****

**دانشگاه آزاد اسلامي**

**واحد علوم دارویی**

**Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University**

**پایان نامه کارشناسی ارشد**

**بررسی اثرات تیموکوئینون بر میزانTransforming Growth Factor-B در فیبروز کبد کلستاتیک القاء شده با مدل انسداد مجرای صفراوی در موش های صحرایی**

**اساتید راهنما:**

**خانم دکتر مهسا آل ابراهیم**

**آقای دکتر سید پژمان مرتضوی**

**اساتید مشاور:**

خانم دکتر سپیده اربابی

دکتراحمد اصغری

نام دانشجو:

معصومه مرادی اسماعیلی

1398





**تعهد نامه اصالت رساله یا پایان نامه**

اینجانب معصومه مرادی اسماعیلی دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد ناپیوسته در رشته سم شناسی که در تاریخ .......................................... از پایان نامه/ رساله خود تحت عنوان"بررسی اثرات تیموکوئینون بر میزان Transforming Growth Factor-B در فیبروز کبد کلستاتیک القاء شده با مدل انسداد مجرای صفراوی در موش های صحرایی"با کسب نمره........................و درجه.............................دفاع نموده ام بدینوسیله متعهد می شوم:

این پایان نامه/ رساله حاصل تحقیق و پژوهش انجام شده توسط اینجانب بوده و در مواردی که از دستاورد- های علمی و پژوهشی دیگران(اعم از پایان نامه، کتاب،مقاله و....) استفاده نموده ام، مطابق ضوابط و رویه موجود، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آن را در فهرست مربوطه ذکر و درج کرده ام.

این پایان نامه/ رساله قبلا برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی(هم سطح،پایین تر یا بالاتر) در سایر دانشگاه ها و موسسات آموزشی عالی ارائه نشده است.

چنانچه بعد از فراغت تحصیل، قصد استفاده و هرگونه بهره برداری اعم از چاپ کتاب،ثبت اختراع و... از این پایان نامه داشته باشم،از حوزه معاونت پژوهشی واحد مجوزهای مربوطه را اخذ نمایم.

چنانچه در هر مقطعی زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود،عواقب ناشی از آن را می پذیرم و واحد دانشگاهی مجاز است با اینجانب مطابق ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت ابطال مدرک تحصیلی ام هیچگونه ادعایی نخواهم داشت.

**نام و نام خانوادگی:**

**تاریخ و امضاء**

**فهرست**

[**فصل اول: کلیات** 6](#_Toc9612518)

[**1-1بیان مسئله...........** ............00......................................7](#_Toc9612520)

[**2-1اهداف تحقيق (شامل اهداف اصلی ، اهداف فرعی و اهداف کاربردی )........................................................**10](#_Toc9612521)

[**3-1اهمیت موضوع تحقیق و انگیزش انتخاب آن** 11](#_Toc9612522)

[**4-1 سؤالات تحقیق** 12](#_Toc9612523)

[**1-5 فرضيه‏هاي تحقیق................................................................................................................ .....................**12](#_Toc9612524)

[**فصل دوم** 13](#_Toc9612525)

[**1-2مقدمه........** 14](#_Toc9612526)

[**2-2فیبروز کبدی** 14](#_Toc9612527)

[**3-2کلستاز...........** 15](#_Toc9612528)

[**4-2آناتومی کیسه صفرا و مجاری صفراوی** 15](#_Toc9612529)

[**2-5 بیماري هاي کیسه صفرا** 18](#_Toc9612530)

[**2-6 سیاه دانه** 20](#_Toc9612531)

[**2-7 تركيبات سـياه دانـه** 22](#_Toc9612532)

[**2-7-1 تیموکوئینون** 22](#_Toc9612533)

[**8-2 اثر سیاه دانه بر عملکرد پانکراس** 26](#_Toc9612534)

[**2-9 اثر سیاهدانه بر عملکرد کبد** 26](#_Toc9612535)

[**2-10 پیشینه پژوهش** 27](#_Toc9612536)

[**فصل سوم:** **مواد و روش ها** 32](#_Toc9612537)

[**3-1 روش کار: جامعه آماري، روش نمونه‏گيري و حجم نمونه (در صورت وجود و امکان)** 33](#_Toc9612539)

[**3-2 گروه بندی نمونه ها** 34](#_Toc9612540)

[**3-2-1 گروه های درمان تجربی** 34](#_Toc9612541)

[**2-2-3 گروه های کنترل تیموکوئینون** 35](#_Toc9612542)

[**3-3نحوه تجویز داروها** ……………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………………35](#_Toc9612543)

[**4-3روش جراحی انسداد مجرای صفراوی (Bile Duct Ligation, BDL)** 36](#_Toc9612544)

[**5-3 نحوه خون گیری از حیوانات و تثبیت بافت ها** 37](#_Toc9612545)

[**6-3 روش سنجش پارامترهای بیوشیمیایی و اندازه گیری سطح سرمی آنها** 38](#_Toc9612546)

[**7-3 روش تهیه هموژن از بافت کبد و سنجش فعالیت آنزیم های SODو CAT در آن:** 38](#_Toc9612547)

[**8-3 مراحل پاساژ بافتی (Tissue processing)** 39](#_Toc9612548)

[**9-3 انجام رنگ آمیزی (Staining)تری کروم ماسون (Masson Trichrome)** 39](#_Toc9612549)

[**10-3 نحوه ارزيابي هيستوپاتولوژيكي نمونه ها** 40](#_Toc9612550)

[**11-3 رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی** 41](#_Toc9612551)

[**3-12آناليز آماري داده‌ها** 42](#_Toc9612552)

[**4-13روش گردآوری اطلاعات** 43](#_Toc9612553)

[**منابع** ……………………………………………………….. 49](#_Toc9612554)

# **فصل اول**

# **کلیات**

# **بیان مسئله**

امروزه با توجه به پیشرفت علم پزشکی، پیشگیري از فیبروز کبدي و بهبود فیبروز به یک هدف دست یافتنی در درمان بیماريهاي مزمن کبدي تبدیل شده است Czaja et al, 2014)) .کبد اندام اصلی ذخیره و متابولیسم فولات است و جریان صفرا عامل مهمی در گردش کبدي صفراوي آن به شمار میرود(Maha et al,2009). بیماريهاي کبدي میتوانند موجب نقص در شکل­گیري متابولیت فعال فولات، 5 -متیل تتراهیدروفولات (MTHF ،5)براي اشکال کوآنزیمی مورد نیاز بدن شوند (Yates et al,1987).

کبد به عنوان یک اندام مجزا بسیاری از ارگان­های مختلف بدن با آن ارتباط دارند. این موضوع به ویژه در اختلالات کلینیکی کبد آشکار می­شود، زیرا بسیاری از اعمال آن بسته به ماهیت اختلال به طور همزمان است اما در مجموعه­های متفاوت مختل می شوند.کبد از غدد ضمیمه لوله گوارش است. غده­ای است حجیم و به رنگ قرمز قهوه ای که با خون 2400 گرم و در مرده 1500 گرم وزن دارد.

کبد بدلیل سنتز و متابولیسم کربوهیدرات ها ، چربی ها و پروتئین‌ها و همچنین ذخیره سازی بسیاری از مواد مغذی ضروری، ویتامین­ها و مواد معدنی نقش مهمی در حفظ هموستاز بدن برعهده دارد. سلولهای کبد نه تنها موجب غیر فعال کردن هورمون­ها، مواد سمی مانند آمونیاک و داروها میشوند، بلکه موادی مانند بیلی روبین که حاصل تخریب گلبول های قرمز پیر و فرسوده است را از خون گرفته و به همراه مواد دیگری مانند اسیدهای صفراوی و کلسترول به داخل مجاری صفراوی ترشح کرده و از این طریق بخشی از این مواد از بدن دفع میشود(Gaskari et al, 2006; Nabavizadeh et al, 2010).

اختلال درعملکرد کبد ونقد درتولید، ترشح و جریان صفرا منجربه تجمع کبدی و سیستمیک ترکیبات موجود در صفرا میشود که در غلظت های غیرفیزیولوژیک ، اثرات مخرب و سمی بر روی سلولهای کبد و سایر بافت­های بدن دارند(Magyar et al,2004). تداوم این پدیده منجر به عارضه کلستاز کبدی میشود که طی آن افزایش غلظت صفرا موجب تحریک نوتروفیلها به تجمع در کبد، تولید گونه­های فعال اکسیژن (ROS) التهاب بافتی وتوسعه استرس اکسیداتیو می شود که نهایتاً منجربه آپوپتوزونکروز سلول­های کبدی می­شود (Crocenzi et al,2011; Jaeschke et al,2011). کلستاز بیماري کبدي اسـت که در صورت عدم درمان و پیشگیري مناسب موجب فیبروز و سیروز کبدي میشود (( Tomu *et al.,* 2011.

کلستاز اختلال در ترشح صفرا است که در بسياری از بيماریهای کبدی مشاهده ميشود( Reyes et al, 1993 ). اين بيماری ممکن است به صورت خارج کبدی در اثر انسداد مجاری صفراوی مانند وجود سنگ و تومور و يا به صورت داخل کبدی به دليل اختلال در تشکيل صفرا توسط هپاتوسيت­ها و سلولهای مجاری صفراوی مانند نقص ژنتيکي يا اثر زيان­آور برخي داروها ايجاد شود (Thomson & Shaffer et al, 2008; Reyes, 1993 ). کلستاز باعث افزايش توليد پروستاگالندين ها، افزايش سطح نمک­های صفراوی، اندوتوکسمي، توليد نيتريک اکسايد، ايجاد تغييرات عروقي و نيز افزايش سطح اوپيوئيدها مي­شود (Wahler et al,1993; Bergasa et al,1994; Homayoun et al,2002; Spahr et al,2003; Thomson et al,2008 ).

افزايش فعاليت سيستم اوپيوئیدی در سيستم مرکزی در جريان کلستاز به احتمال زياد در ايجاد آسيب بافت کبد حاصل از کلستاز نقش داشته و حداقل تاثير آن، تشديد آسيب کبدی حاصل از تجمع امال صفراوی در کبد بيماران کلستاتيک ميباشد ( Greim et al,1972) ؛ هم‌چنين اثرات ديگر کلساتاز شامل تجمع بيليروبين، اسيدهای صفراوی و کلسترول بوده که در حالت عادی به درون صفرا ترشح مي شوند .( Greim et al,1972; Bergasa et al,2008) علاوه برعوارضي که در اثر عدم دفع صفرا در زمان انسداد مجارای صفراوی بوجود مي آيد، آسيب بافت کبدی را نياز مي توان مشاهده کرد. با گذشت زمان، کاهش ترشح و تجمع صفرا (که در غلظت­های بالا سمي است ) منجر به بدتر شدن بيماری کبدی ميشود .علت ايجاد کلساتاز هرچه باشد نهايتا به آسيب هپاتوسيتها منتهي ميشود و به نقاص در عملکرد کبد مي­انجامد. تجمع نمک­های صفراوی مسئول بخشي از آسيب به هپاتوسايت ها مي باشد. (Cameron et al,1932; Knodell et al,1981)

به دنبال انسداد مجراي صفراوي اسیدهاي (Bile Duct Ligation , BDL) صفراوي آبگریز سمی در کبد تجمع می یابد. تجمع این مواد سمی و رخدادهاي متوالی نظیر استرس اکسیداتیو و پاسخ التهابی با آسیب رساندن به DNA هپاتوسیت‌ها موجب مرگ سلولی، هایپرپلازي مجاري صفراوي و فعال شدن میوفیبروبلاست‌ها میشوند. در نتیجه، با افزایش تجمع کلاژن در ماتریکس خارج سلولی، فیبروز کبدي ایجاد میگردد؛ بیماريهاي مزمن کبدي و به دنبال آن فیبروز کبدي یکی از علل اصلی مرگ و میر جهانی می‌باشند. (Aksu *et al,.* 2010).

سياهدانه گياهي است از خانوادة آلاله كه اثرات درماني متعددي براي آن شناخته شده است. به عنوان مثال در برخي مطالعات نشان داده شده است كه عصاره و اسانس دانه‏هاي سياهدانه داراي اثرات شل‏كنندگي بر روي عضلات صاف از جمله عروق خوني، رودة كوچك ، تراشه و رحم مي‌باشد.

تيموكوئينون[[1]](#footnote-1)، مهمترين مادة مؤثرة موجود در دانه‌هاي گياه سياهدانه بوده و داراي اثرات فارماكولوژيكي متعددي مي‌باشد كه از آن جمله مي‏توان به اثرات آرامبخشي)، ضد ايسكمي ،ضد تشنجي، ضد دردي ، ضد التهابي ، ضد سرطاني محافظت كبدي ،محافظت كليوي و شلي عضلات صاف اشاره كرد.

# **اهداف تحقيق (شامل اهداف اصلی ، اهداف فرعی و اهداف کاربردی ):**

**اهداف اصلی:**

بررسی اثرات تیموکوئینون بر میزان بیان (TGF-B)Transforming Growth Factor-B در فیبروز کبد کلستاتیک القاء شده با مدل انسداد مجرای صفراوی در موش های صحرایی با روش ایمنوهیستوشیمی

**اهداف ویژه :**

بررسی اثر تیموکوئینون در بهبود فیبروز کبدی ناشی از BDL بر اساس مطالعه میکروسکوپی و رنگ آمیزی H&E و Masson Trichrom و روش ایمونوهیستوشیمی.

* بررسی اثر تیموکوئینون در بهبود فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و آنزیم های شاخص کبدی، و سطح لیپیدهای خون در رت های کولستاتیک.
* تیمار TQ در مقادیر 100، 200 mg/kg/bw و بررسی تاثیر هر یک از این غلظت ها بر میزان حفاظت کبدی

**اهداف جزیی :**

* بررسی اثر تیموکوئینوندر کاهش تجمع کلاژن با استفاده از رنگ آمیزی Trichrome Masson
* بررسی اثر تیموکوئینون در کاهش تجمع نوتروفیل ها و کاهش نفوذ سلول های التهابی تک هستهای در بافت کبد رت های BDL با کمک رنگ آمیزی H&E

# **اهمیت موضوع تحقیق و انگیزش انتخاب آن**

تاکنون تحقیقی مبنی بر ارزیابی اثر تیموکوئینون به عنوان ماده موثره ی گیاه سیاهدانه بر کاهش بیان TGF-B به عنوان یک فاکتور قدرتمند فیبروژنیک در کلستاز کبدی ناشی از انسداد مجرای صفراوی صورت نگرفته است.

همچنین تاکنون بالاترین دوز استفاده شده در تحقیقات برای TQ خوراکی mg/kg/bw 100 بوده است. که با توجه به LD50 بالای TQ خوراکی (mg/kg/bw 3/794)، در این مطالعه از دوزهای بالاتر این ترکیب فیتوشیمیایی استفاده خواهد شد.

با توجه به اهميت تأثير سياه دانه و همچنین مهمترین ماده موثره آن یعنی تیموکوئینون بر محافظت از بافت کبد، در مدل تجربی کبد کلستاتیک، اين تحقيق به منظور بررسي اثر ضد فیبروزی تیموکوئینون در مدل تجربی انسداد مجاری صفراوی رت صورت می گیرد.

# **4-1 سؤالات تحقیق**

* آیا تیمار همزمان تیموکوئینون می تواند سبب کاهش بیان TGF-B در بافت کبد کلستاتیک شود؟
* آیا تیمار همزمان تیموکوئینون می تواند روند فیبروز کبدی، ناشی از کلستاز جلوگیری کند؟
* آیا تیموکوئینونمی تواند اثر محافظتی بر علیه سمیت نمک های صفراوی اعمال کند؟
* آیا مصرف تیموکوئینوندر دوزهای مورد نظر بر حفاظت کبدی موثر می باشند ؟
* آیا مصرف تیموکوئین می تواند از تغییرات آنزیمی ناشی از کلستاز جلوگیری می کند ؟
* آیا می توان در آینده ازترکیب تیموکوئینون به عنوان یک داروی مکمل ،در بهبود شرایط بیماران کلستاتیک بهره برد؟

# **فرضيه‏هاي تحقیق:**

1. تیمار همزمان تیموکوئینون می تواند سبب کاهش بیان TGF-B در بافت کبد کلستاتیک شود
2. تیمار همزمان تیموکوئینون می تواند روند فیبروز کبدی، ناشی از کلستاز را مهار کند
3. تیموکوئینون می تواند اثر محافظتی بر علیه سمیت نمک های صفراوی اعمال کند
4. مصرف تیموکوئینون در دوزهای مورد نظر بر حفاظت کبدی موثر می باشند
5. مصرف تیموکوئینون می تواند از تغییرات آنزیمی ناشی از کلستاز جلوگیری کند
6. می توان در آینده ازترکیب تیموکوئینون به عنوان یک داروی مکمل ،در بهبود شرایط بیماران کلستاتیک استفاده کرد.

# **فصل دوم**

# **مقدمه**

مصرف گیاهان دارویی و داروهای گیاهی در کشورهای مختلف روز به روز در حال افزایش است و به این دلیل به اثبات رسیدن اثر بخشی بسیاری از این مواد در مجامع علمی و مقبولیت آن در اکثر جوامع بشری است. به دلیل نگرانی روز افزون در مورد عوارض داروهای شیمیایی و بی اثر بودن تعدادی از آنها در مصرف طولانی مدت،استفاده از ترکیبات طبیعی به صورت جایگزین یا مکمل درمان،بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است.استفاده انسان به عنوان دارو از ابتدای تمدن بشری تاکنون ادامه دارد.داروهای گیاهی به عنوان درمان جایگزین با عوارض کمتر و خواص متعدد و در برخی موارد به عنوان تنها درمان موثر مورد استفاده قرار می­گیرد.

# **2-2 فیبروز کبدی**

فیبروز اختلال اصلی در بیماری های مزمن کبدی است که به طور گسترده ای عامل مرگ و میر در بسیاری از انسان های مبتلا به کلستاز کبدی می باشد. به دنبال آسیب کولستاتیک، کبد تحت یک فرایند مدل یابی مجدد قرار می گیرد که شامل ترمیم و فیبروژنز است. ویژگی اصلی فیبروز، افزایش رسوب ماتریکس خارج سلولی و کاهش تخریب آن است. سلول های Ito نقش اصلی را در پیشرفت فیبروز دارند. TGF-β نیز یک حد واسط قدرتمند برای فعال کردن سلول های Ito و افزایش بیان کلاژن می­باشد.

TGF-β بعلاوه سبب مهار سنتز گلوتاتیون در هپاتوسیت ها و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی سلول می گردد با بهم خوردن تعادل بین اکسیدان-پراکسیدان به نفع پراکسیدان ها، رادیکال های آزاد افزایش می یابند. در طول این فرایند مقدار زیادی α-SMA که یک فاکتور فیبروژنیک است، در ماتریکس خارج سلولی خصوصا در نواحی پورتال تجمع می یابد که مسئول توزیع کلاژن است(Mendel & Kruse et al, 2012).

مکانیسم اصلی کبد چرب تجمع تری گلیسرید در داخل سلولهای کبدی است. بعد از مصرف غذا، تری گلیسرید جذب شده در سلولهای روده باریک از طریق ملکول شیلومیکرون وارد جریان خون سیستمیک شده و به سمت بافتهای محیط (چربی و عضله )حرکت میکند.در اینجا شیلومیکرون از طریق آنزیم لیپوپروتئین لیپاز (LPL) شکسته شده و اسید چرب آزاد (FFA) وارد سلولهای بافت محیطی میشود. باقیمانده شیلومیکرون هم وارد کبد میگردد. Angulo P, Hui JM, Marchesini G et al,2007))

اسیدهای چرب آزاد در داخل میتوکندری سلول کبدی یکی از سه مسیر زیر رادنبال می کنند:

1. مقداری از اسیدهای چرب آزاد از طریق مکانیسم بتا اکسیداسیون میتوکندریال به ATP تبدیل شده و برای تأمین انرژی سلولهای بدن به کار میرود.
2. .مقداری از اسیدهای چرب آزاد بعد از اتصال به آپولیپوپروتئینهایی مانند APO-B تبدیل به VLDLشده و وارد جریان خون سیستمیک میگردد. مولکول VLDLدر بافتهای محیطی از طریق لیپوپروتئین لیپازشکسته شده و اسیدهای چرب آزاد وارد سلولهای بافت محیطی و در آنجا ذخیره میشوند.
3. باقیمانده اضافی اسیدهای چرب آزاد در داخل سلول کبدی به شکل تری گلیسرید ذخیره میگردد. اسیدهای چرب آزاد موجود در بافتهای محیطی هم درافراد چاق و هم در کاهش وزن شدید به دنبال لیپولیز محیطی میتوانند وارد جریان خون سیستمیک و از آنجا وارد کبد شوند. مواد قندی و پروتئینی هم بعد از جذب در سلولهای روده وارد جریان خون سیستمیک و از آنجا وارد کبد میشوند. مازاد کربوهیدراتها و پروتئینها در داخل کبد تبدیل به چربی می شوند.

مکانیسمهای مطرح در ایجاد کبد چرب غیرالکلی و آسیب کبدی ناشی از آن عبارتند از:

1. افزایش ورود اسیدهای چرب آزاد به داخل سلول کبدی مثلاً در اثر مصرف زیاد چربی، در افراد چاق و در کاهش وزن شدید.
2. تجمع اسیدهای چرب آزاد در سلول کبدی به دنبال اختلال در بتااکسیداسیون اسیدهای چرب آزاد
3. اختلال در سنتز و ترشح VLDLمثلاً در آبتالیپوپروتئینمی و سوءتغذیه پروتئین که به دلیل کاهش ملکولهای آپولیپوپروتئین اتفاق میافتد.
4. افزایش تبدیل پروتئینها و کربوهیدراتهابه تری گلیسرید مثلاً در زمینه مصرف زیاد این مواد یا در استفاده از تغذیه تزریقی(TPN).
5. افزایش مصرف کلسترول در مواد غذایی
6. مقاومت به انسولین نقش کلیدی را در ایجاد کبد چرب بخصوص در دیابت نوع دوم و افراد چاق دارد. مقاومت به انسولین همچنین در مبتلایان به NASH که لاغر هستند و تست تحمل گلوکز طبیعی دارند هم مشاهده می شود. مقاومت به انسولین منجر به افزایش لیپولیز در بافتهای محیطی (بافت چربی و عضله).
7. و افزایش جذب کبدی اسیدهای چرب آزاد می شود. سطح سرمی اسیدهای چرب آزاد در بیماران دیابت نوع دوم همراه با NAFLDبیشتر از موارد فاقد NAFLD است.
8. القاء لیپواکسیژناز توسط اسیدهای چرب آزاد در سلول کبدی باعث تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن میشود. زمانی که تعادل بین اکسیدانها و آنتی اکسیدانها به نفع اکسیدانها و رادیکال آزاد اکسیژن تغییر میکند منجر به آسیب کبدی و ایجاد فیبروز از طریق تحریک سلولهای ستارهای(Stellate cell)میشود. کمبود آنتی اکسیدانهایی مانند گلوتاتیون، ویتامین Eو Cو بتاکاروتن میتواند در ایجاد این پدیده نقش داشته باشد و با همین مکانیسم،تجویز آنتی اکسیدانها در درمان فیبروز و التهاب موارد NASHکمک کننده است. آنتی اکسیدانها با مکانیسم کاهش آپوپتوز توسط سلولهای Tباعث کاهش التهاب کبدی میشوند.
9. افزایش آهن کبدی هم درایجاد NASHنقش دارد. در مبتلایان به NASHشیوع موتاسیون HFEو افزایش ذخایر آهن بیشتر دیده میشود. افزایش سطح آهن کبدی میتواند باعث مقاومت به انسولین شود. افزایش سطح آهن در بافت کبد با میزان فیبروز کبد ارتباط مستقیم دارد.
10. میکروبهای روده ای: میکروبهای رودهای به عنوان منبع بالقوه برای آسیب اکسیداتیو کبد مطرح اند. رشد بیش از حد باکتریهای روده باعث تولید الکل و استالدئید اندوژن و اندوتوکسینها میشود که بعد از جذب از جدار روده وارد جریان خون سیستمیک شده و منجر به آسیب کبدی می گردند. در برخی مطالعات در مبتلایان به کبد چرب ،افزایش قابل توجه نفوذپذیری جدار روده و افزایش اندوتوکسمی پورت گزارش شده است. مکانیسم دیگر ایجاد کبد چرب به وسیله میکروبهای رودهای،دکونژوگه شدن اسیدهای صفراوی میباشد. تجویز پروبیوتیک و آنتی بیوتیکها در برخی مطالعات در بهبود چربی کبدی مؤثر بوده اند.
11. آپنه انسدادی خواب با مکانیسم هیپوکسمی می تواند منجر به کبد چرب شود.به دنبال تجمع چربی در سلول کبدی، فضاهای داخل سلولی به وسیله چربی اشغال شده و هسته و سایر ساختارهای مولکولی به سمت دیگر سلول کبدی هدایت می شوند. به تدریج که میزان ذخیره چربی در سلول کبد افزایش پیدا میکند،هسته و سایر اعضا سلول کبدی تحت فشار قرار گرفته واز انجام فعالیتهای حیاتی ساقط می شوند و به دنبال آن مرگ تدریجی سلول کبد اتفاق می افتد. این سلول کبد که فاقد حیات است توسط سلولهای دفاعی و ایمنی مانند سلولهای Tبه عنوان عنصر مزاحم و نامطلوب تشخیص داده میشود. تجمع سلولهای التهابی در کبد باعث ایجاد التهاب و آزاد شدن سیتوکاینهای التهابی میشود. سیتوکاینها باعث تبدیل سلول های ستاره ای (Stellate cell) خاموش به میلوفیبروبلاست میگردند. نتیجه این فرایند ساخت کلاژن توسط سلولهای میلوفیبروبلاست و تشکیل فیبروز میباشد. تداوم تدریجی این واکنش کلاژنی منجر به سیروز کبدی میگردد.

# **کلستاز**

کلستاز به معنی انسداد مجرای صفراوی و مهار جریان صفرا است که می تواند منشا داخل کبدی یا خارج کبدی داشته باشد. کلستاز داخل کبدی می تواند به دلیل بروز بیماری های اتوایمنیون، متابولیکی و ژنتیکی، همچنین ایجاد عفونت ها و استفاده از برخی داروها ایجاد گردد. کلستاز خارج کبدی نیز می تواند در نتیجه تشکیل سنگ های مجاری صفراوی، و بروز سرطان های صفراوی و پانکراسی ایجاد می شود کلستاز چه به صورت داخل کبدی و چه به صورت خارج کبدی ایجاد شود، از انتقال صفرا به دوازدهه جلوگیری می کند و سبب تجمع صفرا در کبد و مجاری صفراوی می گرددArrese & Trauner, 2003)).

کلستاز بیماری است که توسط کاهش یا توقف جریان صفراوی از کبد مشخص می شود. این بیماری می تواند ناشی از اختلالات کبد، مجرای صفراوی یا پانکراس باشد. بیش از ۲۰۰،۰۰۰ نفر در ایالات متحده هر ساله تحت تاثیر این شرایط قرار می گیرند و اگر به درستی درمان نشود، می تواند سلامت بدن را به خطر بیاندازد.

کلستاز بیماری است که در آن در جریان صفرا به دلیل آسیب دیدگی برخی از سلول های کبدی و روده کوچک، اختلال ایجاد می شود. صفرا مایع گوارشی است که توسط کبد تولید می شود. هنگامی که جریان صفرا متوقف می شود، رنگدانه بیلی روبین، محصول زائدی که در اثر تجزیه سلول های قرمز خون قدیمی یا آسیب دیده ایجاد می شود، به جریان خون راه پیدا کرده و در آن جا تجمع می یابند.

به طور معمول، بیلی روبین به صفرا در کبد متصل می شود و از طریق مجرای صفراوی به سمت دستگاه گوارش، جایی که در مدفوع دفع می شود، حرکت می کند. اما برای افراد مبتلا به کلستاز، ماده ای که معمولا باید با صفرا دفع شود در بدن باقی می ماند.

**علل:**

دو علت اصلی برای کلستازی وجود دارد. کلستازی انسدادی، که به انسداد مکانیکی در مجرای صفراوی ناشی از سنگ های صفراوی و تومورهای بدخیم رخ می دهد، اشاره دارد. کلستازی متابولیسم، اختلالی که در تشکیل صفرا وجود دارد و به علت نقایص ژنتیکی اتفاق می افتد. گاهی نیز این اختلال ناشی از اثر جانبی بسیاری از داروها است. برخی از علل دیگر این بیماری عبارتند از:

* بارداری
* مصرف قرص های ضد بارداری
* فیبروز کیستیک (یک بیماری ارثی است که عملکرد سلول های اپیتلیال را مختل می کند)
* تنگ شدن مجرای صفراوی
* بیماری کبدی الکلی
* لنفوم (یک نوع سرطان است که بر روی سیستم ایمنی تأثیر می گذارد)
* سیروز اولیه صفراوی (بیماری است که در آن مجاری صفراوی در کبد به آرامی تخریب می شوند)
* هپاتیت ویروسی
* داروهایی مانند:
* آنتی بیوتیک ها (مانند آمپی سیلین و سایر پنی سیلین ها)
* فلوکوکاسیلین
* اریترومایسین
* استروئیدهای آنابولیک
* نیتروفورانتوئین
* نمک طلایی
* استاتین ها
* استروژن
* سایمتیدین
* کلرپرومازین
* پروکلوپرازین
* دراوها نیز عامل مهمی برای کلستازی هستند. آسیب کلیستاتیک یکی از عوارض شدید بیماری کبدی ناشی از دارو است و تقریبا نیمی از مسمومیت های کبدی را تشکیل می دهد. شواهدی وجود دارد که نشان می دهد داروهایی که توسط کبد به صفرا دفع می شوند، نامزد اصلی برای تولید بیماری کلستاز کبدی در بیماران حساس هستند، و تشخیص سریع و حذف دارو، هدف اصلی مدیریت کلستاز ناشی از دارو است.

**علائم و نشانه های کلستازی**

شایعترین علامت کلستاز، خارش است که به نظر می رسد به علت تعامل اسید های صفراوی با اعصاب opioidergic ایجاد می شود. با توجه به گزارش منتشر شده در Gastroenterology and Hepatology، برخی مطالعات نشان می دهند که در حدود ۷۰ درصد از بیماران مبتلا به کلستاز کبدی خارش را تجربه می کنند. اگر چه مطالعات اخیر آمار کمتری را درحدود ۲۰ تا ۳۰ درصد نشان می دهد. خارش در بیماران مبتلا به سیروز اولیه صفراوی، کلانژیت اسکلروزان اولیه (زخم در مجرای صفراوی) و کلستاز حاملگی شایع تر است، اما در بیماران مبتلا به هپاتیت ویروسی مزمن، به ویژه ویروس هپاتیت C نیز شایع است.

زردی نشانه رایج دیگری در کلستازی انسدادی است، اما در کلستازی متابولیک رایج نیست. یک فرد مبتلا به کلستاز انسدادی همچنین ممکن است مدفوع کمرنگ داشته باشد و همراه با آن علائمی مانند موارد زیر را تجربه کند:

ادرار تیره

تهوع یا استفراغ

عدم توانایی هضم غذاهای خاص

درد در قسمت فوقانی و راست شکم

زردی پوست و چشم

کلستازی می تواند به هضم نادرست لیپیدها و جذب ویتامین محلول در چربی منجر شود. بازتولید و گسترش باکتری ها به غدد لنفاوی، که ممکن است به اندوتوکسمی منجر شود نیز موجب شوک می شود.

**درمان کلستاز:**

**درمان های متعارف برای کلستاز**

اسید اورسودوکسی کولیک (UCDA) به طور فزاینده ای برای درمان کلستاز استفاده می شود. UCDA برای درمان سنگ های صفراوی بدون جراحی در زنان مبتلا به کلستازی بارداری کاربرد دارد. این دارو یک ترکیب اسید روغنی طبیعی است که عملکرد کبد را با جایگزینی اسیدهای صفراوی سمی در جریان خون بهبود می بخشد. UCDA با اصلاح مخزن اسید های صفراوی و کاهش اسیدهای آندوژنیک و هیدروفوبیک (اسیدهایی که با آب مخلوط نمی شوند) و افزایش نسبت اسید های صفراوی هیدروفیل غیر سمی (اسید های صفراوی که در آب مخلوط و حل می شوند) در بدن عمل می کند.

**اجتناب از مصرف الکل و داروهای خاص**

به افراد مبتلا به کلستاز توصیه می شود از مصرف مواد شیمیایی، از جمله الکل و داروهای خاص، اجتناب نمایند. بر اساس تحقیقات انجام شده در دانشگاه سیدنی استرالیا، عوامل متعددی که ظرف سال ها باعث ایجاد کلستاز می شوند، عبارتند از:

استروژن ها

استروئیدهای آنابولیک

کلرپرومازین

اریترومایسین

اکسین پنی سیلین

داروهای مرتبط با آسیب کبدی کلستاز عبارتند از:

تیکلوپیدین

ترفنادین

تربینافین

نیمسولید

فلوروکینولون ها

**استاتین های کاهش دهنده کلسترول**

در حالیکه شواهدی در مورد اثرات ژنتیکی واکنش های کلستاتیک به دارو وجود دارد، اما در حال حاضر هیچ تستی برای پیش بینی این رویداد وجود ندارد. بنابراین پیشگیری از واکنش های شدید، تشخیص زودهنگام آسیب های کبدی و قطع سریع دارو معمولا توصیه می شود.

# **آناتومی کیسه صفرا و مجاری صفراوی**

**انسداد مجرای صفراوی:**

مدل انسداد مجرای صفراوی (Bile Duct Ligation/ BDL) یک مدل تجربی مناسب برای القاء انسداد صفراوی خارج کبدی و بررسی اختلالات ناشی از آن می باشد که بطور وسیعی در تحقیقات تجربی کلستاز مورد استفاده قرار می گیرد Arrese & Trauner, 2003) ). کلستاز سبب افزایش اکسیدان های کبدی می گردد (Portincasa et al., 2007) و استرس اکسیداتیو در این بیماری، یک پدیده سیستمیک است (Ljubuncic et al., 2000) که تمام بافت ها و اندام ها، خصوصا کبد را درگیر می کند.

ترکیبات صفرا شامل نمک های صفراوی، مولکول های غیر آلی (مانند آنیون ها و بی کربنات)، ترکیبات آلی مانند فسفولیپیدها، کلسترول، بیلی روبین، لسیتین و نوکلئوتیدهای آدنوزین (Chari *et al.,* 1996) و پروتئین هایی مانند آلبومین و ایمنوگلوبولین ها (Farina *et al.,* 2008) می باشد. یکی از عملکردهای اصلی کبد برای حفظ هومئوستاز متابولیکی، سنتز، ترشح و بازیافت نمک های صفراوی است. هپاتوسیت های کبدی روزانه حدود 6 گرم نمک صفراوی را از کلسترول سنتز می کنند. این نمک ها بیش از نیمی از ترکیبات آلی صفرای پستانداران را تشکیل میدهند، که بطور مداوم در بدن تحت یک گردش روده ای-کبدی کارآمد بازجذب می شوند.

نمک های صفراوی اولیه در هپاتوسیت ها از کلسترول سنتز می شوند و مولکول هایی دوقطبی و بسیار آبدوست تر از کلسترول هستند که به راحتی به فرم میسل (Monte *et al.,* 2009) در می آیند. این ویژگی تحت شرایط کلستاز، آنها را برای آسیب رساندن به غشاء سلولی مستعد می سازد. صفرا مسیر دفعی اولیه برای موادی مانند بیلی روبین، کلسترول و برخی محصولات دفعی مانند گزنوبیوتیک ها و مولکول های چربی دوست و برخی کاتیون های فلزی است. با کاهش جریان صفرا در شرایط کلستاز، مقدار این ترکیبات در بدن افزایش می یابد.

کیسه صفرا در زیر لوب چهارم کبد و چسبیده به آن در طرف راست و بالاي شکم قرار گرفته است. طول آن در 8 سانتیمتر و حاوي 80 تا 100 سانتیمتر مکعب صفرا است. یک لوله باریک به نام مجراي سیستیک، - حدود 7 کیسه صفرا را به مجراي اصلی کبد وصل می کند. صفرا که در کبد ساخته شده و در هضم غذا نقش مهمی به عهده دارد توسط مجراي اصلی صفرا یا کلدوك، وارد قسمت اول روده باریک می شود. کیسه صفرا یک مخزن ذخیره براي صفرا نیست. صفرا مرتباً در کبد ساخته می شود. پس از خوردن غذا، کیسه صفرا منقبض شده و صفرا را در داخل روده تخلیه می کند. این انقباض در اثر تحریک هورمونی توسط هورمون کله سیستوکینین است.

ترکیب اصلی صفرا را کلسترول، بیلی روبین و نمک هاي صفراوي تشکیل می دهند. بیلی روبین از آزاد شدن هموگلوبین در گلبول هاي قرمز منهدم شده بدست می آید. این ماده پس از انتقال به کبد از طریق صفرا دفع می شود. نمک هاي صفراوي که به وسیله سلول هاي کبدي از کلسترول ساخته می شوند براي هضم و جذب چربی ها، ویتامین هاي محلول در چربی و بعضی از مواد معدنی ضروري می باشند. صفرا وارد مجاري صفراوي شده و در نهایت از طریق مجراي مشترك صفرا و پانکراس وارد دوازدهه می شود. در طی عمل هضم با رسیدن غذا به دوازدهه)قسمت فوقانی روده باریک(، با تحریک هورمونی، صفرا وارد دوازدهه می شود.

صفرا حاوي کلسترول و مواد دیگر است، در صورتی که غلظت کلسترول در صفرا بالا برود و یا غلظت بعضی مواد دیگر در صفرا پایین بیاید، کلسترول ممکن است به صورت بلورهاي جامد در آید و هسته اولیه یک سنگ صفراوي را تشکیل دهد. این هسته می تواند به تدریج در طول زمان بزرگ شود و به سنگ هاي درشتی تبدیل گردد ولی اغلب سنگ هاي صفراوي کوچکتر هستند(غالباً اندازه ارزن) که با این حال اشکالات بیشتري نیز حتی ایجاد می کنند. افراد بسیاري دچار سنگ کیسه صفرا می شوند. تا مدت ها این سنگ ها مزاحمت هایی ایجاد می کنند و علایمی دارند که بیماران با ناراحتی هاي معده و روده اشتباه می کنند و نه تنها به درمان نمی پردازند،بلکه دارو و درمان هاي بی مورد نیز دریافت می کنند. در حالی که بیمار بی خبر است و یا تصور می کند که نیازي به درمان جراحی وجود ندارد، یکی از سنگ هاي موجود در کیسه صفرا ممکن است در حین انقباضات عادي آن به دهانه کیسه رانده شود و در مجراي کیسه گیر کند، این حالت سبب می شود کیسه صفرا براي تخلیه خود انقباضات شدیدتري پیدا کند که معمولاً بسیار دردناك است. این درد معمولاً در ناحیه بالا و راست شکم و بالاي ناف احساس می شود و گاهی به پشت و یا شانه راست نیز سرایت می کند. در مواردي که درد شدید است ممکن است با تهوع و استفراغ همراه باشد. اگر انقباضات کیسه صفرا آرام شود سنگ ممکن است مجدداً به داخل آن افتاده و درد کاملاً از بین برود .چنین حملاتی معمولاً 20 دقیقه تا یک ساعت طول کشیده و قولنج صفراوي نامیده می شود.

این بیماري سالانه میلیون ها نفر را مبتلا می کند. در بیشتر موارد سنگ کیسه صفرا بدون علایم ظاهري است اما وقتی سنگ از کیسه صفرا خارج و وارد مجراي صفراوي شود، ایجاد انسداد، درد و قولنج می نماید. در صورت انسداد مجراي کیسه صفرا، التهاب کیسه صفرا به وجود می آید. همچنین در صورت انسداد مجراي اصلی صفراوي، رنگ مدفوع روشن و ادرار پر رنگ می شود و در صورت ادامه وضعیت، صفرا به عقب برگشته و موجب زردي و صدمه رسیدن به کبد می شود.بیشتر سنگ ها از کلسترول، بیلی روبین و نمک هاي صفراوي تشکیل شده اند.سنگ هاي کیسه صفرا وقتی تشکیل می شوند که مایع ذخیره شده در کیسه صفرا تبدیل به شکل قطعاتی از مواد جامد )شبیه سنگ سخت شده( می گردد. در حالت طبیعی این مایع که صفرا نامیده می شود براي کمک به بدن جهت هضم چربی ها استفاده می شود.

# **2-4 بیماري هاي کیسه صفرا**

اختلالات سیستم صفراوي هر ساله میلیون ها نفر را مبتلا می کند. تنها در ایالات متحده آمریکا سالانه 6 بیلیون دلار صرف درمان سنگ هاي صفراوي می شود. بیماري هاي شایع مجاري صفراوي عبارتند از سنگ کیسه صفرا، سنگ مجراي اصلی صفراوي یا کلدوك، التهاب کیسه صفرا (کله سیستیت) و سایر بیماري ها.

**کوله سیستیت حاد**

عبارت است از التهاب حاد کیسه صفرا که در 90 درصد موارد علت آن سنگ صفرا است. موارد کله سیستیت حاد بدون سنگ (آکالکالوس) بیشتر در بیماران با وضعیت وخیم ناشی از تروماي شدید، سوختگی، سپسیس، زایمان و غیره دیده می شود. کله سیستیت حاد معمولاً با انسداد دهانه کیسه صفرا و در نتیجه اتساع آن، تغییرات ایسکمیک و شیمیایی در جدار کیسه صفرا و در بعضی بیماران همراه با رشد باکتري در صفرا یا جدار آن ایجاد می شود.

**کوله سیستیت مزمن**

التهاب مزمن مخاط کیسه صفرا به علت سنگ یا عوامل دیگر بروز می کند و ضمن تغییرات مخاطی، افزایش ضخامت جدار کیسه صفرا نیز عارض می شود. علل غیر سنگ شامل آدنومیوماتوز، پولیپ، کلسترولوزیس کیسه صفرا و عملکرد نادرست)دیس فانکشن(کیسه صفرا می باشند.

**سیستم مجاری صفراوی**

مجاری صفراوی خارج کبدی از ابتدای مجاری کبدی شروع شده و در آمپول واتر ختم می­شوند.مجاری کبدی راست یک سانتی متر طول دارد و به هم پیوستن دوشاخه خلفی تحتانی و بطنی راسی بوجود می­آید.در داخل کبد شاخه بطنی راسی با زاویه حاده وارد مجرای کبدی راست می­شود بدین جهت سنگ در این شاخه شایع نیست مجرای کبدی چپ مختصری درازتر از راست در موارد انسداد بیشتر دچار انساع می­شود دو مجرا به هم پیوسته و مجرای مشترک کبدی را تشکیل می­دهند.مجرای مشترک کبدی از ناف کبد شروع می­شود و در طول آن 3 الی 4 سانتی­متر است.مجرای سیستیک با یک زاویه حاده به انتهای مجرای مشترک کبدی متصل می­شود و از این نقطه به بعد مجرای مشترک صفراوی (کلدوک)را تشکیل می­شود.

طول مجرای مشترک صفراوی (CBD) تقریبا 8-11 سانتی متر و قطر آن 6-10 میلی متر میباشد بخش فوقانی این مجرا در کناره آزاد چادرینه کوچک در طرف راست شریان کبدی قرار دارد و در پشت این مجرا ورید پورت قرار دارد یک سوم میانی CBD به طرف راست خم شده و در پشت اولین قسمت دئودنوم قرار می­گیرد. در این قسمت از ورید پورت و شریان کبدی جدا می­شود قسمت سوم CBD بیشتر خم شده و در پشت سر پانکراس در شیاری قرار می­گیرد وارد دئودنوم می­شود محل ورود CBDبه دئودنوم در امپول واتر بوده و غالبا با مجرای پانکراس یکی می­شود قسمت­های مختلف مجرا برحسب ارتباط آنها با احشاء به نام­های فوق پانکراسی،داخل پانکراسی و داخل اثنی عشری خوانده می­شود.

# **2-5 سیاه دانه**

گياه سياه دانه با نام علمي*Nigella sativa*  گياهي گل‌دهنده و یک‌ ساله با گلهاي سفيد يا آبي كم رنـگ (Ramadan & Morsel, 2002)، جزء رده دولپه­ای ها،زیر رده جداگلبرگ­ها،راسته آلاله ها،تیره آلاله و تبار خربق است.این تبار از مهمترین تقسیمات تیره آلاله هاست.

این گياه حدکثر به میزان 60 سانتی متر رشد می­کند و دارای گل­های آبی و سفید با 5-10 گلبرگ و برگ­های منقسم است،میوه بزرگ و داری کپسول متورم است که از 3-7 فولیکول (برگه)تشکیل شده که هر یک حاوی دانه­های بسیاری است.

سیاه دانه گیاهی است علفی با ساقه افراشته منشعب با یا بدون کرک یا حاوی کرک­های چسبناک،به ارتفاع 15 تا 30 سانتی متر،یک ساله با برگ­هایی به طول 2 تا3 سانتی متر به صورت 2تا3 عدد در اطراف دمبرگ که به تقسیمات باریک و نخی شکل تقسیم شده است. گل­های آن منفرد ،به رنگ سفید شیری با کناره مایل به سبز یا آبی قطعات گلپوش تخم مرغی ،اندکی ناخنکدار و متمایل به سفید است.دارای کاسبرگ­های دراز،بیضی کشیده و دوکی شکل به طول 1 تا 1.5 سانتی متر که اغلب رنگی و بلندتر از جام است و به تدریج در قاعده و انتهایش باریک می­شود.گلبرگ­هایش پایک دارد و گل­ها فاقد برگ­های گریبانی است.

بـومي اروپـاي جنـوبي، آفريقـاي شمالي و آسيا است و دانه های آن كه به سياه دانـه معـروف است توسط مصري هاي باستان و پزشكان يوناني بـراي درمـان سردرد، احتقان بيني، آسم، آلرژي، تقويت سيـستم ايمنـي، درددندان و كرمهاي رودهاي و بـه عنـوان ديورتيـك، بـراي القـاءقاعدگي و افزايش توليد شير مورد استفاده قرار ميگرفته اسـت (Salehi Surmaghi et al., 2008). اثـرات ضداكسايـشي سياه­دانه در برابر مسموميت كبدي القـاء شـده توسـط هيدروپراكسيدتترابوتيل، تتراكلريدكربن و سيسپلاتين گـزارش شده است. تجويز روغن سياه دانه بـه مـدت 30 روز به موش هاي صحرايي تیمار شده با آفلاتوكسين، اثر مهاري بر عوارض خوني و بيوشـيميايي آفلاتوكـسين بر كبد داشت (Abdel-Wahhab & Aly, 2005). مصرف روغن سياه دانه باعث كـاهش اثـرات سوء عفونـت شيستوزومایی بـر عملكـرد كبـد شده و از بروز سيروز كبدي و تغيير در سطح آنزيم هاي كبـدي ناشـي از ايـن عفونت جلوگيري ميكند (El-Abhar & Saleh et al,2002). مصرف روغن سياه دانـه درمـسموميت حـاد كبـدي ناشـي از سـرب باعـث پيـشگيري از اختلالات پاتولوژيك كبدي شده و از اثر سمي سرب بر مخاط روده پيشگيري ميكند (Kapoor et al, 2009). همچنين تحقیقات نشان می دهد که روغن سـياه دانـه باعـث بهبود فاکتورهای بيوشـيميايي خـون و بهبود پـاتولوژي كبـد درموشهاي مسموم شده با سرب می شود (Farrag et al, 2007).

گزارش تحقيقات متعدد حاكي از آن است كه روغن و تركيبات موجود در دانه گياه سياه دانه داراي اثرات فارماكولوژيك متعددي هستند. اين تركيبات به درمان فرآيندهاي التهابي و بيماري هاي حساسيتي كمك ميكنند واز اثراتداروهاي هپاتوتوكسيك و نفروتوكسيك پيشگيري ميكنند. سیاه دانه سمیت بسیار کمی دارد و تغییری در آنزیم های کبدی و در بافت شناسی اندام هایی مانند کلیه،کبد،قلب و پانکراس در رتهای تیمار شده با سیاه دانه مشاهده نشده است. ازاين گياه به طور گسترده به دلیل اثرات آنتي بيوتيكي، در درمان اختلالات گوارشي و كبدي، درمان انگل هاي گوارشي، تحريك متابوليسم و درمان افسردگي استفاده می شود (Salem & Hossein 2005).

# **2-6 تركيبات سـياه دانـه**

چهـار نـوع آلكالوييـد بـا نـام هـاي تیموكویینـــون، دي تيموكویینون، تیموهيدروكویینون و تيمول مواد موثره اصـلي در عـصاره آبـي دانه این گياه هستند **(**Morikawa *et al.*, 2004**). 30 درصد وزن سـياه دانـه را روغـن تشكيل مي دهد كه** P-cymen **اصلي تـرين تركيـب آن اسـت وًتقريبا 48/61 درصد از وزن روغن فرار آن را تـشكيل مـي دهـد (**Geng *et al.,* 2009**). دانه گياه همچنین حاوي چربي، ويتامين ها، مـواد معـدني وپروتئين (شامل هشت اسيد آمينه ضروري) وكربوهيـدرات هـاشامل مونوساكاريدها به شكل گلوكز، زيلوز، آرابينوز و رامنـوز است. دانه گياه منبع غني اسيدهاي چرب ضروري و غيراشباع است. اصلي ترين اسيد چرب غيراشباع اسيدلينولئيك و سپس اسيداوليئك است. تركيبات ديگري مانندفسفوليپيدها، كاروتن، كلسيم، آهـن و پتاسـيم نيـز در دانـه گیاه وجود دارد** (Ramadan & Morsel, 2002).

# **2-7 تیموکوئینون**

تیموکوئینون[[2]](#footnote-2) (TQ) 2- ایزوپروپیل-5- متیل – 1و4 ینزوکوئینون، با فرمول مولکولی C10H12O2  و وزن مولکولی 2/164، مهمترين مادة موثرة موجود در دانه های گیاه سياه دانه بوده و داراي اثرات فارماكولوژيكي متعددي است كه از آن جمله مي توان به اثرات آرامبخشي (Parvardeh & Hosseinzadeh, 2003)، ضد ايسكمي (Parvardeh, Nasiriasl, & Hosseinzadeh, 2004)، ضد تشنجي (Hosseinzadeh *et al.,* 2005)، آنتی اکسیدانی (Burits & Bucar, 2000) ، ضدالتهابی (Houghton *et al.,* 1995) ، ضدسرطانی (Worthen *et al.,* 1998) ، ضد دردي (Abdel-Fattah & Matsumoto, 2000) ، حفاظت كبدي، محافظت كليوي (Badary *et al,* 1997) اشاره كرد.

تیموکوئینون می تواند میزان آسیب وارد شده بر بافت کبد را خنثی کند. بر اساس تحقیقات تیمار خوراکی TQ (100 میلیگرم بر کیلوگرم) موجب محافظت قابل ملاحظه ای در برابر مسمومیت با تتراکلرید کربن شد. TQ سبب مهار پراکسیداسیون لیپید در کبد می شود و این امر نشان می دهد که فعالیت محافظتی TQ در برابر آسیب ناشی از تتراکلرید کربن می تواند از طریق خواص آنتی اکسیدانی آن ایجاد شود. همچنین تیمار خوراکی TQ به طور معنی داری سمیت کبدی ناشی از استامینوفن، کادمیوم  
 (Zafeer *et al.,* 2012) و همچنین سمیت کبدی ناشی از تاموکسیفن (Suddek et al, 2014) را کاهش می دهد. درمان با TQ همچنین از ایجاد نکروز کبدی ناشی ازمصرف سایپرمترین در موش ها، جلوگیری می نماید. و منجر به ایجاد تکثیر سلولی و ایجاد ترمیم و بازسازی کبد پس از ایجاد آسیب می شود  
 (Ince *et al.,* 2012).

مکانیسم عمل TQ بسیار پیچیده است. به نظر می رسد که TQ برای مقابله با بسیاری از بیماری های پاتوفیزیولوژیکی، بر روی مسیرهای چرخه سلولی، تکثیر، آپوپتوز، آنژیوژنز، مهاجرت، و متاستاز تومور (در مدل های سرطانی) تاثیر دارد. علاوه بر این، آسیب های اکسیداتیو و پاسخ های التهابی را مهار می کند (Blunden et al, 2003). مطالعات زیادی به منظور ارزیابی خواص سمی TQ در شرایط *in vitro* و  *in vivo*انجام شده است و تنها تعداد محدودی از گزارشات در مورد اثرات بالقوه سمی TQ وجود دارد. امروزه تحقیقات گسترده ای در زمینه استفاده از محصولات گیاهی و ترکیبات فیتوشیمیایی به عنوان داروهای جایگزین انجام می شود و گیاهان دارویی با توجه به عوامل متعددی چون هزینه ارزان، دسترسی آسان، ایمنی و کارایی، بسیار مورد توجه قرار گرفته اند (Abuharfeil *et al.,* 2001).

تیموکوئینون که از دانه های گیاه سیاهدانه استخراج می شود، برای قرن ها برای درمان مشکلات فراوانی مورد استفاده قرار گرفته است. در سال های اخیر TQ به عنوان یک ماده فیتوشیمیایی، به دلیل فعالیت بیولوژیکی زیاد و سمیت سیستمیک کم، توجه زیادی را به خود اختصاص داده است و می تواند جایگزین مناسبی برای داروهای متداول درمانی باشد. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثرات تیموکوئینون بر میزانTransforming Growth Factor-B در فیبروز کبد کلستاتیک القاء شده با مدل انسداد مجرای صفراوی در موش های صحرایی می باشد.



**شکل 2-1 : تیموکوئینون در بیماری‌های التهاب و سرطان مناطق مختلفی را هدف‌گیری می‌کند.**

Blunden et al, 2003))



**شکل 2-2: مورفولوژی سیاه دانه(**Abuharfeil *et al.,* 2001**)**

(

**شکل 2-3: قسمت‌های مختلف گیاه سیاه دانه (**Abuharfeil *et al.,* 2001**)**

# **2-8 اثر سیاه دانه بر عملکرد پانکراس**

در مطالعه ای که از دوز 2 میلی لیتر بر کیلوگرم از عصاره 5% سیاهدانه یا 0.2 میلی لیتر بر کیلوگرم از روغن سیاه دانه یا 3 میلی گرم بر میلی لیتر تیموکینون به صورت داخل صفاقی به موت 6 هفته استفاده شد، نتایج نشان داد که در موش­های دیابتی درمان نشده سطح گلوکز سرم افزایش و سطح انسولین سرم کاهش می­یابد.سطح مالون دی آلدئید(MDA) در سلول­های بتا جزایر لانگرهانس در موش­های دیابتی درمان نشده افزایش و فعالیت سوپراکسید دسموتاز (SOD) کاهش یافته است.عصاره سیاهدانه و تیموکینون هیپرگلیسمی ایجادشده در موش­های دیابتی را کاهش می­دهد که ارتباط مستقل با انسولین ندارد و بخشی از آن از طریق مهار گلوکوژنز انجام می­شود. همچنین سیاهدانه و تیموکینون سطح MDA را در سلول­های بتا جزایر لانگرهانس موش­های دیابتی کاهش و فعالیت SOD را افزایش می­دهد ( Abdelmeguid et al,2010).

# **2-9 اثر سیاهدانه بر عملکرد کبد**

تاثیر محافظتی سیاهدانه بر پراکسیداسیون چربی و سیستم آنزیمی آنتی اکسیدانی و آنزیم\_های کبدی در موش­های صحرایی که توسط تتراکلریدکربن دچار سمیت کبدی شده بودند بررسی شد. در این مطالعه تتراکلرید کربن 8/0 میلی لیتر بر کیلوگرم به صورت زیرجلدی به مدت 60 روز دوبار در هفته استفاده شد.برای درمان روزانه 2/0 میلی گرم بر کیلوگرم روغن فرار سیاهدانه به صورت داخل صفاقی استفاده شد. نتایج این بررسی نشان میدهد که تجویز تتراکلرید کربن سطح پراکسداسیون چربی و آنزیم­های آنتی اکسیدانی را کاهش می­دهد.در گروه درمان شده با سیاهدانه مشاهده شد که سطح پراکسیداسیون چربی و آنزیم­های کبدی کاهش و سطح آنزیم­های آنتی اکسیدانی افزایش می یابد ( Kanter et al ,2005).

همچنین تجویز 300 میلی گرم برکیلوگرم عصاره آبی –الکلی تخم سیاه دانه در موش­های صحرایی دیابتی به مدت 30 روز می تواند سطح پراکسیدهای چربی را در بافت کبد موش های دیابتی کاهش داد و فعالیت آنزیم­های انتی اکسیدان را بهبود بخشید ولی فعالیت آنزیم ها به وضعیت طبیعی نرسید.  
( Kaleem *et al,.*2006). استفاده از دوزهای 20-50-100 میلی گرم بر کلیلوگرم تیموکینون در موش­های صحرایی هیپرکلسترومیک باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و بیان ژن­های انتی اکسیدان در کبد می­شود ( Ismail et al,2010).

# **2-10 پیشینه پژوهش**

پژوهشگران نشان دادند كـه عـصاره روغن سياه دانه كليه را در برابر آسيب راديكال هـاي آزاد اكــسيژن محافظــت مــي كنــد و باعــث كــاهش پراكسيداسيون ليپيدي مـي شـود و همچنـين مغـز ونخاع را در برابر استرس اكسيداتيو ايجـــاد شــده توسط آنسفالوميليت تجربي محافظت مي كند. سياه دانه مي تواند در غير فعال كردن سلول هاي سرطان سينه موثر بـوده و راديكـال هـاي آزاد توليـد شـده توسط تشعـشعات را خنثـي نمايـد (Yildiz *et al.,* 2008). در بررسی اثرات سیاه دانه بر دیابت القاء شده با استرپتوزوتوسين دریافتند که سياه دانه با اثرات آنتی اکسیدانی خودسبب محافظت سـلول های بتـا در برابر استرس اكسيداتيو و بهبود دیابت می شود (Kanter et al., 2004). محققان بیان کردند که سیاه دانه اثرضد التهابی خود را از طریق کاهش سطح آنزیم لیپواکسیژناز اعمال کرده و التهاب را مهار می کند (El-Dakhakhni et al, 2002). همچنین پژوهش‌گران نشان دادند سیاه دانه می تواند موجب افزایش سطح هورمون هاي FSH، LH و تستوسترون در حیوانات آزمایشگاهی شود؛ بنابراین احتمالاً روغن سیاه دانه از طریق حفظ سطح هورمونهاي جنسی و کاهش استرس اکسیداتیو اثر حفاظتی خود را بر اسپرماتوژنز و بافت بیضه اعمال می­نماید و می­توان روغن سیاه دانه را به عنوان یک آنتی اکسیدان به منظور بهبود اثرات مخرب ایجادشده توسط پارانونایل فنل استفاده کرد ( Yan *et al.,* 2013). اختلال در تعادل اکسیدان-آنتی اکسیدان مسئول آسیب کبدی کولستاتیک و تضعیف عملکرد کلیوی در رت های BDL می باشد ( Orellana et al., 2000).

از میان ترکیبات مختلف موجود در گیاه سیاهدانه، مهمترین ترکیب موجود در روغن سیاهدانه تیموکوئینون (27/8%- 57%) است. تیموکوئینون اثر محافظتی بر روی سمیت کلیوی ناشی از سیس پلاتین در موش های کوچک و رت ها نشان داده است. مشخص شده که TQ همچنین اثرات ضدتوموری سیس پلاتین را تقویت می کند (Badary *et al.,* 1997). تیموکوئینون از طریق اثرات قوی آنتی اکسیدانی و ضد التهابی خود سبب بهبود زایعات کبدی ناشی از آسیب ایسکمی-ریپرفیزیون کبدی گردید. در این مطالعه تقریبا هیچ عارضه جانبی ناشی از مصرف TQ گزارش نشده است. و نتایج مطالعه بیانگر این است که TQ میتواند به عنوان یک داروی جدید قوی برای کاهش آسیب کبدی مورداستفاده قرارگیرد (Tekbas *et al.,* 2018).

**در اینجا به مرور مقالاتی که در زمینه بررسی اثرات تیموکوئینون بر روی کلستاز انجام شده است می پردازیم:**

Oguz و همکاران در سال 2011 طی بررسی اثر محافظتی TQ در برابر آسيب كبدي ناشی از انسداد مجرایي صفراوي در موش صحرايي نشان دادند که تیمار خوراکی TQسبب حفظ ظرفیت آنتی اکسیدانی و کاهش آسیب اکسیداتیو کبد می گردد.

Coban و همکاران (2010) در مطالعه ای تحت عنوان بررسی اثرات سیاهدانه بر آسیب ناشی از انسداد مجرای صفراوی در موش صحرایی نشان دادند که سیاهدانه اثرات درمانی خود بر آسیب کبد کلستاتیک را احتمالا از طریق کاهش نفوذ سلول های التهابی و نوتروفیل ها اعمال می کند و از این طریق استرس اکسیداتیو در بافت کبد را کاهش می دهد.

در تحقیقی که توسط Kong و همکاران در سال 2015 انجام شد، اثرات محافظتی TQ با دوزهای 25 و 50 میلی گرم بر کیلوگرم، و به مدت 2 هفته بر روی آسیب کبدی ناشی از کلستاز در رت ها بررسی شد. بر اساس نتایج این مطالعه TQ ظرفیت آنتی اکسیدانی کبد را افزایش و میزان آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو در کبد را کاهش داد. نتیج این مطالعه پیشنهاد کرد که TQ می تواند به عنوان یک محافظت کننده کبدی در بیماران مبتلا به کلستاز مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج تحقیقی که توسط Mohamed El-Naa و همکاران در سال 2014 اثرات محافظتی TQ را بر علیه کلستاز داخل کبدی القاء شده با اتینیل استرادیول و کلرپرومازین در رت ها بررسی کردند. در این تحقیق TQ به صورت خوراکی به میزان mg/kg 100 و به مدت 5 روز و همزمان با دارو تیمار شد. نتایج تحقیق آنها نشان داد که TQ اثرات محافظتی خود را از طریق بهبود استرس اکسیداتیو در بافت کبد اعمال می کند.

تحقیق اصغرزاده و همکاران در سال 2017 بر روی اثر TQ بر روی فیبروز کبدی القاء شده با لیپوپلی ساکارید (LPS) انجام شد. در این تحقیق تیمار همزمان TQ (با دوزهای 2، 5 و 10 میلی گرم بر کیلوگرم) با LPS به مدت 3 هفته، التهاب، فیبروز و و تست های عملکردی کبد را بهبود بخشید که احتمالا ناشی از بهبود سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و کاهش آسیب اکسیداتیو بود.

در تحقیقی که توسط Saricicek و همکاران در سال 2014 انجام شد، تیمار TQ به میزان 50 میلی گرم بر کیلوگرم سبب بهبود فیبروز تجربی القاء شده با دی متیل نیتروزآمین در رت ها گردید. که این عمل را از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و حذف رادیکال های آزاد و بهبود فعالیت آنتی اکسیدانی انجام داد.

در مطالعه ای که توسط Bai و همکاران (2013) انجام شد، تیمار با TQ خوراکی با مقادیر (20 یا 40 میلی گرم بر کیلوگرم) به مدت 5 هفته سبب بهبود فیبروز کبدی القاء شده با تیواستامید گردید. تیمار با TQ سبب کاهش نفوذ سلول های التهابی، و کاهش تجمع پروتئین های ماتریکس خارج سلولی گردید. TQ بطور معنی داری سبب کاهش بیان SMA آلفا ، کلاژن 1 و مهرکننده بافتی متالوپروتئیناز 1 (TIMP-1) گردید. TQ سبب کاهش ماتریکس خارج سلولی گردید که احتمالا از طریق فسفریلاسیون مسیر سیگنالینگ AMPK انجام شده است. نتایج این تحقیق پیشنهاد داد که TQ می تواند یک کاندید قوی برای درمان فیبروز کبدی باشد.

در تحقیق که توسط Gozeneli و همکاران در سال 2018 انجام شد، اثرات TQ و کورکومین در بازسازی کبد در رت هایی که 70% هپاتکتومی شده بودند مقایسه شد. در این مطالعه 7 روز قبل از برداشت کبد رت ها با TQ (دوز 100 میلی گرم بر کیلوگرم) یا کورکومین تیمار شدند. نتایج بیوشیمیایی و بافتی این مطالعه نشان داد که TQ در بازسازی کبد حتی مفیدتر از کورکومین بود.

نتایج تحقیقی که در سال 2008 به منظور تعیین میزان LD50 تیموکوئینون صورت گرفت، نشان داد که میزان LD50 تیموکوئینون در رت ها به صورت خوراکی (گاواژ) mg/kg/bw 3/794 و میزان LD50 برای تزریق درون صفاقی (i.p.) برای رت ها به میزان mg/kg 5/57 گزارش شد.

# **فصل سوم**

# **مواد و روش ها**

# **3-1 روش کار: جامعه آماري، روش نمونه‏گيري و حجم نمونه (در صورت وجود و امکان)**

1- روش کار به صورت تجربی و آزمایشگاهی می باشد.

تعداد 39 سر رت نر بالغ ن‍ژاد ویستار (Wistar) با محدوده وزنی 250-230 گرم از انستيتو پاستور ایران خريداري شده و به اتاق حيوانات دانشکده داروسازی دانشگاه آزاد واحد پزشکی تهران منتقل شد. حیوانات در قفس های فایبرگلاس به ابعاد 35×30×15 سانتی متر و تحت شرايط استاندارد با درجه حرارت 2 ±22 درجه سانتي گراد و سيكل نوري 12 ساعت روشنايي و 12 ساعت تاریكي و رطوبت نسبي 60-40 درصد نگه‌داري شدند.

برای تغذیه حیوانات غذای مخصوص رت (پلت) از شركت خوراك دام پارس تهران تهيه شد و آب لوله‌كشي تمیز از طریق شيشه هاي آبخوري بدون محدودیت در اختيار حیوانات قرار گرفت. در طول دوره تحقیق موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی، رعایت شد. حیوانات ابتدا گروه بندی شده و به منظور سازگاری با شرایط جدید، پس از یک هفته آزمایشات عملی آغاز شد.

# **3-2 گروه بندی نمونه ها**

**گروه کنترل)**حیوانات دست نخورده + تیمار روزانه آب مقطر)n=6

**گروه Sham)** حیوانات جراحی شده بدون BDL) + تیمار روزانه 5/0 میلی لیتر آب مقطر (حلال دارو)(n=6)

**گروه (BDL** حیوانات جراحی شده همراه با BDL + تیمار روزانه آب مقطر(n=6)

# **3-3 گروه های درمان تجربی**

-گروه درمان 100(رت هایBDL + تیمار خوراکی تیموکوئین روزانه با دوز100 میلی گرم/ کیلوگرم (n=6)

-گروه درمان**200** (رت هایBDL + تیمار خوراکی تیموکوئینون روزانه با دوز200 میلی گرم/ کیلوگرم (n=6)

# **3-4 گروه های کنترل تیموکوئینون**

-گروه تیموکوئینون 100 (رت های دست نخورده (intact+ تیمار خوراکی تیموکوئین روزانه با دوز 100 میلی گرم/ کیلوگرم (n=6)

-گروه تیموکوئینون **200** (رت های intact+ تیمار خوراکی تیموکوئینون روزانه با دوز 200 میلی گرم/ کیلوگرم (n=6)

# **نحوه تجویز داروها**

گروه های درمان تجربی روزانه تیموکوئینون را به صورت محلول در 5/0 میلی لیتر آب مقطر به صورت خوراکی (گاواژ درون معده ای) دریافت نمودند.

# **روش جراحی انسداد مجرای صفراوی (Bile Duct Ligation, BDL)**

جراحی BDL بر اساس روش استاندارد Uchinami و همکاران در سال 2006 انجام شد. به اختصار پس از اینکه هر حیوان با تزریق درون صفاقی (intraperitoneal, i.p.) مخلوط کتامین (mg/kg b.w 90) و زایلزین (mg/kgb.w 10)کاملا بیهوش شدند، از سطح پشتی در سینی تشریح خوابانده شده و با چسب دست و پاهای حیوان ثابت گردید. پس از shave کردن موهای ناحیه شکم، از الکل 70 درجه برای ضدعفونی کردن پوست شکم استفاده شد. سپس با استفاده از تیغ اسکالپل 11 یک شکاف طولی به اندازه 3 سانتی متر در خط میانی شکم ایجاد شده و در دو مرحله پوست و عضلات جدار شکم بازشد. سپس کبد کمی به بالا متمایل شد و پس از شناسایی مجرای مشترک صفراوی، با استفاده ازنخ سیلک (4-0) در دو نقطه جداگانه با فاصله از همگره زده شد (گره اول دقیقا زیر تقاطع مجرای کبدی و گره دوم قبل از ورودی مجرای پانکراسی) و مجرای صفراوی از بین این دو نقطه بریده شد. سپس لایه های عضله جدار شکم با نخ سیلک (4-0) و در لایه پوست با نخ نایلونی (4-0) با دقت دوخته شد پس از اتمام عمل جراحی یک میلی لیتر سرم استریل قابل تزریق (سالین 10%) به صورت i.pبه رت ها تزریقمی شد. پس از اتمام کار، محل جراحی با بتادین ضدعفونی شد. همچنین به منظور جلوگیری از کاهش درجه حرارت بدن، حیوان تا به هوش آمدن کامل بر روی صفحه ی گرمایشی (Heat pad) قرار گرفت. 3-2 روز پس از انجام عمل جراحی، تیره شدن رنگ ادرار و همچنین زرد شدن گوش ها و کف دست حیوانات، نشان دهنده موفقیت عمل جراحی کلستاز بود.

# **3-7 نحوه خون گیری از حیوانات و تثبیت بافت ها**

پس از پايان دوره 45 روزه آزمايش، حيوانات براي 12 ساعت ناشتا نگه داشته شدند. سپس توسط دی اتیل اتر در يك ظرف دربسته (دسیکاتور) یوتانزی شدند. سپس بلافاصله در سینی تشريح خوابانده و توسط قیچی برشی در وسط قفسه سینه ایجاد شد و پس از ظاهر شدن قلب حیوان، با استفاده از سرنگ 5 میلی لیتری، از داخل بطن قلب خون گيري انجام شد. نمونه‌ها پس از مكث 30 دقيقه‌اي جهت لخته شدن خون، در 2500 دور و به مدت 5 دقيقه سانتريفيوژ شدند، تا سرم از خون جدا شود. سپس با استفاده از سمپلر، نمونه‌هاي سرم به لوله‌هاي اپندرف منتقل و در يخچال نگه‌داري شدند تا براي تعيين فاكتورهاي بیوشیمیایی مورد نظر مورد استفاده قرار گرفتند. در ابتدا و انتهای دوره تیمار، وزن حیوانات در هریک از گروه های آزمایشی اندازه گیری شدند و تغییرات وزنی آنها ثبت گردید. همچنین در آخرین روز آزمایش، پس از خارج نمودن کبد کامل حیوان، وزن کبد و وزن نسبی کبد (گرم کبد/100 گرم وزن بدن) برای حیوانات هریک از گروه های آزمایشی به دست آمد. پس از تعیین وزن کبد، قسمتی از بافت کبد در محلول بافر فرمالین 10% تثبیت شده تا پس از انجام روش های متداول پردازش بافتی، از آن ها بلوک های پارافینی تهیه شود.همچنین از بخش دیگری از بافت کبد، با استفاده از دستگاه هموژنایزر، هموژن بافتی تهیه شد و به منظور سنجش فعالیت آنزیم های SODوCAT مورد استفاده قرار گرفت.

# **3-8 روش سنجش پارامترهای بیوشیمیایی و اندازه گیری سطح سرمی آنها**

اندازه گیری فعالیت سرمی آنزیم های ALP، ALT و AST و همچنین مقدار بیلی روبین تام و مستقیم، Chol، TG، HDL و LDL در سرم، بر اساس روش IFCC (فدراسیون بین المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی) و با استفاده از کیت های اختصاصی مربوطه، به کمک دستگاه اتوآنالایزر Italy، BT1500BT1500 در آزمایشگاه کلینیکال پاتولوژی کلینیک حیوانات خانگی سعادت آباد انجام گرفت .( Moss & Henderson, 1999)

# **3-9 روش تهیه هموژن از بافت کبد و سنجش فعالیت آنزیم های SODوCAT در آن:**

قسمتی از بافت کبد وزن شده و به مقدار هر گرم وزن کبد، یک میلی لیتر محلول کلرید پتاسیم (KCl) 15/0 مولار به آن اضافه شد. بافت ها پس از شستشو در داخل یک هاون چینی استریل قرار گرفته و با قیچی، به قطعات کوچک خرد شدند. سپس به ازای هر یک گرم کبد، 3 میلی لیتر محلول کلرید پتاسیم (KCl) 15/0 مولار در داخل بشر ریخته شده و قطعات بافت کبد به آن اضافه شد. چون فرایند هموژنیزاسیون بایستی در دمای 4- درجه سانتی گراد صورت گیرد، بشر در داخل یک ظرف یخ قرار داده شد و به کمک دستگاه هموژنایزر، بافت کبد هموژن شد. سپس محلول های هموژن تهیه شده در داخل چند فالیکون (به حجم های برابر) ریخته شده و توسط دستگاه سانتریفوژ یخچال دار در دمای 4 درجه سانتی گراد و دور 9000 دور در ثانیه به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی شیری رنگ داخل فالیکون ها، به لوله های اپندرف انتقال یافت. سپس درب آنها محکم بسته شده و در داخل فریزر (دمای 80- درجه سانتی گراد) قرار داده شد. در زمان مناسب پس از باز شدن یخ نمونه ها، لوله های اپندرف در داخل سانتریفوژ 5810R قرار داده شده و سپس بخش مایع آنها به وسیله سمپلر برداشته شد و در داخل ظرف های دستگاه اتوآنالایزر BT1500 قرار داده شد. سپس با استفاده از کیت های اختصاصی، فعالیت آنزیم های SOD و CAT هموژنات کبدی، برای هریک از نمونه ها اندازه گیری شد(Aebi, 1984; Sun *et al.,* 1988).

# **3-10 مراحل پاساژ بافتی (Tissue processing)**

شامل مراحل آب گیری با الکل های صعودی (Dehydration)، شفاف سازی (Clearation)، استفاده از تولوئن در سه مرحله و هر مرحله به مدت یک ساعت، آغشته سازی با پارافین (Impregnation)، قالب گیری (Embedding) و برش گیری با میکروتوم (Microtom)به ضخامت 4 ميكرومترمی باشد که بر اساس پروتکل های مربوطه انجام شد. ازمجموع برش­هاي حاصل از هرنمونه، به طورتصادفي ازهر 5 برش،يك برش انتخاب گردید.

# **3-11 انجام رنگ آمیزی (Staining)تری کروم ماسون (Masson Trichrome)**

رنگ آمیزی تری کروم ماسون به منظور تشخیص افزایش رسوب کلاژن و تعیین شدت فیبروز در بافت و با استفاده از روش های معمول انجام شد. در این روش از 3 رنگ به ترتیب برای رنگ آمیزی کلاژن، سیتوپلاسم و هسته سلول استفاده شد. این روش شامل رنگ آمیزی پشت سرهم رنگ های ذیل است:

رنگ آهن هماتوکسیلین(Iron Hematoxylin) که هسته ها را سیاه رنگ می کند، رنگ Biebrich Scarlet که سیتوپلاسم را قرمز رنگ می کند و رنگ Aniline Blue یا Aniline Light Green که به ترتیب سبب آبی یا سبز رنگ شدن کلاژن می شود (Escobedo et al., 2013).

# **3-12 نحوه ارزيابي هيستوپاتولوژيكي نمونه ها**

آسیب کبدی بر اساس روش اصلاح شده Sant’Anna و همکاران (2011)، رتبه بندی شد. به این صورت که در هر نمونه بصورت تصادفی 10 ناحیه مورد بررسی قرار گرفت و میانگین آنها بعنوان یک رتبه واحد در نظر گرفته شد. رتبه بندی آسیب به شرح ذیل می باشد:

* **نکروز:** 0= بدون نکروز، 1= آسیب موضعی کمتر از 25%، 2= آسیب موضعی بین 50-25%، 3= نکروز گسترده ولی موضعی، 4= نکروز وسیع.
* **نفوذ سلول های التهابی**: 0= عدم التهاب، 1= التهاب کانونی کمتر از 25%، 2= التهاب کانونی بین 50-25%، 3= التهاب گسترده ولی موضعی، 4= التهاب وسیع.
* **بافت همبند:** 0= فاقد بافت همبند، 1= رسوب کلاژن بدون تشکیل دیواره، 2= تشکیل دیواره ناقص، 3= دیواره کامل و نازک، 4= دیواره کامل و ضخیم.
* **هیپرپلازی مجاری صفراوی:** 0= عدم هیپرپلازی، 1= کمتر از 25% هر لبول، 2= 50-25% هر لبول، 3= گسترده ولی موضعی، 4= وسیع(Sant’Anna *et al.,2011*).

**3-13 رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی**

ایمونوهیستوشیمی روشی برای نشان دادن حضور و محل پروتئین ها در برش­های بافتی است. از آنجا که آنتی بادی ها به شدت اختصاصی هستند، در برش های بافتی، تنها به پروتئین های مربوط به خود متصل می شوند. بنابراین تعامل بین آنتی بادی-آنتی ژن با رنگ پذیری بافت مشخص می شود. مراحل آن به ترتیب زیر انجام شد:

* شستشوی اسلایدها 2 بار و هر بار به مدت 5 دقیقه در TBS(Tris buffer saline)
* بلاک نمودن اسلایدها توسط سرم نرمال (سرم نرمال 10% با BSA(Bovin serum albumin) 1% در TBS به مدت دو ساعت در دمای اتاق
* زهکشی (Drain) اسلایدها برای چند ثانیه
* اضافه نمودن آنتی بادی های اولیه رقیق شده در TBS به BSA 1%
* انکوباسیون در دمای 4 درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز
* شستشوی آرام با TBS 25% تریتون (2 بار و هر بار به مدت 5 دقیقه)
* انکوباسیون اسلایدها در H2O2 3/0% در TBS به مدت 15 دقیقه
* اضافه نمودن آنتی بادی های ثانویه رقیق شده در TBS با BSA 1% به اسلایدها و انکوباسیون آنها در درجه حرارت اتاق به مدت یک ساعت
* شستشوی اسلایدها با TBS (3 بار و هر بار به مدت 5 دقیقه)
* اضافه نمودن DAB و HRP (Horse reddish peroxidase) به نمونه ها برای مدت 10 دقیقه در درجه حرارت اتاق (ابتدا HRP و پس از شستشو DAB اضافه گردید).
* شستشو با آب جاری به مدت 5 دقیقه
* رنگ آمیزی اسلایدها با هماتوکسیلین
* دهیدراتاسیون
* شفاف سازی
* مونته کردن اسلایدها
* پس از آماده شدن نمونه ها، بیان TGF-β1 با میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفتند (کیت TGF-β1 از شرکت abcam خریداری شد).

# **3-14 آناليز آماري داده‌ها**

تمامي داده‌ها از نظر آماري با استفاده از آناليز واريانس يك طرفه (One-way-ANOVA) و تست Tukey بررسي گرديد. نتايج به صورت Mean ± S.E.M ارائه شده است. ملاك استنتاج آماری (05/0 > *p* ) می باشد.

# **3-13 روش گردآوری اطلاعات**

نتایج مربوط به مطالعه تغییرات بافتی کبد و پارامترهای مورد بررسی بین گروه های کنترل و تجربی جمع آوری گردید. اطلاعات مربوط به سابقه پژوهش از مطالعات کامپیوتری و پژوهشهای رایانه ای و مطالعات کتابخانه ای بدست می آید و مطالعات تجربی بر روی گروه ها می باشد.

# **منابع**

1. Abdel-Fattah AM, Matsumoto K, and Watanabe H. Antinociceptive effects of Nigella sativa oil and its major component, thymoquinone, in mice. Eur. *J. Pharmacol. 2000*; 400: 89-97.
2. Abdel-Wahhab MA, Aly SE. Antioxidant property of Nigella sativa (black cumin) and Syzygium aromaticum (clove) in rats during aflatoxicosis. *J. Appl. Toxicol. 2005*; 25 (3): 218 -23.
3. Abdelmeguid NE, Fakhoury R, Kamal SM, Al Wafai RJ. Effects of Nigella sativa and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic β‐cells of streptozotocin‐induced diabetic rats. *J Diabetes. 2010;2*(4):256-66.
4. Abuharfeil NM, Salim M, Von Kleist S. Augmentation of natural killer cell activity in vivo against tumour cells by some wild plants from Jordan. *Phytother.Res. 2001*; 15: 109 – 13.
5. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol 1984;105:121–6.
6. Aksu, B., Umit, H., Kanter, M., Guzel, A., Aktas, C., Civelek, S., Uzun, H. (2010): Effects of methylene blue in reducing cholestatic oxidative stress and hepatic damage after bileduct ligation in rats. *J.Acta. histochemica.112*:259-269.
7. Al-Ali A.,Alkhawajah AZ., Randhawa MA., Ahmed Shaikh N. Oral and intraperitoneal ld50 of thymoquinone, an active principle of nigella sativa, in mice and rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad 2008*;20(2), 25-27.
8. Ali, BH, Blunden G., Pharmacological and toxicological properties of Nigellasativa, Phytother. Res. 17 (2003) 299–305, PMID: 12722128.[2] W.G. Goreja, Black Seed: Nature’s Miracle Remedy, NY7 Amazing Herbs Press,New York, 2003.
9. Aljabre SH, Randhawa MA, Akhtar N,Alakloby OM, Alqurashi AM, Aldossary A.Antidermatophyte activity of ether extract ofNigella sativa and its active principle,thymoquinone. J. Ethnopharmacol. 200; 101(1-3):116-9.
10. Al-Jishi SA, Abuo Hozaifa B. Effect of Nigella sativa on blood hemostatic function in rats.J.Ethnopharmacol. 2003; 85 (1): 7 - 14.
11. Al-Johar D, Shinwari N, Arif J, Al-Sanea N,Jabbar AA, El-Sayed R, Mashhour A, Billedo G,El-Doush I, Al-Saleh I. Role of Nigella sativa anda number of its antioxidant constituents towards azoxymethane-induced genotoxic effects and colon cancer in rats. Phytother. Res. 2008; 22 (10): 1311- 23.
12. Al-Majed AA, Daba MH, Asiri YA, Al- Shabanah OA, Mostafa AA and El-Kashef HA. Thymoquinone-induced relaxation of guinea-pig isolated trachea. Res. Commun. Mol. Pathol.Pharmacol. 2001; 110: 333-345
13. Angulo I, Rullas J, Campillo JA, Obregon E, Heath A, Howard M, et al. Early myeloid cells are and reduced glutathione against irradiation-induced oxidative injury and number of peripheral blood lymphocytes in rats.Photochem.Photobiol. 2006;82 (6): 1691 - 6.
14. Arrese M, Trauner M. Molecular aspects of bile formation and cholestasis. Trends in Molecul Med. 2003; 9(12): 558-564.
15. Asgharzadeh F., Bargi1 R., Beheshti1 F., Hosseini M., Farzadnia M., Khazaei M., Thymoquinone restores liver fibrosis and improves oxidative stress status in a lipopolysaccharide-induced inflammation model in rats. AJP, 2017;7(6), 502-510.
16. Awad EM. In vitro decreases of the fibrinolytic potential of cultured human fibrosarcoma cell line, HT1080, by Nigella sativa oil. Phytomedicine 2005; 12: 100 – 7.
17. Badary OA, Gamal El-Din AM. Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthreneinduced fibrosarcoma tumorigenesis.Cancer Detect.Prev. 2001; 25: 362 – 8.
18. Badary OA, Nagi MN, Al-Shabanah OA, Al- Sawaf HA, Al-Sohaibani MO and Al-Bekairi AM. Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. Can. J. Physiol. Pharmacol.1997; 75: 1356-1361.
19. Bayrak O, Bavbek N, Karatas OF, Bayrak R, Catal F, Cimentepe E, Akbas A, Yildirim E, UnalBurits M, Bucar F. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. Phytother. Res. 2000;14 (5): 323 - 8.
20. Bergasa NV, Alling DW, Vergalla J, Jones EA. Cholestasis in the male rat is associated with naloxone-reversible antinociception. J Hepatol. 1994; 20(1): 85–90.
21. Bergasa NV, Boyella VD. Liver derived endogenous opioids may interfere with the therapeutic effect of interferon in chronic hepatitis C. Med Hypotheses. 2008; 70: 556-559.
22. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. Phytother Res. 2000; 14: 323-28.
23. Cameron GR, Oakley CL. Ligation of the common bile duct. J. Pathol. Bacteriol. 1932; 35: 769–798.
24. Cemek M,Enginar H,Karaca T,Unak P. In vivo radioprotective effects of Nigella sativa L oil and reduced glutathione against irradiation-induced oxidative injury and number of peripheral blood lymphocytes in rats. Photochem Photobiol. 2006; 82(6): 1691-6.
25. Chakrabarty A, Emerson MR, LeVine SM. Heme oxygenase-1 in SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis.Mult.Scler.2003; 9: 372 – 81.
26. Chari RS, Schutz SM, Haebig JE.Adenosine nucleotides in bile. Am J Physiol. 1996; 270:G246–52.
27. Choudhary S, Keshavarzian A, Yong S,Wade M, Bocckino S, Day BJ. Novel antioxidantszolimid and AEOL11201 ameliorate colitis in rats.Dig. Dis. Sci. 2001; 46: 2222 – 30
28. Christou NV, Tellado-Rodriguez J, Chartrand L, Giannas B, Kapadia B, Meakins J. Estimating mortality risk in preoperative patients using immunologic, nutritional, and acute-phase response variables.Ann. Surg. 1989; 210: 69 – 77.
29. Coban, S., Yildiz, F., Terzi, A., Al, B., Aksoy, N., Bitiren, M., & Celik, H. (2010). The effects of Nigella sativa on bile duct ligation induced‐liver injury in rats. Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease,28(1), 83-88.
30. Crocenzi FA, Zucchetti AE, Boaglio AC, Barosso IR, Sanchez PE, Mottino AD, et al. Localization status of hepatocellular transporters in cholestasis. Frontiers in Bioscience (Landmark edition) 2011;17:1201-18.
31. Czaja, A.J. (2014): Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease.World. J.Gastroenterol. 20(10):2515- 2532.
32. D, Akcay A. Nigella sativa protects against ischaemia/reperfusion injury in rat kidneys. Nephrol. Dial. Transplant 2008; 23 (7): 2206 - 12.
33. Dehkordi FR, Kamkhah AF Antihypertensive effect of Nigella sativa seedextract in patients with mild hypertension.Fundam.Clin.Pharmacol . 2008; 22 (4): 447 - 52.
34. El Daly ES. Protective effect of cysteine and vitamin E, Crocus sativus and Nigella sativa extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. J. Pharm. Belg. 1998; 53 (2): 87 - 93.
35. El-Bahai MN, Al-Hariri MT, Yar T, Bamosa AO Cardiac inotropic and hypertrophic effects of Nigella sativa supplementation in rats. Int. J. Cardiol. 2009; 131 (3): 115 - 7.
36. El-Dakhakhny M, Madi NJ, Lembrt N, Ammon HP. Nigella sativa oil, nigellon and derived thymoguinone inhibit sythesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear lekocytes from Rats. J Ethnopharmacol 2002; 81:161-164.
37. El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan MA, Shimizu Y, El- Sayed MG, Minamoto N.El-Saleh SC, Al-Sagair OA, Al-Khalaf MI.Thymoquinone and Nigella sativa oil protection against methionine-inducedhyperhomocysteinemia in rats.Int. J. Cardiol.2004; 93: 19 – 23.
38. Escobedo G., Arjona-Román J.L., Meléndez- Pérez R., Suárez-Álvarez K., Guzmán C., Aguirre-García J., et al., Liver exhibits thermal variations according to the stage of fibrosis progression: A novel use of modulated-differential scanning calorimetry for research in hepatology. Hepatol Res 2013;43(7):785-94.
39. F.Q. Alenzi, S. El-Bolkiny Yel, M.L. Salem, Protective effects of Nigella sativa oiland thymoquinone against toxicity induced by the anticancer drug cyclophos-phamide, Br. J. Biomed. Sci. 67 (2010) 20–28, PMID: 20373678.
40. Farah IO,Begum RA. Effect of Nigella sativa (N. sativa L.) and oxidative stress on the survival pattern of MCF-7 breast cancer cells. Biomed Sci Instrum.2003; 39: 359-64.
41. Fararh KM, Atoji Y, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Takewaki T. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of Nigella sativa L. oil in streptozotocininduced diabetic hamsters. Res. Vet. Sci. 2004; 77: 123 – 9.
42. Farina A, Dumonceau JM, Frossard JL. Proteomic analysis of human bile from malignant biliary stenosis induced by pancreatic cancer. J Proteome Res. 2009; 8:159-69.
43. Farrag AR, Mahdy KA, Abdel Rahman GH, Osfor MM. Protective effect of Nigella sativa seeds against lead-induced hepatorenal damage in male rats.Pak. J. Biol. Sci. 2007; 10 (17): 2809 - 16. Fong HH. Integration of herbal medicine into modern medical practices: issues and prospects.Integr.Cancer Ther.2002; 1: 287 – 93.
44. Gaskari SA, Honar H, Lee SS. Therapy insight: cirrhotic cardiomyopathy. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 2006;3:329-37.
45. Geng D, Zhang S, Lan J. Analysis on chemical components of volatile oil and determination of thymoquinone from seed of Nigella glandulifera. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2009; 34 (22): 2887 - 90.
46. GozeneliI O, TatliII F, Erdal Gunes A, Emin Guldur M, Taskin A, Bardakci O., Effects of thymoquinone and curcumin on the regeneration of rat livers subject to 70% hepatectomy.. Acta Cir. Bras. 2018;33(2):110-116.
47. Greim H, Trulzsch D, Czygan P. Mechanism of cholestasis. 6. Bile acids in human livers with or without biliary obstruction. Gastroenterology. 1972; 63: 846-850.
48. Hamrouni-Sellami I, Elyes Kchouk M, Marzouk B. Lipid and aroma compostion of black cumin (Nigella sativa L.) seeds from Tunisia.J Food Biochem.2008; 32(3): 335-52.
49. Han JM, Kim HG, Choi MK, Lee JS, Park HJ, Wang JH.Aqueous Extract of Artemisia iwayomogi Kitamura Attenuates Cholestatic Liver Fibrosis in a Rat Model of Bile Duct Ligation.Food Chem. Toxicol. 2012.
50. Haq A, Abdullatif M, Lobo PI, Khabar KS, Sheth KV, al- Sedairy ST. Nigella sativa: effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity.Immunopharmacol. 1995; 30: 147 – 55
51. Haq A, Abdullatif M, Lobo PI, Khabar KS,Sheth KV, al- Sedairy ST. Nigella sativa: effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity. Immunopharmacol.1995; 30: 147 – 55.
52. Haq A, Lobo PI, Al-TufailM, Rama NR, Al-Sedairy ST. Nigella sativa effect on humanlymphocytes and
53. high producers of nitric oxide upon CD40 plus IFN-gamma stimulation through a mechanismdependent on endogenous TNF-alpha and IL- 1alpha. Eur. J. Immunol. 2000; 30: 1263 – 71.
54. Hofmann AF, Hagey LR. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics.Cell Mol Life Sci. 2008; 65:2461–83.
55. Homayoun H, Sayyah M, Dehpour AR. The additive effect of opioids and nitric oxide in increasing pentylenetetrazole-induced seizure threshold in cholestatic mice. J Gastroenterol Hepatol. 2002b; 17(1): 96-101.
56. Hosseinzadeh H, Parvardeh S, Nassiri-Asl M,and Mansouri MT. Intra-cerebroventricular administration of thymoquinone, the major constituent of Nigella sativa seeds, suppresses epileptic seizures in rats. Med. Sci. Monit. 2005;11, 106-110.
57. Houghton PI, Zarka R, Delas Heras B and Hoult RS. Fixed oil of Nigella sativa and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation.Planta Med. 1995; 61: 33 - 36.
58. Iddamaldeniya SS, Wickramasinghe N,Thabrew I, Ratnatunge N, Thammitiyagodage MG.Protection against diethylnitrosoamine- induced hepatocarcinogenesis by an indigenous medicinecomprised of Nigella sativa, Hemidesmus indicus and Smilax glabra: a preliminary study. J.Carcinog. 2003; 2: 6 - 10.
59. Işik H, Cevikbaş A, Gürer US, Kiran B, UresinY, Rayaman P, Rayaman E, Gürbüz B,Büyüköztürk S. Potential Adjuvant Effects of Nigella sativa Seeds to Improve Specific Immunotherapy in Allergic Rhinitis Patients. Med. Princ. Pract. 2010; 19 (3): 206 – 11
60. Ismail M, Al-Naqeep G, Chan KW. Nigella sativa thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. Free Radic Biol Med.2010;48(5):664-72
61. J. Akhondian, H. Kianifar, M. Raoofziaee, A. Moayedpour, M.B. Toosi, M. Kha-jedaluee, The effect of thymoquinone on intractable pediatric seizures (pilotstudy), Epilepsy Res. 93 (2011) 39–43, PMID: 21112742
62. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. Journal of Gastroenterology and Hepatology 2011;26:173-9.
63. Kaleem M, Kirmani D, Asif M, Ahmed Q, Bano B. Biochemical effects of Nigella sativa Lseeds in diabetic rats. Indian J. Exp. Biol. 2006;44(9): 745 - 8.
64. Kaleem M, Kirmani D, Asif M, Ahmed Q, Bano B. Biochemical effects of Nigella sativa L. seeds in diabeticats. Indian J Exp Biol. 2006;44(9):745.
65. Kalus U, Pruss A, Bystron J, Jurecka M,Smekalova A, Lichius JJ, Kiesewetter H. Effect of Nigella sativa (black seed) on subjective feeling inpatients with allergic diseases. Phytother. Res.2003; 17 (10): 1209 - 14.
66. 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 tetrachloridetreated rats. World J Gastroenterol WJG.2005;11(42):6684-8.
67. Kanter M, Coskun O, Korkmaz A, Oter S. Effects of Nigella sativa on oxidative stress and beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. Discov Mol Cell Evol Biol. 2004; 279(1): 685-91.
68. Kapoor S. Emerging clinical and therapeutic applications of Nigella sativa in gastroenterology.World J. Gastroenterol. 2009; 15 (17): 2170 - 1.
69. Khan MA, Ashfaq MK, Zuberi HS, Mahmood MS, Gilani AH.The in vivo antifungalactivity of the aqueous extract from Nigella sativa seeds.Phytother.Res. 2003; 17: 183 – 6.
70. Khan N, Sultana S. Inhibition of two stage renal carcinogenesis, oxidative damage and hyperproliferative response by Nigella sativa.EJCP.2005; 14(2): 159-68.
71. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymtomatic chronic active hepatitis. Hepatology. 1981; 1:431.
72. Kong, L. Y., Li, G. P., Yang, P., & Xi, Z. (2015).Protective effect of thymoquinone on cholestatic rats with liver injury. Genet Mol Res, 14(4), 12247-12253.
73. Landa P, Marsik P, Havlik J, Kloucek P, Vanek T, Kokoska L. Evaluation of antimicrobial and anti-inflammatory activities of seed extracts from six Nigella species. J. Med. Food 2009; 12(2): 408 – 15
74. Lee TY, Chang HH, Chenc JH, Hsueh ML, Kuo JJ. Herb medicine Yin-Chen-Hao-Tang ameliorates hepatic fibrosis in bile duct ligation rats. J of Ethnopharmacol. 2007;109:318–324.
75. Lefkowitz DL, Gelderman MP, Fuhrmann SR, Graham S, Starnes III JD, Lefkowitz SS.\Liu B, Miyata S, Kojima H, Urihara A, Kusunoki H, Suzoki K, Kasuga M. Low phagocytic activity of resident peritoneal macrophages indabetic mice. Diabetes 1999; 48:2074-208
76. Ljubuncic P, Tanne Z, Bomzon A. Evidence of a systemic phenomenon for oxidative stress in cholestatic liver disease. Gut. 2000; 47:710-6.
77. Loguercio C, Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D'Auria MV, De Simone C, et al. Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. J Clin Gastroenterol 2005;39(6):540-3.
78. M.M. Abukhader, The effect of route of administration in thymoquinone tox-icity in male and female rats, Indian J. Pharm. Sci. 74 (2012) 195–200, PMID:23440704.
79. M.N. Nagi, K. Alam, O.A. Badary, O.A. Al-Shabanah, H.A. Al-Sawaf, A.M. Al-Bekairi, Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicityin mice via an antioxidant mechanism, Biochem. Mol. Biol. Int. 47 (1999)153–159.
80. Magyar K, Palfi M, Tabi T, Kalasz H, Szende B, Szoko E. Pharmacological aspects of deprenyl. Current Medicinal Chemistry. 2004;11:2017-31.
81. Maha, E.S. (2009): Evaluation of the possible protective role of folic acid on the liver toxicity induced experimentally by methotrexate inadult male albino rats. Egy. J.Histol. 32(1):118- 128.
82. Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S.The effect of Nigella sativa oil against the liver damage induced by Schistosoma mansoni infection in mice. J. Ethnopharmacol. 2002; 79: 1 – 11.
83. Mansour M, Tornhamre S. Inhibition of 5- lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. J Enzyme Inhib.Med. Chem. 2004; 19: 431 – 6.
84. Medenica R, HJanssens J, Tarasenko A,Lazovic G, Corbitt W, Powell D, et al.Antiangiogenic activity of Nigella sativa plant extract in cancer therapy. Proc. Annu. Meet Am.Assoc. Cancer Res. 1997; 38: A1377.
85. Medzhitov R, Janeway Jr CA. How does the immune system distinguish self from nonself? Semin Immunol. 2000; 12: 185 – 8.
86. Mendel RR, Kruse T. Cell biology of molybdenum in plants and humans. Biochimica et Biophysica Acta. 2012; 1568–1579.
87. Mohamed A, Shoker A, Bendjelloul F, Mare A, Alzrigh M, Benghuzzi H. Improvement ofexperimental allergic encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone; an oxidative stress inhibitor.Biomed. Sci. Instrum. 2003; 39: 440 – 5.
88. Mohamed El-Naa M., Salahuddin A., Protective effect of thymoquinone against ethinylestradiol and chlorpromazine-induced cholestasis in rats. Egypt. J. Biomed. Sci. Vol. 45(2014), 161-173.
89. Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology,and pathophysiology. World J Gastroenterol. 2009;15:804–16.
90. Morikawa T, Xu F, Kashima Y, Matsuda H, Ninomiya K, Yoshikawa M. Novel dolabellanetype diterpene alkaloidswith lipid metabolism promoting activities from the seeds of Nigella sativa. Org. Lett. 2004; 6: 869 – 72.
91. Moss DW, Henderson AR. Clinical enzymology. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz textbook of clinical chemistry. 1999;3rd ed. Philadelphia: WB.
92. Nabavizadeh F, Moloudi R, Dehpour AR, Nahrevanian H, Shahvaisi K, Salimi E. The effects of cholestasis and cirrhosis on gastric acid and pepsin secretions in rat: Involvement of nitric oxide. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2010;13:207-12.
93. Nagi MN, Alam K, Badary OA, al-Shabanah OA, al-Sawaf HA and Al-Bekairi AM.Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. Biochem.Mol. Biol. Int. 1999; 47: 153-159.
94. Neutrophilic myeloperoxidase- macrophage interactions perpetuate chronic inflammation associated with experimental arthritis. Clin.Immunol. 1999; 91: 145 – 55
95. Nieto N, Torres MI, Fernandez MI, Giron MD, Rios A, Suarez MD. Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. Dig. Dis. Sci. 2000; 45: 1820 – 7.
96. Oguz, S., Kanter, M., Erboga, M., & Erenoglu, C. (2012).Protective effects of thymoquinone against cholestatic oxidative stress and hepatic damage after biliary obstruction in rats.Journal of molecular histology, 43(2), 151-159.
97. Omar A, Ghosheh S, Abdulghani A, Houdi A, Crookscor PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (Nigella sativa L).J. Pharm. Biomed.Anal.1999; 19: 757 – 62.
98. Orellana M, Rodrigo R, Thielemann L, Guajardo V. Bile duct ligation and oxidative stress in the rat: effects in liver and kidney. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 2000; 126:105–111.
99. Ozugurlu F, Sahin S, Idiz N, Akyol O, Ilhan A, Yigitoglu R, et al. The effect of Nigella sativa oil against experimental allergic encephalomyelitis via nitric oxide and other oxidative stress parameters. Cell Mol Biol. 2005; 51(3): 337-42.
100. P.K. Kirui, J. Cameron, H.A. Benghuzzi, M. Tucci, R. Patel, F. Adah, et al., Effectsof sustained delivery of thymoqiunone on bone healing of male rats, Biomed.Sci. Instrum.40 (2004) 111–116, PMID: 15133944.
101. Parvardeh S and Hosseinzadeh H. Hypnosis and muscular relaxant activity of thymoquinet of Nigella sativa seeds and its effect on locomotion and coordination in mice. Medicinal Plants 2003;2, 17-25.
102. Parvardeh S and Hosseinzadeh H. Role of opioid receptors on anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of Nigella sativa, in mice. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2003; 6: 202-206.
103. Parvardeh S, Nasiri Asl M, Hossinzadeh H.Protective effects of thymoquinone against ischemia-reperfusion injury in rat brain. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2004; 7: 65-70.
104. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. World J Gastroenterol 2009; 15:1677–89.
105. Ponziani, F.R., Cazzato, I.A., Danese, S., Fagiuoli, S., Gionchetti, P., Annicchiarico, B.E., D'Aversa, F., Gasbarrini, A. (2012): Folate in gastrointestinal health and diseas, review. Eur. Rev. Med.Pharmacol. Sci.16(3): 376-385.
106. Portincasa P, Grattagliano I, Testini M. Parallel intestinal and liver injury during early cholestasis in the rat: modulation by bile salts and antioxidants. Free Radic Biol Med. 2007; 42:1381-91.
107. Ramadan MF, Morsel JT. Characterization of phospholipids composition of black cumin (Nigella sativa L.) seed oil.Nahrung 2002; 46: 240 – 4.
108. Rchid H, Chevassus H, Nmila R, Guiral C,Petit P, Chokaïri M, Sauvaire Y. Nigella sativa seed extracts enhance glucose-induced insulin release from rat-isolated Langerhans islets. Fundam.Clin.Pharmacol.2004; 18 (5): 525 - 9.
109. Reyes H, Simon FR. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: an estrogen-related disease. Semin Liver Dis. 1993; 13(3): 289-301.
110. Reynolds RP, Rahija RJ, Schenkman DI, Richter CB. Experimental murine cytomegalovirusinfection in severe combined immunodeficient mice.Lab. Anim. Sci. 1993; 43: 291 – 5.
111. Rolo AP, Palmeira CM, Wallace KB. Mitochondrially mediated synergistic cell killing by bile acids.Biochim Biophys Acta. 2003; 1637:127–32.
112. S. Ince, I. Kucukkurt, H. Huseyin Demirel, R. Turkmen, E. Sever, Thymoquinoneattenuates cypermethrin induced oxidative stress in Swiss albino mice, Pestic.Biochem. Phys. 104 (2012) 229–235.
113. Salehi surmaghi MH. Nigella Sativa. In Herbal Medicine and Herbal Therapy, volum 2, Donyay Taghziah press. Tehran Iran. 2008, pp: 216 - 9.
114. Salem ML, Hossain MS. Protective effect of black seed oil from Nigella sativa against murine cytomegalovirus infection. Int. J. Immunopharmacol. 2000; 22 (9): 729 – 40.
115. Salem. ML. Review Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed. International Immunopharmacol.2005; 5: 1749 – 770.
116. Salim EI, Fukushima S Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (Nigellasativa L.) seeds against rat colon carcinogenesis.Nutr. Cancer 2003; 45 (2): 195 - 202.
117. Sant’Anna L.B., Cargnoni A., Ressel L., Vanosi G., Parolini O. Amniotic membrane application reduces liver fibrosis in a bile duct ligation rat model. Cell Transplant 2011;20:441–453.
118. Saricicek E, Tarakcioglu M, Saricicek V, Taner Gulsen M., Karakok M., Baltaci Y., et al., Effect of Nigella sativa on experimental liver fibrosis. Biomedical Research 2014;25(1).
119. Sokol RJ, Dahl R, Devereaux MW. Human hepatic mitochondria generate reactive oxygen species and undergo the permeability transition in response to hydrophobic bile acids. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 41:235–43.
120. Spahr L, Negro F, Leandro G, Marinescu O, et al. Impaired hepatic mitochondrial oxidation using the 13C-methionine breath test in patients with macrovesicular steatosis and patients with cirrhosis. Med Sci Monit. 2003; 9: CR6-11
121. Suddek G.M. Protective role of thymoquinone against liver damage inducedby tamoxifen in female rats, Can. J. Physiol. Pharmacol. 92 (2014) 640–644,PMID: 24941454
122. Swamy SM, Tan BK. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of Nigella sativa seeds. J. Ethnopharmacol. 2000; 70:1 – 7.
123. Tekbas, A., Huebner, J., Settmacher, U., & Dahmen, U. (2018).Plants and Surgery: The Protective Effects of Thymoquinone on Hepatic Injury—A Systematic Review of In Vivo Studies. International journal of molecular sciences, 19(4), 1085.
124. Thomson ABR, Shaffer EA. First principles of gastroenterology, the basis of disease and an approach to management. Fifth Edition Janssen & Ortho. 2008; 9: 514-519.
125. Tomur, A., Kanter, M., Gurel, A., Erboga, M. (2011): The efficiency of CAPE on retardation of hepatic fibrosis in biliary obstructed rats. J.Mol.Histol. 42(5):451-458.
126. Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular regulation of hepatocellular transport systems in cholestasis. J Hepatol. 1999; 31: 165-178.
127. Uchinami H., Seki E., Brenner D.A., D’Armiento J. Loss of MMP 13 attenuatesmurine hepatic injury and fibrosis during cholestasis. Hepatology 2006;44:420–429.
128. Uz E, Bayrak O, Uz E, Kaya A, Bayrak R, Uz B, et al. Nigella sativa oil for prevention of chronic cyclosporine nephrotoxicity: an experimental model. Am J Nephrol.2008; 28(3): 517-22.
129. Velayudham A, Dolganiuc A, Ellis M, Petrasek J, Kodys K, Mandrekar P, et al. VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. J Hepatol 2009;49(3):989-97.
130. Wahler JB, Swain MG, Carson R, Bergasa NV, et al. Blood-brain barrier permeability is markedly decreased in cholestasis in the rat. Hepatology. 1993; 17: 1103-1108.
131. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development.Oncogene 1999; 18: 7908 – 16.
132. Worthen DR, Ghosheh OA and Crooks PA. The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of black seed, Nigella sativa L. Anticancer Res. 1998; 18 (3 A): 1527-1532.
133. Wu D, Meydani M, Leka LS, Nightingale Z, Handelman GJ, Blumberg JB.Effect of dietary supplementation with black currant seed oil on the immune response of healthyelderly subjects.Am. J. Clin. Nutr.1999; 70: 536 – 43.
134. Yan L, Bai X, Fang Z, Che L, Xu S, Wu D. Effect of different dietary omega-3/omega-6 fatty acid ratios on reproduction in male rats. Lipids Health Dis 2013;12:33
135. Yar T, El-Hariri M, El-Bahai MN, BamosaAO.Effects of Nigella sativa supplementation for one month on cardiac reserve in rats.Indian J.Physiol.Pharmacol. 2008; 52 (2): 141 - 8.
136. Yates, J.R., Ferguson-Smith, M.A., Shenkin, A., Guzman-Rodriguez, R., White, M., Clark, B.J. (1987): Is disordered folate metabolism the basis for the genetic predisposition to neural tube defects?.Clin. Genet. 31(5):279-287.
137. Yildiz F, Coban S, Terzi A, Ates M, Aksoy N, Cakir H, et al. Nigella sativa relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver. World J Gastroenterol. 2008; 14(33): 5204-9.
138. Yilmaz Y, Yonal O, Kurt R, Bayrak M, Aktas B, Ozdogan O. Noninvasive assessment of liver fibrosis with the aspartate transaminase to platelet ratio index (APRI): Usefulness in patients with chronic liver disease: APRI in chronic liver disease. Hepatitis monthly 2011 Feb; 11(2): 103-6.
139. Zafeer MF, Waseem M., Chaudhary S., Parvez S., Cadmium-induced hepa-totoxicity and its abrogation by thymoquinone, J. Biochem. Mol. Toxicol. 26 (2012) 199–205, PMID: 22539463
140. Angulo P, Hui JM, Marchesini G,et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. Hepatology2007;45(4):846.

1. -Thymoquinone (TQ) [↑](#footnote-ref-1)
2. Thymoquinone [↑](#footnote-ref-2)