ORIGINAL ARTICLE

Protective Effect of Methanol and Hot-water Extraction from Trametes versicolor on Ethanol-induced Liver Toxicity in Mice

Mohammad Shokrzade[1],
Omran Habibi[2],
Ali Abbasi[3],
Maryam Makhlugh[4],
Aneseh Sadat Hosseini[5],
Safie Poolaee[5]

[1] Pharmaceutical Research Center, Associate Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Pharmacological Sciences Research Center, Assistant professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Legal Medicine Research Center, Mazandaran Department of Forensic Medicine, Sari, Iran
[4] Laboratory Animal Research Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] PhD in Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received July 22, 2014 ; Accepted February 3, 2015)

Abstract

Background and purpose: Alcoholic liver disease (ALD) such as alcoholic steatosis, hepatitis and cirrhosis are complex multistep chronic diseases reported in many animal studies. Chronic alcohol consumption induces hepatic oxidative stress due to increased generation of reactive oxygen species and/or reduced antioxidant capacity. Trametes versicolor belongs to the more advanced Basidiomycetes class of fungi that grows on tree trunks throughout the world. The aim of this study was to investigate the hepatoprotective effect of methanol and hot-water extraction from Trametes versicolor.

Materials and methods: Trametes versicolor was collected and maceration extraction was performed. The extraction was then powdered through freeze drying. This study was performed in 20±5g weight male mice that were randomly divided into 8 groups (n=4 per group). Different doses of extract were gavaged for a week. Finally, liver tissues were removed for measuring Glutathione (GSH) level and blood samples were taken for determining AST, ALT and ALP levels.

Results: There were statistically significant differences in GSH and ALT, AST, ALP levels between the groups receiving Ethanol + different doses of extracts and Ethanol. No significant differences were found in GSH and liver enzymes level in the group receiving Ethanol + methanol and hot-water extract of Trametes versicolor 200 mg/Kg compared with the normal group.

Conclusion: The results showed the antioxidant effect of investigated extracts on hepatotoxicity of ethanol in mice. These extracts can return GSH concentrations to normal levels and protect liver cells from damage and increase of AST, ALT and ALP enzyme levels.

Keywords: Mice, Trametes versicolor, liver toxicity

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(121): 141-151 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۲۱ بهمن سال ۱۳۹۳ (۱۵۱-۱۴۱)

بررسی اثر محافظتی عصاره متانولی و آب داغ قارچ دارویی ترامتس ورسیکالر بر سمیت کبدی ناشی از اتانول درموش سوری

محمد شکرزاده[۱]
عمران حبیبی[۲]
علی عباسی[۳]
مریم مخلوق[۴]
آنسه السادات حسینی[۵]
صفیه پولایی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: بیماری‌های کبدی مختلف به واسطه الکل مانندالکلیک استئاتوسیز، هپاتیت کبدی و سیروز الکلیک در مطالعات حیوانی گزارش شده است. مصرف طولانی مدت ومزمن الکل باعث اکسیداتیو استرس در کبد و کاهش ظرفیت اکسیدانی می‌گردد. ترامتس ورسیکالر قارچی است که روی تنه درختان رشد می‌کند و متعلق به گروهی از قارچ‌های بازیدیومیست است. هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظت کبدی عصاره متانولی و آب داغ حاصل از قارچ ترامتس ورسیکالر می باشد.

مواد و روش‌ها: پس از جمع‌آوری قارچ ترامتس ورسیکالر و عصاره‌گیری به روش ماسراسیون، عصاره حاصل با استفاده از فریزدرایر به صورت پودر درآمد. این مطالعه بر روی موش‌های سوری نر با وزن ۵±۲۰' گرم انجام شد. موش‌ها به طور تصادفی به ۸ گروه (۴ تایی) تقسیم شده و با دوزهای مختلف از عصاره‌ها به مدت یک هفته گاواژ شدند. در نهایت بافت کبد برای اندازه‌گیری گلوتاتیون احیا (GSH) خارج ونمونه‌خون برای اندازه‌گیری سطح آنزیم‌های آلانین آمینوترنسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز(ALP) گرفته شد.

یافته‌ها: در گروه‌های دریافت‌کننده اتانول با دوزهای متفاوت از عصاره‌ها در مقایسه باگروه دریافت‌کننده اتانول، گلوتاتیون و آنزیم‌های AST، ALT و ALP اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت و همچنین در سطح گلوتاتیون و آنزیم‌های کبدی در گروه دریافت کننده اتانول با عصاره آب داغ و متانولی قارچ ترامتس ورسیکالر با دوز ۲۰۰mg/Kg در مقایسه باگروه نرمال اختلاف آماری معناداری دیده نشد.

استنتاج: نتایج حاصل از مطالعه نشان‌دهنده اثر آنتی اکسیدانی موثر عصاره‌های مذکور بر سمیت کبدی ناشی از اتانول در موش سوری می‌باشد این عصاره‌ها می‌توانند سبب ایجاد ذخایر گلوتاتیونی به حالت نرمال بدن پس از مصرف اتانول شوند و از تخریب سلول‌های کبدی و افزایش سطح آنزیم‌های AST، ALT وALP در سرم جلوگیری نمایند.

واژه های کلیدی: ترامتس ورسیکالر، سمیت کبدی، موش سوری

مقدمه

بر طبق گزارشی که سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۰۸ سالانه ۱/۸ میلیون نفر در اثر مصرف الکل جان خود را از دست می‌دهند(۱). بیماری‌های کبدی مختلف و متنوعی با واسطه الکل وجود دارد از قبیل

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۱۹۱- ۹۲ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مولف مسئول: آنسه سادات حسینی- تهران، خیابان تهران نو، خ شهید اشراقی، ک شهید صانعی E-mail:ane_h_68@yahoo.com

۱. مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشیار، گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. مرکز تحقیقات علوم دارویی، استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. مرکز تحقیقات پزشکی قانونی، اداره کل پزشکی قانونی استان مازندران، ساری، ایران
۴. انستیتو تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. دکتری داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۴/۳۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۵/۴ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۱۱/۵

الکلیک استئاتوسیز، هپاتیت کبدی و سیروز الکلیک که در مراحل مختلف بروز پیدا می‌کنند و با بررسی‌های مختلف روی نمونه‌های حیوانی گزارش شده‌اند(۵-۲). مصرف طولانی مدت و مزمن الکل باعث استرس اکسیداتیو در کبد وکاهش ظرفیت اکسیدانی آن می‌گردد(۶) و همچنین باعث ایجاد لیپیدپراکسید می‌شود که به طور مستقیم سبب آسیب جدی به غشای سلول‌ها و ارگانل‌های این بافت و آزادسازی آلدهیدهای فعالی می‌گردد که اثرات فاکتورهای التهابی و پروفیبریتیک را نشان می‌دهد(۷). استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها از دیرباز در جوامع بشری معمول بوده وتا حدود نیم قرن پیش گیاهان یکی از مهم‌ترین منبع تأمین دارو برای درمان دردها به شمار می‌رفتند(۸) لزوم بررسی اصولی و واقع بینانه طب سنتی وگیاهان دارویی از مدت‌ها قبل درجوامع علمی کشورمان احساس شده و در سال‌های اخیر به ضرورت بررسی گیاهان دارویی توجه بسیاری شده است(۸).

کبد یکی از بافت های مهم جهت جذب، متابولیزه کردن و دفع داروها و سایر مواد مضردر بدن جانوران است. لذا همواره در معرض عوارض سمی داروها و مواد مختلف بوده و از این نظر مورد توجه خاص می‌باشد. چندین تست بیوشیمیایی در تشخیص بیماری‌های کبدی استفاده می‌شود. مهم‌ترین این تست‌ها تعیین فعالیت آمینوترانسفرازهای سرمی (AST وALT) و تعیین سطح گلوتاتیون احیا می‌باشند که نشان دهنده صدمه به هپاتوسیت‌ها هستند.افزایش فعالیت آن‌ها همیشه حضوریک بیماری فعال کبدی را هشدار می‌دهند. آلکالین فسفاتاز (ALP) نیزدر بیماری‌های مرتبط با ترشح و دفع صفرا (بیماری‌های کلستاتیک) افزایش می‌یابد(۹). درطی دهه اخیر تعداد زیادی از محصولات گیاهی و ترکیب‌های غذایی به عنوان محافظ کبدی مورد بررسی قرارگرفته‌اند(۸).

کوریولوس ورسیکالر که به آن ترامتس ورسیکالر یا پلی پوروس ورسیکالر می‌گویند، قارچی است که روی تنه درختان رشد می‌کند و متعلق به گروهی از قارچ‌های بازیدیومیست است. این قارچ از مدت‌های دور در کشورهای شرقیمورد استفاده قرار می‌گرفت. و تقریبا در هر جایی که قطعات و تنه‌های چوب سخت مرده و در حال پوسیدن وجود داشته باشند، دیده می شود وگاهی نیز روی چوب کاج ها به صورت سالیانه رشد می‌کند. همچنین در سراسر مناطق جنگلی استوایی آسیا و اروپا هم دیده شده است(۱۰). درحدود سال ۱۹۶۵ یک مهندس شیمی به دلیل خواص ضدسرطانی مشاهده شده به بررسی این قارچ پرداخت، او مشاهده کرد همسایه‌اش که مبتلا به سرطان بوده بعد از خوردن یون ژی معالجه شد. این امر منجر به کشف PSK (پلی ساکارید Krestin)گردید و کمی بعد نیز PSP (پلی ساکارید پپتید) در چین حدود سال‌های ۱۹۸۳ ایزوله شد. تا به حال PSK از نظر بالینی موثرترین داروی سرطان‌های معده، مری، مقعد و ریه بوده است. هم‌چنین در زیرمجموعه سرطان‌های سینه موثر است. پروتئوگلیکان‌های PSK و PSP تولید سلول‌های ایمنی را تقویت کرده، علائم شیمی درمانی را بهبود می‌بخشند(۱۱). در کوریولوس ورسیکالر، پلی ساکاریدها از ترکیب منحصر به فرد اسیدهای آمینه و گلوکان‌های بتا ساخته شده اند و باعث تحریک فعالیت آنتی‌ژن ماکروفاژها و متعاقبا تحریک فعالیت کلی ایمنی می‌شوند. تحقیقات متعدد نیز توانایی پلی ساکاریدهای کوریولوس در ارتقاء تکثیر لنفوسیت‌های B و T را گزارش کرده‌اند(۱۰). علاوه بر فعالیت‌های ضد سرطانی در بین قارچ‌های دارای فعالیت آنتی توموری نیز ترامتس ورسیکالر ویژگی های مهمی را نشان می‌دهد. این ویژگی‌ها با توجه به پلی ساکاروپپتید های PSP و PSK که هر دو دارای قسمت پلی‌ساکاریدی یکسان بوده و ترکیب پروتئینی شان متفاوت است قابل توجیه می‌باشد(۱۲). این قارچ اهمیت زیادی به عنوان مکمل در شیمی درمانی و رادیوتراپی سرطان داشته و احتمالا موثرترین قارچ داروئی ضد سرطان است و به‌طور کلی

در سرطان‌های ریه، روده و معده اثرات زیادی از خود نشان داده است. ترامتس ورسیکالر باعث کاهش اثرات جانبی داروهای شیمی درمانی شده و رشد تومور را کند می‌کند(۱۰). مکانیزم مولکولی دقیق عمل PSP و PSK هنوز کشف نشده است. با این حال این ترکیبات بیش‌تر از طریق پیشرفت سیستم ایمنی میزبان عمل می‌کنند. اثرات تعدیل کننده سیستم ایمنی و آنتی تومور و آنتی‌باکتریال از این قارچ گزارش شده است(۱۳). با توجه به اهمیت قارچ مذکور، هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر محافظت کبدی عصاره‌های متانولی و آبی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: گلوتاتیون استاندارد، DTNB (دی تیوبیس نیتروبنزوئیک اسید)، بافرتریس (PH=۸/۹)، TCA (تری کلرواستیک اسید) و EDTA (اتیلن دی آمین تترا استیک اسید)، همگی از شرکت مرک آلمان، اتانول از شرکت نور زکریای رازی و نرمال سالین از شرکت داروسازی ثامن خریداری شد. د. قرائت میزان جذب توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر Shimadzu UV-mini 124 ساخت ژاپن و عملیات سانتریفیوژ بادستگاه *Hettich Universal* ساخت آلمان انجام شد.

روش عصاره گیری

قارچ کوریولوس ورسیکالر در آبان سال ۱۳۹۰ از جنگل‌های شهرستان نکاء روستای چلمردی استان مازندران در ارتفاع حدود ۵۰۰ متری از سطح دریا از روی درختان افتاده ممرز و راش جمع‌آوری گردید و نمونه هرباریومی پس از تائید گونه مورد نظر در هرباریوم مرکز تحقیقات جنگل‌ها و مراتع پاسند شهرستان بهشهر استان مازندران به شماره هربایومی IRAN,MZ.290 F نگه‌داری شد. جهت از بین رفتن حشرات موذی و چوب خوارها و کپک‌ها، قارچ به مدت ۷۲ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. جهت خشک کردن قارچ‌ها از آون ۳۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته استفاده گردید. سپس به کمک دستگاه آسیاب برقی قارچ‌ها خرد شد. جهت تهیه عصاره متانولی از روش ماسراسیون و حلال متانول مطلق استفاده شد که به مدت ۷۲ ساعت و برای ۳ بار کار عصاره‌گیری انجام گرفت. برای تهیه عصاره آب داغ ابتدا قارچی که عصاره متانولی از آن تهیه شده بود، زیر هود کاملا خشک کرده، سپس داخل بالن آب داغ ریخته و به مدت ۲ ساعت جوشانده شد و این ۷۸ مراحل ۳ بار تکرار گردید. در نهایت عصاره‌های متانولی و آب داغ به دست آمده جداگانه با دستگاه روتاری و خلا تغلیظ شده، سرانجام برای به دست آوردن پودر عصاره‌ها، در دستگاه فریز درایر به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در نهایت پودر خشک عصاره‌ها در ظرف دربسته و دور از نور و جای خنک نگه‌داری شد.

روش مداخله

این مطالعه روی موش‌های کوچک در محدوده وزنی ۲۰±۵ gr (وزن شده توسط ترازوی Sartorius با دقت ۰/۰۰۱) انجام گرفت. حیوانات در حیوان خانه دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تحت شرایط طبیعی تاریکی، غذا و آب قرارگرفتند و موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. برای بررسی سمیت کبدی، حیوانات با اتانول به عنوان مدل سمیت زا جهت القای سمیت تماس داده شدند (به جزگروه اول که به عنوان نرمال در نظر گرفته شدند) موش‌ها به طور تصادفی به ۸ گروه (۴ تایی) تقسیم شده و باترکیبات مختلف به شرح ذیل به مدت یک هفته گاواژ شدند.

گروه اول: به عنوان گروه شاهد، نرمال سالین ۰/۹درصد میزان ۰/۵ml.

گروه دوم: به عنوان گروه کنترل، دوز معین اتانول ۷۰ درصد به میزان g/Kg ۷/۵ هر ۱۸ساعت برای ۲دوز(۸).

گروه سوم تا پنجم: دوزهای مختلفی از عصاره آب داغ ترامتس ورسیکالر (۵۰mg/kg، ۱۰۰mg/kg، ۲۰۰mg/kg) را به صورت خوراکی، ۲۴ ساعت پس از تیمار با اتانول دریافت کردند.

گروه ششم تا هشتم: دوزهای مختلفی از عصاره متانولی ترامتس ورسیکالر (۵۰mg/kg، ۱۰۰mg/kg، ۲۰۰mg/kg) را به صورت خوراکی، ۲۴ ساعت پس از تیمار با اتانول دریافت کردند. با رعایت اصول اخلاقی و با شرایط بی‌هوشی کامل با دی اتیل اتر، در روز ۷ مطالعه موش‌های مورد مطالعه در گروه های مختلف کشته شدند و پس از جراحی، خونگیری به روش مستقیم از قلب حیوان انجام شد و بلافاصله نمونه های خونی جهت اندازه گیری آنزیم های کبدی، سانتریفوژ گردید. همچنین، کالبد شکافی،برای برداشت نمونه کبدی جهت اندازه گیری سطح گلوتاتیون انجام شد. بعد از جراحی شکم موش و کنار زدن پرده های رویی، مستقیم از قلب موش ۱/۵ الی ۲ میلی لیتر خون دریافت شد و به لوله سانتریفیوژ منتقل گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه گذاشته شد تا انکوبه شود، بعد با دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس حدود ۱ میلی لیتر سرم به دست آمد. کیت مورد استفاده برای هر سه آنزیم، AST، ALT وALP، Elitek بود. برای به‌دست آوردن AST و ALT از روش اسپکتوفتومتری (UV Test بهینه سازی شده)، استفاده گردید و هم‌چنین برای اندازه‌گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز نیز از آزمون فتومتری کینتیک استفاده شد.نتیجه به دست آمده از این سه آنزیم به صورت U/L گزارش شده است(۱۴).

برای اندازه گیری گلوتاتیون احیاء نیز از روش المن استفاده شد. بدین منظور ۰/۱ گرم از کبد موش را به لوله هموژنایزر منتقل،۱ میلی لیتر EDTAبه آن افزوده شد و چند بار عمل هموژن کردن صورت گرفت تا مخلوط یکنواختی به دست آید. سپس محتویات آن به لوله سانتریفیوژ منتقل و ۰/۵ میلی‌لیتر دیگر EDTA به آن اضافه شد. در مرحله بعد، به لوله سانتریفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتر TCA با خلوص ۱۰ درصد اضافه شد. سپس لوله‌ها در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵دقیقه سانتریفیوژ شده و یک میلی لیتر از محلول رویی به لوله سانتریفیوژ دیگر منتقل گردید وبه آن ۲/۵ میلی لیتر بافرتریس ۰/۴ مولار (pH=۸/۹) و ۰/۵ میلی لیتر DTNB اضافه شد. لوله به آرامی تکان داده شد تا رنگ زرد یکنواختی در آن پدیدار گردد. در نهایت جذب محلول حاصل در طول موج ۴۲۱ نانو متر قرائت گردید. با مقایسه جذب حاصل با منحنی استاندارد، غلظت گلوتاتیون محاسبه و براساس میکرومول بر هر گرم وزن کبد گزارش شد(۷، ۱۷-۱۵).

آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 16 و با استفاده از آزمون آماری One way ANOVA و t-Test تجزیه و تحلیل شدند و (p<۰/۰۵) به عنوان سطح معنی‌داری تلقی گردید.

یافته ها

بیش‌ترین میزان گلوتاتیون مربوط به گروه شاهد (دریافت کننده نرمال سالین) با ۰/۰۱۳± ۰/۰۱۳ و کم‌ترین میزان مربوط به گروه کنترل (دریافت کننده اتانول) با ۰/۰۰۶ ± ۰/۲۲۸ می‌باشد. هم‌چنین میزان گلوتاتیون در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره آب داغ و متانولی قارچ ترامتس ورسیکالر با دوزهای مختلف بعد از گاواژ تک دوز اتانول به همراه عصاره ها نسبت به گاواژ اتانول تنها، به صورت چشمگیری افزایش یافت؛ به‌طوری‌که میزان افزایش گلوتاتیون در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره آب داغ و متانولی قارچ ترامتس ورسیکالر با دوز ۲۰۰mg/Kg به میزان گلوتاتیون گروه شاهد بسیار نزدیک بود. این میزان به ترتیب برابر با ۰/۰۰۰۶ ± ۰/۳۳ و ۰/۰۰۱± ۰/۳۲ می‌باشد (جدول شماره ۱).

داده‌های حاصل از گاواژ عصاره آب داغ و متانولی قارچ ترامتس ورسیکالر با دوز ۵۰mg/Kg بعد از دادن یک دوز اتانول با داده های حاصل از گاواژ نرمال سالین

جدول شماره ۱: میانگین و انحراف معیار گلوتاتیون کبدی (GSH) و آنزیم های ALT، AST و ALPدر حیوانات مورد مطالعه

ردیف	گروه ها	GSH(µmol/g)	AST(U/L)	ALT(U/L)	ALP(U/L)
۱	نرمال سالین	۰/۳۳ ±۰/۰۱۳	۱۳۶/۵۶۶ ±۰/۴۹	۸۷/۲۶۶ ±۱/۴۴۲	۱۹۱/۲۱۶ ±۶/۰۳
۲	اتانول	۰/۲۲۸ ±۰/۰۰۶	۱۸۹/۶۶۷ ±۲/۱۸	۱۲۵/۸ ±۳/۴۲۱	۲۵۵/۳۳۴ ±۴/۴۹
۳	اتانول + عصاره آبی 50mg/Kg	۰/۲۹۷ ±۰/۰۰۴	۱۷۹./۷۶۹ ±۰/۶۲	۱۱۹/۷ ±۱/۵۷۷	۲۴۱/۳۳۴ ±۲/۶۲
۴	اتانول + عصاره متانولی 50mg/Kg	۰/۳۰ ±۰/۰۰۱	۱۷۳/۱ ±۲/۶	۱۱۵/۲ ±۰/۵۵	۲۴۴/۳ ±۲/۰۸
۵	اتانول + عصاره آبی 100mg/Kg	۰/۳۱۱ ±۰/۰۰۱	۱۵۵/۷ ±۰/۳۰۳	۱۱۴/۳۶۷ ±۰/۴۲	۲۲۸/۶۶۷ ±۳/۸۶
۶	اتانول + عصاره متانولی100mg/Kg	۰/۳۱۷ ±۰/۰۰۱	۱۴۲/۲ ±۰/۶۹	۱۰۸/۹ ±۰/۷	۲۳۳ ±۲
۷	اتانول + عصاره آبی 200mg/Kg	۰/۳۳ ±۰/۰۰۶	۱۴۱/۸۶ ±۱/۳۹	۹۱/۹ ±۱/۱۵۲	۲۰۵ ±۴/۵۴۶
۸	اتانول + عصاره متانولی200mg/Kg	۰/۳۲ ±۰/۰۰۱	۱۳۶/۷ ±۰/۶۵	۹۱/۷۷ ±۱/۴	۲۰۲ ±۲

به عنوان گروه شاهد، اختلاف آماری معنی‌داری دارد (p <۰/۰۵) و گاواژ عصاره متانولی با داده‌های حاصل از گاواژ اتانول به عنوان گروه کنترل نیز اختلاف آماری معنی‌داری دارد (p <۰/۰۵) اما عصاره آب داغ با داده‌های حاصل از گاواژ اتانول به عنوان گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری ندارد(p>۰/۰۵). داده‌های حاصل از گاواژ عصاره متانولی قارچ ترامتس ورسیکالر با دوز ۱۰۰mg/Kg بعد از دادن یک دوز اتانول با داده‌های حاصل از گاواژ نرمال سالین به عنوان گروه شاهد، اختلاف آماری معنی‌داری ندارد(p>۰/۰۵) اما گاواژ عصاره آب داغ با داده‌های حاصل ازگاواژ نرمال سالین، اختلاف آماری معنی‌داری دارد (p <۰/۰۵) و هر دو عصاره با داده‌های حاصل از گاواژ اتانول به عنوان گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری دارند (<۰/۰۵ p). داده‌های حاصل از گاواژ عصاره آب داغ و متانولی قارچ ترامتس ورسیکالر با دوز ۲۰۰mg/Kg بعد از دادن یک دوز اتانول با داده‌های حاصل از گاواژ نرمال سالین به عنوان گروه شاهد، اختلاف آماری معناداری ندارد (P>۰/۰۵) اما با داده‌های حاصل از گاواژ اتانول به عنوان گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری دارد (p <۰/۰۵).

نتایج حاصل از تعیین میزان آنزیم‌های ALT، AST و ALP نشان می‌دهد که بیش‌ترین میزان آنزیم‌های ALT، AST وALP مربوط به‌گروه‌کنترل(دریافت‌کننده اتانول) به ترتیب برابر با ۰/۴۲۱ ± ۸/ ۱۲۵ ، ۱۸/۱۸± ۱۸۹/۶۶۷ و ۴/۴۹± ۲۵۵/۳۳۴ و کم‌ترین میزان مربوط به گروه شاهد (دریافت‌کننده نرمال سالین) به ترتیب برابر با ۰/۴۴۲ ± ۸۷/۲۶۶ ، ۳/۴۹ ±۱۳۶/۵۶۶ و ۶/۰۳±۱۹۱/۲۱۶ بود. هم‌چنین میزان آنزیم‌های ALT، AST و ALP در گروه‌های دریافت کننده عصاره آب داغ و متانولی قارچ ترامتس ورسیکالر با دوزهای مختلف بعد از گاواژ تک دوز اتانول به همراه عصاره ها نسبت به گاواژ اتانول تنها، به صورت چشمگیری کاهش یافت؛ به طوری‌که میزان کاهش آنزیم‌های ALT، AST و ALP در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره آب داغ و متانولی قارچ ترامتس ورسیکالر با دوز ۲۰۰mg/Kg به میزان آنزیم‌های ALT، AST و ALP گروه شاهد بسیار نزدیک می‌باشد. سطح سرمی آنزیم ALT، داده‌های حاصل از گاواژ عصاره‌های آب داغ و متانولی قارچ ترامتس ورسیکالر با دوزهای ۵۰mg/Kg و ۱۰۰mg/Kg بعد از دادن یک دوز اتانول با داده‌های حاصل از گاواژ نرمال سالین به عنوان گروه شاهد، اختلاف آماری معنی‌داری نشان داد (p <۰/۰۵) و گاواژ این عصاره‌ها با داده های حاصل از گاواژ اتانول به عنوان گروه کنترل نیز اختلاف آماری معنی‌داری داشت (p <۰/۰۵).

داده‌های حاصل از گاواژ عصاره آب داغ قارچ ترامتس ورسیکالر با دوز ۲۰۰mg/Kg بعد از دادن یک دوز اتانول با داده های حاصل از گاواژ نرمال سالین به عنوان گروه شاهد، اختلاف آماری معنی‌داری دارد (p <۰/۰۵) اما گاواژ عصاره متانولی با داده‌های حاصل ازگاواژ نرمال سالین، اختلاف آماری معناداری ندارد(p>۰/۰۵) و هر دو عصاره با داده های حاصل از گاواژ اتانول به عنوان گروه کنترل اختلاف آماری معناداری نشان دادند (p <۰/۰۵). در مورد سطح سرمی آنزیم AST، داده‌های حاصل از گاواژ عصاره آب داغ

و متانولی قارچ ترامتس ورسیکالر با دوز ۵۰mg/Kg بعد از دادن یک دوز اتانول با داده‌های حاصل از گاواژ نرمال سالین به عنوان گروه شاهد، اختلاف آماری معنی‌داری نشان داد (p <۰/۰۵) و گاواژ عصاره متانولی با داده‌های حاصل از گاواژ اتانول به عنوان گروه کنترل نیز اختلاف آماری معنی‌داری دارد (p <۰/۰۵) اما عصاره آب داغ با داده‌های حاصل از گاواژ اتانول به عنوان گروه کنترل اختلاف آماری معناداری ندارد(p>۰/۰۵). داده‌های حاصل از گاواژ عصاره‌های آب داغ و متانولی قارچ ترامتس ورسیکالر با دوزهای ۱۰۰mg/Kg و ۲۰۰mg/Kg بعد از دادن یک دوز اتانول با داده‌های حاصل از گاواژ نرمال سالین به عنوان گروه شاهد، اختلاف آماری معناداری دارند (p <۰/۰۵) و گاواژ این عصاره‌ها با داده‌های حاصل از گاواژ اتانول به عنوان گروه کنترل نیز اختلاف آماری معنی‌داری دارند (p <۰/۰۵).

در مورد سطح سرمی آنزیم ALP، داده‌های حاصل از گاواژ عصاره‌های آب داغ و متانولی قارچ ترامتس ورسیکالر با دوزهای ۵۰mg/Kg و ۱۰۰mg/Kg بعد از دادن یک دوز اتانول با داده‌های حاصل از گاواژ نرمال سالین به عنوان گروه شاهد، اختلاف آماری معنی‌داری دارند (p <۰/۰۵) و گاواژ این عصاره‌ها با داده‌های حاصل از گاواژ اتانول به عنوان گروه کنترل نیز اختلاف آماری معنی‌داری دارند (p <۰/۰۵).

داده‌های حاصل از گاواژ عصاره‌آب داغ و متانولی قارچ ترامتس ورسیکالر با دوز ۲۰۰mg/Kg بعد از دادن یک دوز اتانول با داده های حاصل از گاواژ نرمال سالین به عنوان گروه شاهد، اختلاف آماری معناداری ندارد (p>۰/۰۵) و هر دو عصاره با داده های حاصل از گاواژ اتانول به عنوان گروه کنترل اختلاف آماری معناداری دارند (p <۰/۰۵).

بحث

نتایج حاصل از مطالعه انجام شده، در دوزهای مختلف دو نوع عصاره قارچ ترامتس ورسیکالر، نشان دهنده اثرات محافظت کبدی عصاره‌های متانولی و آب داغ قارچ مذکور بر سمیت ناشی از اتانول در موش سوری می‌باشد. اتانول یکی از دلایل اصلی بیماری‌های مزمن کبدی شامل کبد چرب، التهاب و عفونت بافت کبد، فیبروز کبدی، سیروز و سرطان سلول‌های کبدی می‌باشد. آسیب کبدی ناشی از اتانول به طور گسترده در مطالعات درون تنی (in vivo) بررسی شده و دو تئوری برای آن به اثبات رسیده است. تئوری اول، تجمع چربی در سلول‌های کبدی و تئوری دوم، بحث آسیب سلولی است. فرضیه اول این موضوع است که اتانول سبب راه‌اندازی بیش از حد سیستم روشن کننده ژن‌های بیوسنتز لیپید و خاموش کردن ژن‌های اکسیداسیون اسید چرب مانند رسپتور فعال‌کننده رشد پراکسیزوم (PPAR-a) می‌شود که موجب تجمع لیپید، شامل اسید چرب آزاد و تری گلیسیرید در کبد می‌شود. فرضیه دوم مربوط به القای سیستم اکسیداسیون میکروزومال شامل سیتوکروم P_{450} فرم 2E1 (CYP 2E1) و الکل دهیدروژناز می‌باشد که در ادامه آن، استرس اکسیداتیو از طریق متابولیسم الکل و فعال سازی سیتوکین ها ایجاد می‌شوند. استرس اکسیداتیو موجب عملکرد معیوب میتوکندری شده و سبب تخلیه ذخایر گلوتاتیون می‌شود و در نتیجه استرس اکسیداتیو می‌تواند سبب کبد چرب شود. هر چند که تجمع چربی به طور اولیه به عنوان آسیب کبدی ناشی از اتانول شناسایی شد، اما استرس اکسیداتیو نقش کلیدی در مرگ سلولی ناشی از اتانول دارد. امروزه برای پیشگیری از هپاتوتوکسیسیته ناشی از اتانول در انسان، یکسری محافظ‌های دارویی به اثبات رسیده است که از جمله آن‌ها فنوفیبرات و سیلیپید (دانه گیاه سیلی مارین که با فسفاتیدیل کولین فرموله شده) را می‌توان نام برد(۱۸).

در حال حاضر، قارچ‌ها یکی از امیدبخش‌ترین موجودات زنده‌ای هستند که در تحقیقات زیست فناوری (در عرصه‌های صنعت، پزشکی و کشاورزی) مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به ارزان بودن و سهولت دسترسی قارچ‌ها این منابع می‌توانند به عنوان

داروهـای طبیعـی و بـدون عـوارض جـانبی در درمـان بیماری های مختلف مصرف شوند(۱۹).

قارچ ترامتس ورسیکالر یکی از انواع قارچ‌های دارویـی اسـت کـه از زمـان‌هـای قـدیم در چـین بـه عنوان‌ترمیم‌کننده زخم و محافظت ایمنی بـدن در مقابـل بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفت. این قارچ دارویی که به وفور در ایران نیز یافت می‌شود غنـی از مـاده‌ای از جنس پلی‌ساکارید- پپتید به نام PSP می‌باشد که کارایی آن در درمان سرطان به اثبـات رسـیده و بـه طـور عمـده مورد استفاده قرار مـی‌گیـرد. هـم‌چنـین پلـی‌سـاکاریدی دیگر نیز از این قارچ قابل استخراج می‌باشـد کـه بـه نـام PSK (پلـی سـاکارید K) معـروف اسـت و یـک آنتـی اکسیدان قوی بوده و رادیکال های آزاد را مهار می کند و به این دلیل، خاصـیت ضـد سـرطانی دارد. تـا بـه حـال PSK از نظر بالینی موثرترین داروی سرطان هـای معـده، مری، مقعد و ریه بوده است. همچنـین در زیـر مجموعـه سرطان‌های سینه نیز موثر است. ماده دیگر استخراج شده از قارچ، پلی ساکارید ورسیکالر یـا VPS مـی باشـد کـه اخیرا به صورت جامد به عنوان مکمل غذایی در ایـالات متحده مورد مطالعه قرار گرفته اسـت.مکـانیزم مولکـولی دقیق عمل PSP و PSK هنوز کشف نشده است. بـا ایـن حال این ترکیبات بیش‌تر از طریق پیشرفت سیستم ایمنی میزبان عمل می‌کنند. اثرات تعدیل‌کننده سیستم ایمنـی و آنتی تومور و آنتی‌باکتریال نیز از این قارچ گزارش شده است(۱۳). همچنین مطالعاتی، هر چنـد انـدک، در زمینـه اثربخشی این قارچ روی سلول‌های کبـدی انجـام گرفتـه است(۲۲-۲۰). در بررسی که Sreenivasan و همکارانش در سال ۲۰۱۰ بروی اثر محافظتی عصاره متانولی حاصل از قارچ Lentinulaedodes روی سمیت کبدی القا شده در موش توسط استامینوفن انجـام دادنـد نتـایج گـزارش شـده حـاکی از آنسـت کـه سـطح آنـزیم هـای کبـدی SGOT و SGPT و آلکـالین فسـفاتاز و بیلـی روبـین در موش‌هایی که عصاره متانولی قارچ ذکر شده را دریافتند نسبت به موش‌هایی که عصاره دریافت نکردند، کـاهش قابل توجهی داشته است(۲۳). مطالعاتی که در سـال‌هـای ۲۰۰۰ و ۲۰۰۳ روی پلی سـاکاروپپتید (PSP) حاصـل از قـارچ تـرامتس ورسـیکالر انجـام شـد نشـان داد کـه پلی‌ساکاروپپتیدها می‌توانند به عنـوان کمکـی در درمـان هپاتیت کبدی و همچنین به عنوان محافظ کبد در مقابـل سم‌های کبدی استفاده گردند(۲۴).

نتـایج مطالعـه حاضـر نشـان داد، ذخیـره گلوتـاتیون کبد پس از مصرف اتانول نسبت به حالت نرمال کـاهش چشمگیری داشت، اما در حـالتی کـه عصـاره متـانولی و آب داغ قارچ مذکور پس از اتـانول خورانـده شـد، ایـن میزان افزایش یافت. به طوریکـه بـا افـزایش دوز عصـاره میزان گلوتاتیون کبد نیز بیش‌تر شد و این میزان به گروه شاهد نزدیک‌تر و از گروه کنترل دورتر شد. طی بررسی تحلیلی و آمـاری نیـز مشـخص شـد کـه افـزایش میـزان گلوتاتیون گروه‌هایی که عصاره‌های ۲۰۰ میلـی‌گـرم بـر میلی لیتر متـانولی و آب داغ دریافـت کردنـد، بـا گـروه کنترل اخـتلاف آمـاری معنـاداری دارنـد ولـی بـا گـروه شاهد اختلاف آماری معناداری ندارند. بنابراین ایـن دوز از هر دو نوع عصاره موجـب افـزایش میـزان گلوتـاتیون کبدی تا حد نرمال می‌شوند ولی عصاره‌ها بـا دوز کمتـر کفایت لازم برای افزایش میزان گلوتاتیون کبـد تـا حـد نرمال را ندارند، هر چند که تا حدی سـبب افـزایش ایـن میزان می‌شوند و اثر افزایشی کمی از خود نشان مـی‌دهنـد. در توجیه ایـن فرآینـد مـی‌تـوان بـه اثـر آنتـی‌اکسـیدانی عصاره قارچ ترامتس ورسیکالر اشاره کرد کـه بـا خنثـی کردن رادیکال‌های آزاد بـدن ناشـی از مصـرف اتـانول، میزان مصرف گلوتاتیون را در بدن کم‌تر کـرده اسـت و همچنـین مـی‌شـود ایـن فرضـیه را مطـرح کـرد کـه عصاره‌های قارچ ترامتس ورسیکالر نقش ویتامین E و C را بـازی میکننـد و در تبـدیل فـرم اکسـید گلوتـاتیون (GSSG) بـه فـرم احیـایش (GSH) نقـش دارنـد و ایـن عصاره‌ها مـی‌توانـد سـبب ایجـاد ذخـایر گلوتـاتیونی بـه حالت نرمال بدن پس از مصرف اتانول شوند(۱۷).

گلوتاتیون به عنوان تیول غیر پروتئینی اصلی موجودات هوازی، فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی داخل سلول به شمار می‌رود(۲۷-۲۵) که در حالت طبیعی به فرم احیا شده‌اش یافت می‌شود و در تعادل با فرم اکسید شده و دی سولفیدی اش، یعنی GSSG است. GSH بعد از اکسید شدن به GSSG تبدیل می‌شود که موادی مانند ویتامین C، ویتامین E و اوروکینون-۱ می‌توانند این مسیر را معکوس کنند تا مجدداً گلوتاتیون اولیه یا همان GSH تولید شود(۲۸،۲۹).

آنزیم‌های کبدی در سرم، که معرف آسیب‌های کبدی و نقص ارگان‌های بدن هستند؛ وقتی سلول‌های کبدی دچار آسیب شوند آنزیم های موجود در آن به داخل سرم آزاد می‌شوند و میزان این آنزیم‌ها در خون افزایش می‌یابد. در این مطالعه نیز مشاهده شد که با مصرف اتانول به عنوان یکی از عوامل مسبب آسیب به سلول‌های کبدی، میزان هر سه آنزیم در سرم افزایش چشمگیری داشت ولی با مصرف عصاره های قارچ موردنظر، تا حدی این میزان کاهش یافت و به حالت نرمال نزدیک شد. به‌طوری‌که با افزایش دوز عصاره، میزان آنزیم‌های کبدی کاهش می‌یابد و به گروه شاهد نزدیک‌تر می‌شود. در مطالعه تحلیلی و آماری، فقط عصاره‌های با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر اختلاف آماری معناداری با گروه کنترل نشان دادولی با گروه شاهد اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند. بنابراین این دوز از عصاره‌ها توانایی حفظ آنزیم‌های کبدی در محدوده نرمال را دارد. اما با دوزهای کم‌تر عصاره هرچند نسبت به گروه کنترل، روند رو به کاهش است اما باز هم می‌توان گفت که میزان آنزیم‌های کبدی دچار تغییر شده‌اند. در صورتی‌که در استفاده همزمان اتانول با عصاره‌های متانولی و آب داغ قارچ ترامتس ورسیکالر با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر می‌توان اذعان داشت که تقریبا تغییری در سطح آنزیم‌های کبدی مشاهده نمی‌شود. آنزیم AST در سیتوپلاسم و میتوکندری سلول‌های بافت‌های قلب، کبد و عضلات وجود دارد. در صورتی که این بافت‌ها دچار ضایعه شوند میزان AST سرم افزایش می‌یابد. در ضایعات مزمن سلول‌های کبدی (سیروزکبدی) ایزوآنزیم AST که در سیتوپلاسم و میتوکندری وجود دارد در پلاسما افزایش می‌یابد. این آنزیم بیش‌تر در تشخیص بیماری‌های کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در هپاتیت ویروسی و یا سایر ضایعات حاد کبدی سطح آن به طور قابل ملاحظه‌ای بالا می‌رود. در ارزیابی نحوه عملکرد سلول‌های کبدی آنزیم ALT اختصاصی‌تر و حساس‌تر از AST است و میزان افزایش آن درابتدای ضایعات بیش‌تر از AST است. در انفارکتوس میوکارد فعالیت ALT کمی بالاتر از حد طبیعی است ولی در نارسایی قلبی افزایش قابل ملاحظه ای دارد که ممکن است به علت تجمع خون در کبد باشد.در افراد بالغ آنزیم ALP موجود در سرم منبع کبدی دارد. اندازه‌گیری این آنزیم در بیماری‌های کبدی، صفراوی و استخوانی دارای اهمیت است(۳۰).

بنابراین از لحاظ اندازه گیری میزان گلوتاتیون کبدی و آنزیم‌های کبدی موجود در سرم، عصاره‌های این قارچ نه تنها باعث آسیب به کبد نمی‌شوند، بلکه در دوز بالا می‌توان بیان داشت که دارای اثر حفاظتی نیز می‌باشند.نتیجه نهایی این که اثربخشی هر دو عصاره متانولی و آب داغ یکسان ارزیابی گردید و به یک اندازه در جلوگیری از بروز سمیت کبدی ناشی از اتانول موثر بوده‌اند.

سپاسگزاری

این مقاله نتیجه کار تحقیقاتی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی مازندران و بخشی از پایان نامه خانم‌ها آنسه‌السادات حسینی و صفیه پولایی، دانشجوی دکترای داروسازی دانشکده داروسازی مازندران می‌باشد. از تمام کسانی که ما را در انجام این پروژه یاری کردند کمال تقدیر و تشکر را داریم.

References

1. Wong NA, D'Costa H, Barry RE, Alderson D, Moorghen M. Primary yolk sac tumour of the liver in adulthood. J Clin Pathol 1998; 51(12): 939-940.
2. Seth D, Hogg PJ, Gorrell MD, McCaughan GW, Haber PS. Direct effects of alcohol on hepatic fibrinolytic balance: implications for alcoholic liver disease. J Hepatol 2008; 48(4): 614-627.
3. Tilg H, Day CP. Management strategies in alcoholic liver disease. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2007; 4(1): 24-34.
4. Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. Alcohol 2004; 34(1): 9-19.
5. Seitz HK, Lieber CS, Stickel F, Salaspuro M, Schlemmer HP, Horie Y. Alcoholic liver disease: From pathophysiology to therapy. Alcohol Clin Exp Res 2005; 29(7): 1276-1281.
6. Chambers RE, Stross P, Barry RE , Whicher JT. Serum amyloid A protein compared with C-reactive protein, alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-acid glycoprotein as a monitor of inflammatory bowel disease. Eur J Clin Invest 1987; 17(5): 460-467.
7. Barry RE, McGivan JD. Acetaldehyde alone may initiate hepatocellular damage in acute alcoholic liver disease. Gut 1985; 26(10): 1065-1069.
8. Song Z, Deaciuc I, Song M, Lee DY, Liu Y, Ji X, et al. Silymarin protects against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice. Alcohol Clin Exp Res 2006; 30(3): 407-413.
9. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. Am J Clin Pathol 1957; 28(1): 56-63.
10. Cui J, Chisti Y. Polysaccharoptides of coriolusversicolor: physiological activity, uses, and production. Biotechnol Adv 2003; 21(2): 109-122.
11. Lindequist U, Niedermeyer THJ, Ju¨lich WD. The Pharmacological Potential of Mushrooms. Germany: Greifswald; 2005. p. 174-187.
12. Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol 2002; 60(3): 258-274.
13. Lovy, A. Activity of Edible Mushrooms Against the Growth of Human T_4 Leukemic Cancer Cells, Hela Cervical Cancer Cells and Plasmodium falciparum. Herbs, Spices and Medicinal Plants J 1999; 6(4): 280-292.
14. Shokrzadeh M, Azadbkht M, Abadean S, Abotorabi M. The Effect of Diospyros lotus on Liver Glutathione Level in Mice Administered by Senecio vulgaris Extract. J Mazandaran Univ Med Sci 2013; 23(98): 200-206.
15. Mirzaei R, Allameh A, Mortazavi B, Khavanin A, Kamalian N. Effect of loud noise on oxidation and lipid peroxidation variation of liver tissue of rabbit. Tabibe- Shargh J 2009; 11(2): 11-17.
16. Gamal el-din AM, Mostafa AM, Al-Shabanah OA, Al-Bekairi AM, Nagi MN. Protective effect ofarabic gum against acetaminophen-inducedhepatotoxicity in mice. Pharmacol Res 2003; 48(6): 631-635.
17. Shokrzade Lamoki M, Pakravan N, Sheikholeslamian S. The Protective Effect Of N-Acetyl cysteine On Glutathione Levels And Serum Cholinesterase In Acute Poisoning Of Diazinon, in mice. J Mazandaran Univ Med Sci 2013; 22(2): 2-11.
18. Ruan X, Shen C, Meng Q. Establishment of a

methodology for investigating protectants againstethanol-induced hepatotoxicity. Food Chem Toxicol 2010; 48(5): 1145-1151.

19. Wasser SP, Weis AL. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms. Int J Med Mushr 1999; 1: 31-62.
20. Kim BK, Park SE, Kim SY, Hyun JW, Kim HW, Shim MJ. Effects of a hot-water Extract of Trametes versicolor (L.Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetideae) on the recovery of rat liver function. Int J Med Mushr 2000; 2: 35-41.
21. Yang XJ, Liu J, Ye LB, Yang F, Ye L, Gao JR, et al. In vitro and in vivo protective effects of proteoglycan isolated from mycelia of Ganodermalucidum on carbon tetrachloride - induced liver injury. World J Gastroenterol 2006; 12(9): 1379-1385.
22. Cheng D, Kong H. The effect of Lycium barbarum Polysaccharide on Alcohol-Induced Oxidative Stress in Rats. Molecules 2011; 16(3): 2542-2550.
23. Sasidharan S, Aravindran S, Latha LY, Vijenthi R, Saravanan D, Amutha S. In Vitro Antioxidant activity and hepatoprotective effects of Lentinulaedodes against paracetamol-induced hepatotoxicity. Molecules 2010; 15(6): 4478-4489.
24. Song, ZX, Liang SW, Wu XQ, Liu XM. Clinical observation of polysaccharide peptide (PSP) capsules for hepatitis B treatment. Guangxi Medical J 2000; 22: 1424-1425.
25. Isika I, Celik I. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbow trout (Oncorhynchusmykiss). Pest Biochem Physiol J 2008; 92(1): 38-42.
26. Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. Methods Cell Sci 2000; 22(2-3): 169-189.
27. Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med 2001; 31(11): 1287-1312.
28. Cotgreave IA, Gerdes RG. Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? Biochem Biophys Res Commun 1998; 242(1): 1-9.
29. Cuozzo JW, Kaiser CA. Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation. Nat Cell Biol 1999; 1(3): 130-135.
30. Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of liver function. In: Braunwald E, Kasper AS, Fauci AL, (eds). Harrison's principles of internal medicine. 21st ed. New York: McGraw-Hill; 2005. p. 1813-1817.