخونی و اتساع عروق، تخریب هپاتوسیت‌ها، به هم‌ریختگی نظم هپاتوسیت‌ها و ارتشاح سلول‌های آماسی در اطراف ورید مرکز لبولی می‌گردد.

در مطالعه Watanabe و همکاران نیز آزاتیوپرین موجب نکروز مرکز لوبولی و تکثیر میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی خشن شده است (٢٨) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

Lee و همکاران نیز مکانیسم سمیت آزاتیوپرین در هپاتوسیت‌های موش صحرایی را افزایش فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه آسیب میتوکندریایی و مرگ سلولی بیان کردند (١٦).

تیوپورین متیل ترانسفراز (TPMT) و گزانتین اکسیداز (XO)دو آنزیم مهم جهت متابولیسم آزاتیوپرین در کبد به شمار می‌آیند. یکی از مکانیسم‌های هیپاتوتوکسیسیتی آزاتیوپرین، افزایش فعالیت آنزیم تیوپورین متیل ترانسفراز (TPMT) است که منجر به هیپرمتیلاسیون در بافت کبد و در نتیجه آسیب کبدی می‌گردد. اکسیداسیون آزاتیوپرین و ٦-مرکاپتوپورین به وسیله آنزیم گزانتین اکسیداز (XO) نیز باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه آسیب بیشتر بافت کبد می‌شود (٦). افزایش رادیکال‌های آزاد باعث تخریب اکسیداسیونی سلولی اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه موجود در ساختمان غشاء سلولی می‌شود که به عنوان پراکسیداسیون لیپید شناخته می‌شود. در صورتی که این تخریب اکسیداسیونی شروع شود، به طور زنجیروار ادامه یافته و مالون دی آلدئید تولید می‌شود. این وضعیت در نهایت ممکن است

باعث مرگ سلولی همراه با علایم گسترده بیماری شود (۲٤). در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره زنجبیل به همراه آزاتیوپرین به صورت وابسته به دوز از شدت آسیب بافت کبدی نسبت به گروه آزاتیوپرین کاسته شده و میزان به هم‌ریختگی نظم هپاتوسیت‌ها، ارتشاح سلول‌های آماسی و پرخونی و اتساع عروق کم‌تر شده و در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره زنجبیل حتی به گروه کنترل نیز نزدیک گردیده است.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد ترکیبات موجود در گیاه زنجبیل سبب تثبیت غشای سلول‌های کبدی و کاهش آزادسازی آنزیم‌های کبدی به خون شده و شدت آثار تخریبی آزاتیوپرین بر بافت کبد را کاهش داده است.

منابع

1. Abdel-Azeem A.S., Hegazy A.M., Ibrahim K.S., Farrag A.R., El-Sayed E.M., 2013. Hepatoprotective, antioxidant, and ameliorative effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and vitamin E in acetaminophen treated rats. *Journal of Dietary Supplements*, 10(3): 195-209.

2. Abdulaziz Bardi D., Halabi M.F., Abdullah N.A., Rouhollahi E., Hajrezaie M., Abdulla M.A. 2013. In vivo evaluation of ethanolic extract of *Zingiber officinale* rhizomes for its protective effect against liver cirrhosis. *BioMed Research International*, 918460.

3. Ajayi O.B., Odutuga A., 2004. Effect of low-zinc status and essential fatty acid deficiency of activities of aspartate aminotransferase and alanin amino tranferazse in liver and serum of albino rats. *J Nahrung*, 48(2): 88-90.

4. Amin A., Hamza A.A., 2005. Hepatoprotective effects of Hibiscus, rosmarinus and salvia on azathioprine induced toxicity in rats. *Life Science*, 77(3): 266-78.

5. Amouoghli Tabrizi B., Mohajeri D., Doostar Y., Baradaran Alizade A., 2009. Biochemical and pathological study of protective effect of Vitamin A in Azathioprine- induced hepatotoxicity in Rat, Feyz, *Jouranal of Kashan University of Medical Sciences*, 13: 180-187.

6. Aniya Y., Koyama T., Miyagi C., Miyahira M., Inomata C., Kinoshita S., Ichiba T., 2005. Free radical scavenging and hepatoprotective actions of the medicinal herb, Crassocephalum crepidioides from the Okinawa Islands. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(1): 19-23.

7. Ansari A., Elliott T., Baburajan B., Mayhead P., Donohue J.O., Anderson J.S., Dudley J., 2008. Long-term outcome of using allopurinol cotherapy as a strategy for overcoming thiopurine hepatotoxicity in treating inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 28: 734-741.

8. Carreon J.P., Iimenez G.C., Vega J.I., 2002. Genotoxic and antigenotoxic properties of Calendula officinalis extract in rat liver cell cultures tread with diethy initrosamin. *Toxicology in Vitro*, 16: 235-58.

9. Catherine A., Evans R., Nicholas J.M., Geoge P., 1996. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 933-956.

10. Chevallier A., 1996. The encyclopedia of medicinal plants. Dorling Kindersley, London. Pp: 153.

11. Cos P., Rajan P., Vedernikova I., Calomme M., Pietres L., Vlietinck A.J., 2002. In vitro antioxidant profile of phenolic acid derivatives. *Free Radical Research*; 36: 711-16.

12. Giannini E.G., Testa R., Savarino V., 2005. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canadian Medical Association Journal*, 127: 367-379.

13. Haksar A., Sharma A., Chawla R., Kumar R., Arora R., Singh S., Prasad J., Gupta M., Tripathi R.P., Arora M.P., Islam F., Sharma R.K., 2006. Zingiber officinale exhibits behavioral radioprotection against radiation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 84: 179-188.

14. Harper H.A., Redwel U.M., Mayes P.A., 1979. Review of physiological chemistry. 17th ed. Lang Medical Publication, California; 7.

15. Khoshvaghti A., Mard Khoshnood, M., 2014. Investigation of Zinjiber powder effects on liver, kidney and pancreasis indexs in rat. *Iranian Journal of Vetrinary Clinical Sciences*, 8(1): 63-79.

16. Lee A.U., Farrell G.C., 2001. Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: oles of glutathione depletion and mitochondrial injury. Journal of Hepatology, 35(6): 756-64.

17. Manju V., Nalini N., 2010. Effect of ginger on lipid peroxidation and antioxidant status in 1, 2-dimethyl hydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *BioChem Technology*, 2 (2): 161 - 7.

18. Minaiyan M., Ghannadi A., Mahzouni P., Nabi-Meibodi M., 2008. Anti-ulcerogenic effect of ginger (rhizome of *Zingiber officinale* Roscoe) hydroalcoholic extract on acetic acid-induced acute colitis in rats. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 3(2): 15-22.

19. Motawi J.K., Hamed M.A., Shabana F., 2011. *Zingiber officinale* acts a nutraceutical agent against Liver fibrosis. *Nutrition* & *Metabolism*, 8:40-46.

20. Murthy S.N., Cooper H.S., Shim H., Shah R.S, Ibrahim S.A., Sedergran D.J., 1993. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporine. *Digestive Diseases and Sciences*, 38(9): 1722-1734.

21. Park S.W., Lee S.M., 2008. Antioxidant and prooxidant properties of ascorbic acid on hepatic dysfunction induced by cold ischemia/reperfusion. *European Journal of Pharmacology*; 580(3): 401-6.

22. Prasanna K., Kalpagam P., Nirmala K., 2007. Alterations in antioxidant status of rats following intake of gingerthrough diet. *Food chemistry*, 106: 991-6.

23. Rosalki S.B., Mcintyre N., 1999. Biochemical investigations in the management of liver disease. Oxford textbook of clinical hepatology, 2nd ed. New York, Oxford University Press: 503-521.

24. Shariatzadeh S.M., Kazemipour N., Nazifi S., 2016. Investigation of Protective Effect of Hydroalcoholic Extract of Ginger on Cytotoxity of Silver Nanoparticles on Hepatic Enzymes، Hemathologic Factors, Blood Oxidative Stress Markers and Hepatic Apaptosis in Balb-c Mice. *Arak Medical University Journal (AMUJ)*, 19(114): 78-87.

25. Solhjo K., Kargar Jahromi H., Solhjo K.A., Kargar Jahromi Z., Khabbaz Kherameh Z., Mahdiyar M., 2015. The effect of the aqueous extract of Orchid roots on the serum concentration of progesterone and luteinizing hormone in adult female rats. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 13(1):21-26.

26. Soochan D., Keough V., Wanless I., Molinari M., 2012. Intra and extra-hepatic cystadenoma of the biliary duct. Review of literature and radiological and pathological characteristics of a very rare case. *British Medical Journal Case Reports*, doi:10.1136/bcr.01.2012.5497

27. Sun C., Chen D., Qu Z., Hao J., Wang J., 1996. Protective effects of radix Salviae miltiorrhizae on azathioprine hepatotoxicity in rats. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 21(8): 496-8, 512.

28. Watanabe A., Hobara N., Tobe K., Endo H., Nagashima H., 1997. Biochemical and morphological study on hepatotoxicity of azathioprine in rat. *Acta Med Okayama*, 33(1): 5-14.