Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۹ زمستان ۱۳۹۴
DOI: 10.22034/vj.2015.103032

اثر حفاظتی گل همیشه بهار در بروز آسیب کبدی ناشی از تتراکلرید کربن در جوجه‌های گوشتی

• سارا بهشتی مقدم (نویسنده مسئول)
دانشجوی دکترای دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
• حسن کرمانشاهی
عضو هیات علمی دانشگاه فردوسی مشهد
• ریحانه واحد
کارشناسی ارشد دانشگاه فردوسی مشهد
• حسن نصیری مقدم
عضو هیات علمی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: مهر ۹۳ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۹۳
Email: s_behdani86@yahoo.com

چکیده

این مطالعه به‌منظور بررسی اثر سطوح مختلف عصاره روغنی گل‌همیشه‌بهار بر آنزیم های کبدی وتغییرات هیستوپاتولوژی بافت کبدجوجه‌های گوشتی طی یک دوره ۴۲ روزه انجام گرفت.تعداد ۲۰۰ قطعه جوجه گوشتی نر سویه راس ۳۰۸ در یک طرح کاملاً تصادفی با پنج گروه و چهار تکرار و ۱۰ پرنده در هر تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل گروه کنترل منفی (فاقد افزودنی عصاره گل‌همیشه‌بهار و تتراکلریدکربن)، کنترل مثبت {تتراکلریدکربن (یک میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و فاقد افزودنی عصاره گل‌همیشه‌بهار}و سه تیمار دیگر شامل سطوح ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره عصاره گل همیشه-بهار به‌همراه تتراکلریدکربن بود. فراسنجه‌های خون (SGOT و SGPT)، که در اثر تزریق تتراکلریدکربن، سطح‌شان در خون افزایش یافته بود، عصاره گل همیشه بهار توانست اثرات منفی ناشی از این ماده سمی را تقلیل دهد. وزن نسبی کبد در تیمارهایی که علاوه بر تتراکلریدکربن، سطوح مختلف عصاره گل همیشه بهار را دریافت کرده بودند، نسبت به تیمار دریافت کننده‌ی تتراکلریدکربن، به‌صورت معنی‌داری پایین تر بود (P<۰/۰۵).در شاخص‌های مربوط به سنجش سیستم ایمنی، سطح ایمنوگلوبولین G در تیماری که علاوه بر تتراکلریدکربن، سطح ۳۰۰ میلی‌گرم عصاره گل همیشه‌بهار را دریافت کرده بودند نسبت به گروه کنترل منفی و غلظت ۱۵۰ همیشه بهار به‌صورت معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۵). در بررسی تغییرات هیستوپاتولوژی کبد، مشاهده شد که گروه کنترل مثبت از لحاظ وضعیت سیاهرگ مرکزی، هپاتوسیت‌ها، سینوزوئیدها و تریادپورت بیشترین میزان آسیب بافتی و گروه کنترل منفی کمترین میزان آسیب‌دیدگی را داشتند. اما تیمارهایی که همراه با تتراکلریدکربن، عصاره‌ی گل همیشه‌بهار را دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترل مثبت، بهبود بیشتری در بافت مشاهده شد (P<۰/۰۵). این نتایج نشان دهنده اثر حفاظتی عصاره گل همیشه‌بهار بر کبد می باشد که احتمالاً بواسطه فلاونویید های موجود در گیاه و توانایی آنها در مهار فعال سازی زیستی CCl4 و در نتیجه مهار فعالیت سیتوکروم P450 و اثر خنثی کنندگی رادیکال‌های آزاد می‌باشد.

کلمات کلیدی: تتراکلریدکربن، عصاره گل همیشه‌بهار، مسمومیت کبدیوجوجه گوشتی

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 109 pp: 60-69

The protective effects of marigold (*Calendula officinalis*) extract in liver damage by CCl4 in broiler chicken

By: Beheshti Moghaddam S. (Corresponding Author), Ph.D. Student, Sari University of Agricultural and Natural Resources Sciences; Kermanshahi H., Member of Scientific Board of Mashhad Ferdowsi University; Vahed, R., M.Sc., Mashhad Ferdowsi University.; Nasiri Moghaddam H., Member of Scientific Board of Mashhad Ferdowsi University.

Email: s_behdani86@yahoo.com

Received: September 2014 **Accepted: February 2014**

This experiment was conducted to determine the effects of Marigold Oil Extract (MOE) on blood parameters, immune system and livers of broiler chickens in a 42-day period. A total of 200 Ross 308 broiler chickens were allocated to five dietary treatments with four replicates of 10 birds each. The experimental treatments included a negative control group (basal diet without using any MOE and carbon tetrachloride, CCl4), a positive control group) CCl4(1 mg/kg BW) and basal diet without using any MOE (and three levels of MOE at 150, 300 and 450 mg/kg BW together with CCl4 and basal diet. Levels of blood parameters (SGOT و SGPT) increased, and MOE was able to reduce the negative effects of this toxic substance. When the broilers were 33 and 42 days old, the liver weights in treatments receiving various concentrations of MOE besides CCl4 were significantly lower than those in the treatment receiving CCl4. As for the indices related to immune system, the IgG level in the treatment receiving 300 mg/Kg of MOE in addition to CCl4 was significantly highercompard to the negative control and level of 150 mg/Kg of MOE . Examination of histopathological changes in the liver tissues revealed that the positive control group suffered the maximum tissue damage in the central vein, hepatocytes, sinusoids, and the triad port (the hepatic artery, the portal vein, and the bile ducts), while the negative control group exhibited the minimum tissue damage. However, treatments receiving MOE together with CCl4 showed greater recovery in the tissues compared to the positive control group. In conclusion,These results indicated the protective effects of MOE on the liver. These effects are probably due to the ability of the flavonoids found in this plant to suppress the bioactivation of CCl4 and, hence, to suppress the activity of Cyt P450, and due to the neutralization of free radicals by the flavonoids.

Key words: Carbon tetrachloride, Marigold extract, Liver toxicity, Broiler chickens

مقدمه

امروزه بیماری‌های کبدی یکی از مشکلات جدی و تهدیدکننده در سلامت جوجه‌های گوشتی می‌باشد. کبد ارگان مهمی است که به‌طور فعال در خیلی از فعالیت‌های متابولیکی دخیل است و یارها به‌وسیله عوامل سمی مورد حمله قرار می‌گیرد (Meyer and Kulkarni., 2001). بیماری کبد مسئله جهانی است و سندرم کبد و کلیه چرب (FLKS)، یک بیماری متابولیکی در طیور است که ممکن است در نتیجه اختلالات تغذیه‌ای و متابولیکی رخ دهد. امروزه در جهان علم و تحقیق‌های پزشکی، دامپزشکی و زیست‌شناسی تتراکلریدکربن جایگاه ویژه‌ای به‌عنوان شناخته‌شده‌ترین عامل هپاتوتوکسیک در مدل‌های تجربی آسیب کبدی به خود اختصاص داده است و بیش از صدها پروژه‌ی تحقیقاتی در حیوانات مختلف آزمایشگاهی نظیر موش و خرگوش با استفاده از این ماده‌ی هپاتوتوکسیک صورت گرفته است (Jordan., 1992). تتراکلریدکربن به‌عنوان یک عامل هپاتوتوکسین قوی از طریق تغییر در نفوذپذیری پلاسما و غشا میتوکندری، به‌صورت مستقیم باعث اختلال در سلول‌های کبدی می‌شود (Manibusan et al., 2007; Shi et al., 1998). تعدادی از گیاهان به علت داشتن آنتی‌اکسیدان‌ها خاصیت محافظت کبدی دارند (Ulicna et al., 2003). اثر مثبت گیاهان دارای خاصیت محافظت کبدی بر آسیب‌های کبدی در مطالعات دیگر نیز تایید‌کننده این ادعاست (Harsh., 2005). گل همیشه‌بهار از خانواده کمپوزیته و یکی از گیاهان پراهمیت جنس کالندولا محسوب می‌شود که دارای چندین خاصیت دارویی‌ست (Muly et al., 2009). این گیاه با نام‌های معمول Marigold, Maribud, Pot Marigold و Zergul شناخته می‌شود (Basch et al., 2006). گل همیشه‌بهار دارای ترکیبات بسیاری از جمله ساپونین‌ها، فلاوونوییدها، گلیکوزیدها، رزین و ترکیبات استروییدی می‌باشد (pietta et al.,1992; Azzaz et al., ۲۰۰۹). اثرات ضد ویروسی، ضدتوموری، آنتی موتاژنی وآنتی‌اکسیدانی گل همیشه بهار مشخص شده است اما در حال حاضر یکی از مهم‌ترین استفاده‌های این گیاه در درمان بیماری‌های پوستی و التهابی می‌باشد (Basch et al., 2006; Fronza et al., 2009). فاز روغنی استخراج شده از گل همیشه‌بهار دارای اثرات ضدمیکروبی می‌باشد و یا داشتن پتانسیل بسیار بالا در مهار واکنش‌های رادیکال آزاد، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی می‌تواند در صنعت آرایشی و بهداشتی مؤثر واقع شود (Kasprzyk et al.,1968; Brenes and Roura.,

www.SID.ir

Archive of SID

2010). گل و برگ‌های این گیاه بخش‌های اصلی دارای اهمیت تجاری و دارویی هستند. مشخص شده است که عملکرد TNF_آلفا (فاکتور نکروزه شدن تومور) تولید شده توسط ماکروفاژها، بوسیله‌ی عصاره گل همیشه‌بهار مهار شده است. عصاره‌ی این گیاه در برابر مسمومیت کبدی حاد ناشی از تتراکلریدکربن و سمیت کلیوی ناشی از سیس‌پلاتین در موش اثرمحافظتی داشته است و مکانیسم احتمالی عمل عصاره همیشه‌بهار به‌علت فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش رادیکال‌های آزاد است (Preethi and Kuttan., 2009). این ویژگی‌ها می‌تواند دلیلی بر مورد ارزیابی قرار دادن این گیاه برای این اثرات دارویی باشد. بنابراین هدف ازانجام این آزمایش بررسی اثرات سطوح مختلف عصاره روغنی گل همیشه‌بهار بر وزن کبد، آنزیم‌های کبدی، سیستم‌ایمنی و تغییرات هیستوپاتولوژی بافت کبد در جوجه‌های گوشتی درگیر شده با تتراکلریدکربن می‌باشد.

مواد و روش کار

جهت انجام این آزمایش ۲۰۰ قطعه جوجه گوشتی نر سویه راس ۳۰۸ از جوجه‌کشی تجاری خریداری شدند و پس از توزین به‌طورتصادفی در ۲۰ پن (جایگاه بستری)، به‌صورت پنج گروه ۱۰ قطعه‌ا ی با چهار تکرار داخل پن‌ها قرار داده شدند تیمارهای آزمایشی شامل گروه کنترل منفی (خوراک پایه فاقد افزودنی عصاره گل همیشه‌بهار و تتراکلریدکربن)، کنترل مثبت{خوراک پایه و (تتراکلریدکربن (یک میلی‌گرم‌برکیلوگرم‌وزن-بدن)} و سه تیمار دیگر شامل سطوح ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم درکیلوگرم جیره غذایی عصاره‌گل‌همیشه‌بهار به‌همراه تتراکلریدکربن بود. تتراکلریدکربن استفاده شده در این آزمایش طبق توصیه شرکت سازنده و مقالات مورد مطالعه به جیره اضافه شد (Rusu et al., 2005; Chinnasamy et al., 2011). به‌طوری‌که تتراکلریدکربن به‌عنوان یک عامل متداول درگیرکننده‌ی کبد جوجه‌های گوشتی، به‌میزان یک میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و تعداد چهار بار در طول دوره‌ی پرورش (روز ۲۱، ۲۴، ۲۷ و ۳۰) به‌صورت داخل صفاقی به پرندگان تزریق شد. قابل ذکر است که برای یکسان بودن شرایط استرس ناشی از تزریق، به گروه کنترل منفی در طول این مدت کلریدسدیم ۰/۹٪ (یک‌میلی‌گرم‌برکیلوگرم وزن بدن) تزریق شد (Basavaraj et al., 2011). عصاره‌ی روغنی گل همیشه‌بهار از شرکت دارویی زردبند تهران خریداری شد. بخش مورد استفاده این گیاه گلبرگ‌های آن بود که ازطریق هضم گل‌هادر روغن آفتابگردان(به میزان ۲۰۰ گرم گل خشک در ۱ کیلوگرم روغن)، در دمای معمولی عصاره تهیه شد. جهت تغذیه جوجه‌ها از سه جیره آغازین (۱۰-۰روزگی)، رشد (۲۴-۱۱روزگی) و پایانی (۴۲-۲۵روزگی) استفاده شد. احتیاجات غذایی جوجه‌های گوشتی طبق توصیه‌های شرکت راس (۲۰۰۹) تأمین شد.ترکیب اقلام خوراکی مورد استفاده براساس جداول (۱۹۹۴) NRC بدست آمد.محاسبه جیره با استفاده از نرم‌افزار UFFDA [1] انجام شد. ترکیب و اجزای تشکیل‌دهنده جیره‌های آزمایشی در جدول یک ارایه شده است. طی دوره پژوهش آب و خوراک به صورت آزاد در اختیار جوجه‌ها قرار داده شد. جیره‌های آزمایشی از یک روزگی در جیره اعمال شده است. تمام جیره‌های استفاده شده برای تیمارهای مختلف از نظر انرژی قابل متابولیسم، پروتئین و درصد کلسیم و فسفر قابل دسترس و سدیم و همچنین تعادل الکتریکی کاملا مشابه بودند. حرارت مورد نیاز سالن به‌وسیله هیتر و به صورت خودکار تأمین شد. نوردهی مداوم در تمام طول مدت آزمایش استفاده شد. درجه حرارت در روز اول و هفته اول ۳۲ درجه سانتی‌گراد بود و بعد از آن هر هفته تا رسیدن به دمای ۲۲ درجه، ۳ درجه کاهش می‌یافت.

جمع‌آوری داده‌ها

و در سنین ۳۳ و ۴۲ روزگی، از هر تکرار یک قطعه جوجه با میانگین وزنی پن انتخاب شد و از سیاهرگ بال نمونه‌ی خون تهیه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد، سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سرم از خون جدا شد. نمونه‌های سرم بعد از جداسازی و انتقال به میکروتیوب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان ارزیابی پارامترها نگه‌داری شدند. مقادیر بیلی روبین، SGPT و SGOT سرم خون توسط دستگاه اتوآنالایزر (Bio Systems S. A. Costa Brava 30.08030 Barcelona, Spain) اندازه‌گیری شد. برای بررسی ایمنی هومورال و اندازه‌گیری پاسخ ایمنی علیه SRBC در روز ۲۸ آزمایش به دو جوجه از هر پن ۰/۵ سی‌سی محلول فوق در ماهیچه سینه تزریق شد. برای اندازه‌گیری پاسخ ایمنی اولیه و ثانویه علیه SRBC، در روزهای ۳۵ و ۴۲ آزمایش (۷ و ۱۴ روز پس از تزریق) از هر پن دو جوجه انتخاب و از ورید بال آن‌ها دو میلی‌لیتر خون گرفته شد و برای انجام تیتر IgM، IgT و IgG نمونه‌های خون به آزمایشگاه منتقل شدند. برای تعیین عیار پادتن تولید شده علیه SRBC از روش هماآگلوتیناسیون استفاده شد (این روش جهت ارزیابی پاسخ سرمی سیستم ایمنی پرنده به برخی از عفونت ها که عامل آن توانایی آگلوتینه کردن گلبول‌های قرمز را دارد، بر اساس Log_2 رقت‌های مورد آزمایش استفاده می‌شود) (Wegmann and Smithies., 1966). در سنین ۳۳ و ۴۲ روزگی از هر تکرار یک قطعه جوجه بر اساس متوسط وزن هر پن انتخاب، توزین و کشتار شدند. در مرحله کشتار مقادیر وزن کبد با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شدند. سپس با تقسیم وزن‌های حاصل بر وزن زنده، وزن نسبی آن‌ها محاسبه شد. لازم به‌ذکر است که به‌منظور حداقل کردن اثر وزن محتویات دستگاه گوارش و خالی ماندن آن حدود ۵ ساعت قبل از کشتار به جوجه‌ها گرسنگی داده شد. سپس به منظور انجام آزمایشات بافت شناسی، کبد در فرمالین ۱۰ درصد به مدت دو روز قرار داده شد. در طی این مدت دو بار فرمالین تعویض گردید، جهت آبگیری در ظرف حاوی اتانول با غلظت‌های مختلف (۵۰-۱۰۰ درصد) قرار گرفت. سپس توسط گزیلول شفاف‌سازی صورت پذیرفت و نهایتا در پارافین مایع ۶۰ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور گردید. برش‌های ۴-۵ میکرومتر از نمونه تهیه سپس توسط روش هماتوکسین-ایوزین جهت بررسی‌های میکروسکوپی رنگ‌آمیزی گردید (Wilkinson et al. 1972).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به‌دست آمده از پارامترهای مختلف با استفاده از نرم‌افزار Excel پردازش شدند و سپس جهت آنالیز آماری، داده‌های حاصل از این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (۲۰۰۷) و روش مدل‌های خطی عمومی (GLM) آنالیز شدند و میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن (Duncan., 1955)، در سطح احتمال پنج درصد ($P<0/05$) مقایسه شدند.

نتایج و بحث

وزن کبد

با توجه به جدول ۲، در ۳۳ روزگی، کمترین وزن نسبی کبد مربوط به

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱-ترکیب و اجزای تشکیل دهنده جیره های آزمایشی بر حسب درصد

اجزای جیره (٪)	دوره آغازین(۰ -۱) روزگی	دوره رشد(۲۴-۱۱) روزگی	دوره پایانی(۴۲-۲۵)روزگی
ذرت	۵۰/۱۹	۵۳/۴۳	۵۹/۲۸
کنجاله سویا	۴۰/۷۵	۳۶/۳۲	۳۱/۰۶
روغن	۴/۵۵	۶	۵/۷۶
دی کلسیم فسفات	۱/۶۸	۱/۷۲	۱/۶۰
سنگ آهک	۱/۳۰	۱/۰۷	۱/۰۴
نمک طعام	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۳۵
مکمل معدنی	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل ویتامینی	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
دی ال متیونین	۰/۳۲	۰/۳۰	۰/۲۶
ال لیزین	۰/۳۰	۰/۳۱	۰/۱۵
ترئونین	۰/۰۶	-	-
ترکیبات شیمیایی(٪)			
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/کیلوگرم)	۳۰۲۵	۳۱۵۰	۳۲۰۰
پروتئین	۲۲/۴۷	۲۱	۱۹
کلسیم	۱/۰۵	۰/۹۰	۰/۸۵
فسفر قابل دسترس	۰/۵	۰/۴۵	۰/۴۲
سدیم	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶
آرژنین	۱/۴۵	۱/۳۴	۱/۲۰
لیزین	۱/۴۳	۱/۲۴	۱/۰۹
متیونین	۰/۷۱	۰/۶۱	۰/۵۵
متیونین+سیستین	۱/۰۷	۰/۹۵	۰/۸۶
ترئونین	۰/۹۴	۰/۸۳	۰/۷۶
فیبر خام	۳/۹۱	۳/۷۱	۳/۴۷
چربی خام	۶/۵۲	۷/۷۲	۷/۶۸
سدیم	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶
توازن الکترولیت (mEq/kg)	۲۴۵	۲۲۵	۲۰۴

مکمل ویتامینه و مواد معدنی به ازای هر کیلوگرم جیره: ویتامین A، ۸۸۰۰ واحد بین‌المللی؛ کوله کلسیفرول، ۵۲۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین E، ۱۱ واحد بین‌المللی؛ ویتامین K۳، ۲/۲ میلی‌گرم؛ ویتامین B۲۱، ۰/۱۰ میلی‌گرم؛ تیامین،۱/۵ میلی‌گرم؛ ریبوفلاوین؛ ۴ میلی‌گرم؛ نیاسین ، ۵۳ میلی گرم؛ اسید فولیک، ۰/۵ میلی‌گرم؛ بیوتین، ۰/۵۱ میلی‌گرم؛ پیرودوکسین، ۲/۵ میلی‌گرم؛ اسید پنتوتنیک، ۸ میلی گرم؛ کولین کلراید، ۰۵ میلی‌گرم؛ بتائین، ۰۹۱ میلی‌گرم؛ روی، ۵۶ میلی‌گرم؛ منگنز، ۵۷ میلی‌گرم؛ سلنیوم، ۰/۲ میلی‌گرم؛ ید، ۰/۹ میلی‌گرم؛ مس، ۶ میلی‌گرم؛ آهن، ۵۷ میلی‌گرم.

www.SID.ir

Archive of SID

تیمار ۴۵۰ میلی‌گرم همیشه بهار و بیشترین وزن نسبی کبد مربوط به گروه کنترل مثبت بود($P<0/05$)؛ اما از نظر عددی اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. در ۴۲ روزگی، گروه کنترل مثبت و تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم همیشه بهاریا هم اختلاف معنی‌داری داشتند: به‌طوری که گروه کنترل مثبت دارای بیشترین و تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم همیشه بهاردارای کمترین وزن نسبی کبد بودند ($P<0/05$)؛ اما با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار نداشتند. آنتی‌اکسیدان‌ها نقش بسیار مهمی در محافظت اندام‌های داخلی بدن به‌ویژه قلب و کبد دارند (Aniya et al., 2005). گیاهان غنی از فلاوونوئید و ترکیبات فنولیک دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند (Saman and cook., 1996)؛ مشخص شده که اصلی‌ترین ماده مؤثره‌ی گل همیشه‌بهار فلاوونوئید است. فلاوونوئیدهای موجود در گل برگ‌های گیاه همیشه‌بهار اثر محافظت کبدی از خود نشان داده‌اند (Basavaraj et al., 2011). این نتایج در راستای پژوهش‌های Sadeghi و همکاران (۲۰۰۷)، می‌باشد، که گزارش کردند مکمل سازی جیره با عصاره‌ی گیاه بیلهر (Dorema and deans., 2000)، در موش صحرایی از افزایش وزن کبد ناشی از تتراکلریدکربن به‌میزان قابل توجهی جلوگیری کرد. نتایج این آزمایش هم نشان داده که عصاره‌ی این گیاه، اثر محافظت کبدی در برابر آسیب‌های ناشی از مصرف تتراکلریدکربن داشته است که احتمالاً در ارتباط با خاصیت آنتی-اکسیدانی ترکیبات موجود در این گیاه می‌باشد.

آنزیم‌های کبدی

نتایج مربوط به اثرتیمارهای آزمایشی بر آنزیم‌های کبدی موجود در سرم درجدول ۳ آورده شده است. مقدار بیلی‌روبین سرم خون و آنزیم‌های کبدی موجود در سرم SGPT وSGOT در ۳۳ روزگی در گروه کنترل مثبت نسبت به سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/05$). همانند

جدول۲- اثر سطوح مختلف عصاره گل همیشه بهار بر وزن نسبی کبد جوجه‌های درگیر شده با تتراکلرید کربن (نسبت به وزن لاشه (٪))

وزن نسبی کبد		
تیمار	۳۳ روزگی	۴۲ روزگی
A	۱/۴۶	۲/۶۸ ab
B	۱/۵۸	۳/۰۶ a
C	۱/۴۵	۲/۹۴ ab
D	۱/۴۶	۲/۶۱ b
E	۱/۳۲	۲/۷۲ ab
SEM	۰/۰۷	۰/۱۱
P-values	۰/۲۱۷	۰/۰۴۷

a-b تفاوت حروف بر روی اعداد هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی داری است.
SEM:خطای استاندارد میانگین P- value: سطح معنی داری
A: کنترل B:تتراکلریدکربن C: تتراکلریدکربن + ۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم خوراک عصاره گل همیشه بهار
D: تتراکلریدکربن + ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خوراک عصاره گل همیشه بهار
E: تتراکلریدکربن + ۵۴۰ میلی گرم در کیلوگرم خوراک عصاره گل همیشه بهار

۳۳ روزگی در پایان دوره پژوهش(۴۲ روزگی)، مقدار بیلی‌روبین سرم خون و آنزیم‌های خونی نشان‌دهنده آسیب کبدی (SGPT وSGOT)، که در اثر تزریق تتراکلریدکربن در گروه کنترل مثبت به‌صورت معنی‌داری افزایش یافته بود، در تیمارهای حاوی سطوح مختلف عصاره گل همیشه‌بهار و گروه کنترل منفی به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت ($P<0/05$). سلول‌های کبدی حاوی غلظت‌های بالایی از SGPT و SGOT هستند:SGPT در سیتوپلاسم و SGOT در میتوکندری سلول‌های کبدی وجود دارند (Wells., 1988). با تخریب سلول‌های کبدی آنزیم‌های فوق به پلاسما تراوش کرده، در نتیجه سطح آنزیم‌های کبدی در سرم بالا می‌رود (Drotman and Lawhorn., 1978). تغییرات ناشی از CC14، شبیه بیماری‌های کبدی مزمن ناشی از ویروس‌ها می‌باشد. CC14 توسط سیستم سیتوکروم P450 به رادیکال‌های آزاد تری‌کلرومتیل(CC13)، تبدیل می‌شود (Ferre et al., 2001 and Ven -kumar and Latha., 2002). رادیکال‌های آزاد حاصل از CC14 با تخریب غشای هپاتوسیت، باعث افزایش ترشح آنزیم‌های کبدی شده و همین عامل باعث می‌شود آنزیم‌هایی که در حالت طبیعی درون سیتوزول سلولی قرار دارند، وارد جریان خون شوند و افزایش فعالیت این آنزیم‌ها بیان‌گر میزان و نوع آسیب‌های کبدی است (Yang et al., 2005). در مطالعه حاضر مشخص گردید مکمل کردن جیره با عصاره گل همیشه بهار موجب حفاظت سلول‌های کبدی در برابر اثرات اکسیدکنندگی CC14 می‌شود. احتمالاً این اثر بواسطه وجود ترکیبات فلاونوئید در این گیا می باشد که در آزمایشات مختلفی وجود آنها به اثبات رسیده است. رادیکال های آزاد ناشی از متابولیسم CC14 همانند سایر رادیکال‌های آزاد از راه‌های مختلف (پراکسیداسیون لیپیدها، واکنش با DNA و پروتئین‌های غشایی)، موجب آسیب سلول می‌شوند (Baer-dubowska et al., 1998; Zaragoza et al., 2000) ترکیبات پلی فنلی، و بویژه فلاونوئیدها در مرحله نخست بر سیستم سیتوکروم P450 اثر مهارکنندگی داشته و از متابولیسم بیشتر CC14 جلوگیری می‌کنند و در نتیجه تولید رادیکال‌های آزاد کاهش می‌یابد (Cordova et al., 2002). این ترکیبات همچنین بواسطه خاصیت آنتی اکسیدانی قادر هستند رادیکال‌های آزاد موجود در محیط را خنثی کرده و از اثرات مخرب آنها جلوگیری بعمل آورند (Schuppn et al., 1999; Sun., 2000; Pyo et al., 2004)، ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدها همچنین می‌توانند سلول را در برابر تخلیه گلوتاتیون احیاء و با افزایش ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسید و کاتالاز) محافظت نمایند (Zix et al., 1997; Baer-dubowska et al., 1998). این پژوهش مطابق با یافته‌های (Preethi و Kuttan 2009) می‌باشد که گزارش کردند: عصاره یگیاه همیشه بهار در برابر سمیت کبدی حاد ناشی از تتراکلریدکربن و سمیت کلیوی ناشی از سیس‌پلاتین اثرمحافظتی داشته و مکانیسم عمل آن احتمالا به علت فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش رادیکال‌های آزاد می‌باشد. تتراکلریدکربن با ایجاد آسیب در سلول کبدی باعث افزایش غلظت بیلی‌روبین می‌شود (Jayasekhar et al., 1997; Sethuraman et al., 2003). در این پژوهش نیز عصاره گیاه همیشه بهار باعث کاهش غلظت بیلی روبین در مقایسه با تیمار کنترل مثبت شد.

سنجش ایمنی هومورال (تیتر SRBC)

داده‌های مربوط به ایمنی هومورال (تست SRBC) در جدول ۴ آورده

www.SID.ir

Archive of SID

شده است. نتایج حاصل از تزریق علیه SRBC در ۲۸ روزگی بیان‌گر این امر است که غلظت ایمنوگلوبولین‌های T و M اختلاف معنی‌داری را در تیمارها نشان نمی‌دهند؛ اما سطح ایمنوگلوبولین G در تیمار دارای غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم همیشه‌بهار نسبت به گروه کنترل و تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم همیشه‌بهار افزایش معنی‌داری داشت. نتایج حاصل از تزریق علیه SRBC در ۳۵ روزگی نشان می‌دهد سطح ایمنوگلوبولین‌های T و M اختلاف معنی‌داری در میان تیمارها ندارند؛ اما سطح ایمنوگلوبولین G در گروه کنترل نسبت به تیمار تتراکلریدکربن و تیمار ۴۵۰ میلی‌گرم همیشه‌بهار افزایش معنی‌داری داشت ($P<0/05$). آنچه که با یک نگاه اجمالی به نقش ترکیبات اکسیدان و ضد اکسیدان بر فعالیت سلول‌های سیستم ایمنی به نظر می‌رسد آن است که ترکیبات اکسیدان و ضد اکسیدان‌ها، هر دو، برای سیستم ایمنی حکم شمشیر دو لبه دارند، از یک طرف مشاهده می‌شود که عملکرد سیستم ایمنی ارتباط تنگاتنگی با تولید و آزاد سازی رادیکال‌های آزاد دارد و این ترکیبات فعال زیستی بایستی سریعا حذف شوند، از طرف دیگر ثابت شده است که ترکیبات فعال اکسیژن در وقایعی چون انتقال پیام از طریق غشا و نیز عرضه ژن‌های مهم در تکثیر و فعالیت سلول‌های ایمنی و نهایتا ایجاد پاسخ‌های ایمنی نقش حیاتی دارند. نتایج مطالعات متعددی نشان دهنده‌ی فعالیت مهاری ترکیبات ضد اکسیدان بر اثرات زیان آور رادیکال‌های آزاد هستند، علاوه بر

جدول ۳- اثر سطوح مختلف عصاره گل همیشه بهار بر آنزیم های کبدی جوجه های گوشتی درگیر شده با تتراکلریدکربن

	۳۲ روزگی			۴۲ روزگی		
تیمار	بیلی روبین (mg/dl)	SGPT (IU/L)	SGOT (IU/L)	بیلی روبین (mg/dl)	SGPT (IU/L)	SGOT (IU/L)
A	۰/۴۲ b	۲۰/۷۵ b	۱۹۷/۷۵ d	۰/۵۵ c	۲۳b	۲۴۸/۷۵ c
B	۳/۴ a	۳۰/۷۵ a	۲۹۵/۲۵ a	۳/۱۵ a	۳۳/۲۵ a	۳۴۹/۲۵ a
C	۱/۲۵ b	۲۳/۷۵ b	۲۶۹/۷۵ ab	۱/۵۰ b	۲۲/۲۵ b	۲۸۴/۵۰ b
D	۱/۰ b	۲۳/۲۵ b	۲۳۳ c	۰/۷۵ bc	۲۴b	۲۹۴/۲۵ b
E	۰/۵ b	۲۲/۵ b	۲۵۶/۷۵ bc	۰/۸۵ bc	۲۳b	۲۸۲/۲۵ b
SEM	۰/۱۰۷	۰/۵۲۹	۳/۴۳۶	۰/۲۴	۲/۰۷	۸/۷۳
P-values	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۱

a-d تفاوت حروف بر روی اعداد هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی داری است. SEM: خطای استانداردمیانگین P-value: سطح معنی‌داری A: کنترل منفی B:کنترل مثبت C: تتراکلریدکربن+ ۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم خوراک عصاره گل همیشه بهار D: تتراکلریدکربن+ ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خوراک عصاره گل همیشه بهار E: تتراکلریدکربن+ ۴۵۰ میلی گرم در کیلوگرم خوراک عصاره گل همیشه بهار SGPT:سرم گلوتامیک پیرووبیک ترانس آمیناز؛SGOT سرم گلوتامیک اگزالیک ترانس آمیناز

جدول ۴- اثر سطوح مختلف عصاره گل همیشه بهار در زمان های مختلف بر میزان ایمنوگلوبولین های سرم خون۱ در تزریق SRBC در جوجه های گوشتی درگیر شده با تتراکلریدکربن

	۲۸ روزگی			۳۵ روزگی		
تیمار/صفات	IgT (Log۲)	IgG (Log۲)	IgM (Log۲)	IgT (Log۲)	IgG (Log۲)	IgM (Log۲)
A	۴/۷	۱/۲b	۳/۵	۵/۵	۳a	۲/۵
B	۳/۷	۱/۵ab	۲/۲	۵/۷	۱/۲b	۴/۵
C	۵/۷	۱/۲b	۴/۵	۴/۵	۱/۵ab	۳
D	۷/۵	۲/۵a	۵	۵/۵	۱/۷ab	۳/۷
E	۴/۵	۱/۷ab	۲/۷	۵	۱/۲b	۳/۷
SEM	۰/۵۱	۰/۱۳	۰/۴۵	۰/۳۳	۰/۲	۰/۲۶
P-values	۰/۱۳۳	۰/۰۲۵	۰/۲۰۶	۰/۶۸۱	۰/۰۳۴	۰/۱۰۶

a-bتفاوت حروف بر روی اعداد هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی داری است. SEM:خطای استاندارد میانگین P-Value: سطح معنی داری

۱-میانگین اعداد در هر ستون تیتر IgT (Anti-SRBC)، IgG و IgM به صورت $\log_2$ معکوس کسر آخرین رقّت مشاهده شده آگلوتیناسیون است.

A: کنترل B:تتراکلریدکربن+ ۰۵۱ میلی گرم در کیلوگرم خوراک عصاره گل همیشه بهار D: تتراکلریدکربن+ ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خوراک عصاره گل همیشه بهار E: تتراکلریدکربن+ ۰۵۴ میلی گرم در کیلوگرم خوراک عصاره گل همیشه بهار

www.SID.ir

Archive of SID

این نشان داده شده است که برخی از ترکیبات ضداکسیدان از تولید ترکیبات اکسیدان مهم در روند فعال شدن سلول جلوگیری نموده و یا آن را از محیط عمل خارج می‌سازند و از این طریق باعث مهار تکثیر و فعالیت سلول‌های عامل سیستم ایمنی می‌شوند (پیش بین و همکاران ۱۳۸۱). چنانکه در تحقیقی اشاره می‌کنند که با افزایش فعالیت ضد اکسیدانی، تولید IgG و IgM در خون محیطی موش‌ها کاهش یافته است (Satoshi et al.,2004).گل همیشه‌بهار به دلیل دارا بودن ماده مؤثره‌ی فلاونویید توانسته از طریق بالا بردن سطح IgG، سیستم ایمنی هومورال را تقویت کند (Christak et al., 2004). به‌نظر می‌رسد عصاره برخی گیاهان از طریق افزایش تیتر آنتی‌بادی موجب افزایش ایمنی بدن گردیده و احتمال داده شده که این عصاره‌ها از طریق اثر بر لمفوسیت‌های زیر مخاطی دستگاه گوارش و تحریک ایمنی موضعی موجب افزایش فاکتورهای ایمنی هومورال گردند (Shams Gh-farokhi et al., 2003). این نتایج با یافته‌های عبداللهی و همکاران همخوانی دارد (Abdollahi et al., 2002). هم‌چنین محققین دیگر گزارش کردند که برخی عصاره‌های گیاهی موجب افزایش تیتر آنتی‌بادی در بدن مرغ و بوقلمون می‌شوند (Hernandez et al.,2004).

تغییرات هیستولوژی کبد

عوامل مورفولوژیک مورد بررسی در این مطالعه شامل: تغییرات سیاهرگ مرکزی، هپاتوسیت‌ها، سینوزوئیدها و تریادپورت (سرخرگ کبدی، سیاهرگ پاب و مجاری صفراوی)، می‌باشند. همان‌طور که در شکل (۱-۱) نشان داده شده است، در گروه کنترل منفی، سیاهرگ مرکزی حالت طبیعی داشته، سینوزوئیدها به‌وضوح قابل مشاهده‌اند و سلول‌های کبدی (هپاتوسیت‌ها) دارای ظاهری سالم بوده و هسته‌ها به وضوح قابل رؤیت می‌باشند. در گروه کنترل مثبت، پارانشیم کبدی نظم خود را از دست داده، برخی سلول‌ها به‌طور کامل تخریب شده و در بیشتر سلول‌ها حفرات بزرگ و کوچک مشاهده می‌شوند. سینوزوئیدها حالت چروکیده پیدا کرده و سیاهرگ مرکزی حالت نامنظم پیدا کرده است. در گروه دریافت کننده عصاره گل همیشه‌بهار+تتراکلریدکربن، برخی سلول‌های کبدی از بین رفتند که این میزان نسبت به گروه کنترل مثبت کمتر است و بافت کبد ظاهری دانه مانند دارد. سینوزوئیدها حالت چروکیده دارند و سیاهرگ مرکزی تا حدودی از حالت غیرطبیعی خارج شده است. در قسمت تغییرات تریاد همان‌طورکه در شکل (۱-۱) مشاهده می‌شود، در گروه کنترل منفی سیاهرگ پاب، مجرای صفراوی و سرخرگ کبدی ظاهری سالم دارند و لایه‌ای منظم از سلول‌های کبدی آن‌ها را احاطه کرده است.

تغییرات هیستولوژی کبد

عوامل مورفولوژیک مورد بررسی در این مطالعه شامل: تغییرات سیاهرگ مرکزی، هپاتوسیت‌ها، سینوزوئیدها و تریادپورت (سرخرگ کبدی، سیاهرگ پاب و مجاری صفراوی)، می‌باشند. همان‌طور که در شکل (۱-۱) نشان داده شده است، در گروه کنترل منفی، سیاهرگ مرکزی حالت طبیعی داشته، سینوزوئیدها به وضوح قابل مشاهده‌اند و سلول‌های کبدی (هپاتوسیت‌ها) دارای ظاهری سالم بوده و هسته‌ها به وضوح قابل رؤیت می‌باشند. در گروه کنترل مثبت، پارانشیم کبدی نظم خود را از دست داده، برخی سلول‌ها به طور کامل تخریب شده و در بیشتر سلول‌ها حفرات بزرگ و کوچک مشاهده می‌شوند. سینوزوئیدها حالت چروکیده پیدا کرده و سیاهرگ مرکزی حالت نامنظم پیدا کرده است. در گروه دریافت کننده عصاره گل همیشه بهار + تتراکلریدکربن، برخی سلول‌های کبدی از بین رفتند که این میزان نسبت به گروه کنترل مثبت کمتر است و بافت کبد ظاهری دانه مانند دارد. سینوزوئیدها حالت چروکیده دارند و سیاهرگ مرکزی تا حدودی از حالت غیرطبیعی خارج شده است. در قسمت تغییرات تریاد همان طورکه در شکل (۱-۱) مشاهده می‌شود، در گروه کنترل منفی سیاهرگ پاب، مجرای صفراوی و سرخرگ کبدی ظاهری سالم دارند و لایه‌ای منظم از سلول‌های کبدی آن‌ها را احاطه کرده است. در گروه کنترل مثبت، CCl4 باعث از بین بردن سلول های احاطه کننده مجرای صفراوی، سرخرگ کبدی و سیاهرگ پاب شده است. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود، لکوسیت‌ها به داخل سیاهرگ پاب نفوذ کرده که به صورت دانه‌های پنقش در سیاهرگ قابل رؤیت‌اند. در گروه حاوی عصاره گل همیشه بهار + تتراکلریدکربن تا حدودی آرایش سلولی احاطه کننده مجرای صفراوی حالت منظم خود را به دست آورده‌اند: از طرفی ظاهر دانه مانند در سیاهرگ پاب از بین رفته است. در تحقیقی که Kumar و همکاران (۲۰۰۹)، انجام دادند، نشان دادند که CCl4 اثر تخریبی روی کبد داشته به گونه‌ای که سلول‌های احاطه کننده سیاهرگ مرکزی تخریب شدند.تزریق CCl4 باعث مسمومیت کبدی در موش شده به طوری که با مشاهده بافت کبد، واکوئول‌هایی در مرکز لوبول کبد دیده شده، هم چنین تجمع چربی و نکروز سلول کبدی نیز گزارش شده است (Ronjohns., 2009). برخلاف موش، کبوترهای دریافت کننده CCl4 مستعد نکروزه شدن کبد در ۲۴ ساعت پس از تزریق CCl4 نیستند: ولی سایر تغییرات بیوشیمیایی، از قبیل کاهش فعالیت گلوکز ۶ فسفاتاز، کاهش محتوی سیتوکروم P450 و کاهش فعالیت آمینوپیرین ان دمتیلاز در میکروزوم‌های کبد کبوتر در سه و شش ساعت پس از تزریق مشاهده شده است. کبد کبوتر توانایی فعال کردن CCl4 به متابولیت‌های فعالی که با لیپیدها پیوند کووالانسی برقرار می‌کند را دارد، ولی در زمان‌های یک، سه و شش ساعت پس از تزریق پراکسیداسیون لیپید مشاهده نشده است. پیشنهاد شده است که پیوند کووالانسی متابولیت‌های فعال تتراکلریدکربن با برخی تغییرات بیوشیمیایی همراه است که نشان دهنده‌ی حساسیت پایین کبد کبوتر در مقابل پیوندهای کووالانسی در سایر گونه‌های آزمایشی است (Fernandez et al., 1984). Shimizu همکاران (۲۰۰۱)، نیز طی انجام آزمایشاتی اثر تخریبی CCl4 بر روی بافت کبد را گزارش کردند به طوری که ساختارهای حباب مانند در اطراف سیاهرگ مرکزی و حباب‌های چربی در ناحیه میانی و برخی سلول‌های کبدی را مشاهده کردند، هم چنین سلول‌های نکروزه و سلول‌های ملتهب اطراف سیاهرگ مرکزی دیده شد. مطالعات نشان می‌دهد که در جوندگان، احیای سلول‌های کبدی پس از آسیب دیدن با کمک رشد سریع سلول‌های اپیتلیالی که دارای هسته‌های بیضوی مشخص هستند، صورت می‌گیرد (Sell., 1990). Adzet و همکاران (1987)، بیان کردند: ترکیباتی مانند سینارینولوتئولین و دیگر ترکیبات فنولیکی از قبیل اسید کافئیک و اسید کلروژنیک که در عصاره برخی گیاهان دارویی مانند کنگرفرنگی و گل همیشه بهار یافت می‌شود، ممکن است در پتانسیل حفاظت کبدی آن‌ها نقش داشته باشد. با توجه به اثرات مثبت عصاره روغنی گل همیشه بهار بر وزن کبد ، افزایش سطح IgG ،

www.SID.ir

Archive of SID

کاهش نشـت آنزیم‌های درون سـلولی کبـد (SGPT و SGOT) و تاثیرات مثبت بر هیسـتوپاتولوژی بافت کبد می تـوان ابراز کرد که عصاره¬ی این گیاه اثر محافظت کبدی در برابر آسیب‌های ناشی از مصرف تتراکلریدکربن داشته است که این اثر احتمالاً در ارتباط با خاصیت آنتی‌اکسیدانی فلاونویید های موجود در این گیاه می‌باشد.

پاورقی‌ها

1-User Friendy Feed Formulation Done Againl

2- سرم گلوتامیک پیرورویک ترانس آمیناز

3 - سرم گلوتامیک اگزالیک ترانس آمیناز

4 - Sheep red blood cells

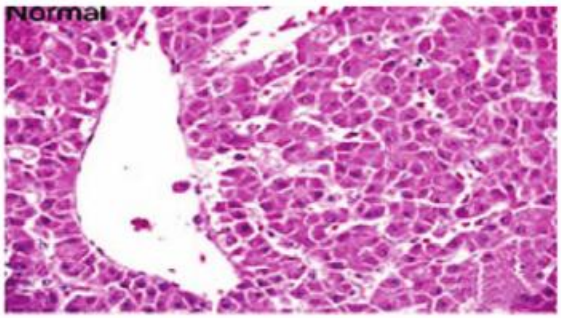
منابع مورد استفاده

۱ - پیش بین، ش.، خوانساری، ن. و شایگان، م. ۱۳۸۱. بررسی ارتباط بین قدرت آنتی اکسیدانی تام پلاسما و دو عملکرد سیستم ایمنی (پاسخ تکثیری لنفوسـیت‌ها و حرکت هدف دار نوتروفیل ها). مجله دانشـکده دامپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، شماره ۵: صفحات ۳۵۴ تا ۳۶۳,۷۲.

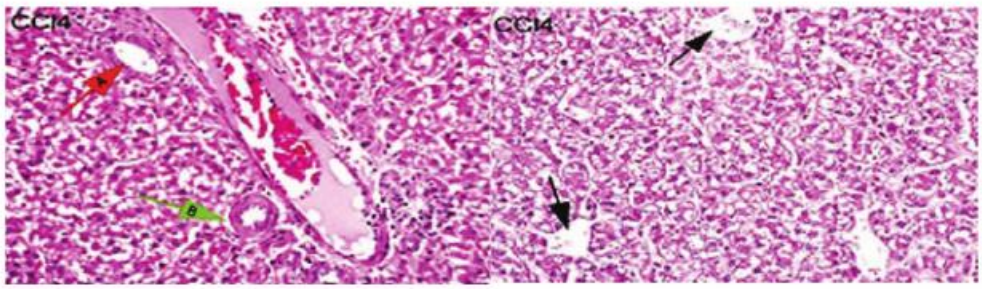
2-Abdollahi, M.R., Kamyab A, Bazzaz zadekan A, Nik-Khah,A and Zare ShahnehA.Z. 2002. Effect of different levels of Timus oil on broiler performance. Int J poult. Sci. 5(2): 156-161.

3-Adzet, T., Camarasa, J and Laguna, J.C. 1987. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from Cynarascolymus against CCL4 toxicity in isolated rat hepatocytes. Natural. Pro. 50: 612-617.

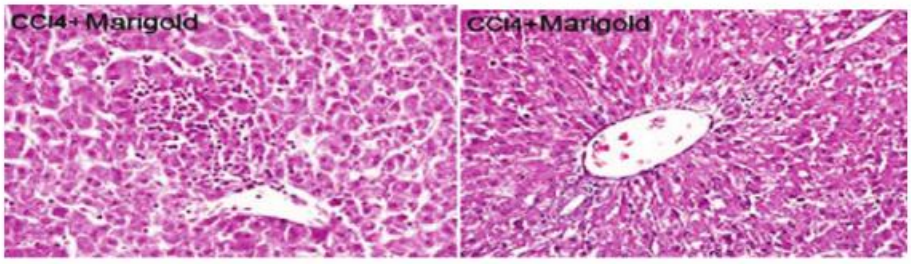
4-Aniya, Y., Koyama, T., Miyagi, C., Miyahira, M., Inomata, C., Kinoshita, S. 2005. Free radical scavenging and hepatoprotective actions of medicinal herbs, *Crassocephalum crepidioides* from the Okinawa Islands. Bio. Pharm. Bull. 28: 19-23.



نرمال- ساختار سلول‌های کبدی و سیاهرگ مرکزی نشان داده شده است



تتراکلرید کربن- مجرای صفراوی (پیکان قرمز) و سرخرگ کبدی (پیکان B) در کنار سیاهرگ کبدی(ساختار تریاد) و سیاهرگ مرکزی (پیکان A)نشان داده شده است؛ در این شکل تخریب سلول های کبدی به خوبی نشان داده شده است



گل همیشه بهار+تتراکلرید کربن: بهبود نسبی سلول های کبدی نشان داده شده است.

شکل ۱- تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت کبد (بزرگ نمایی ± ۴۳۰×)

www.SID.ir

Archive of SID

5-Avigen. 2009. Ross 308 broiler manual. http://en.aviagen.com/ross-308/.

6-Azzaz, N.A., Hassan, E. A., Emarey, F. A. 2009. Physiological, anatomical, and biochemical studies on pot marigold (*Calendula officinalis* L.) plants. African. Crop. Sci. 8:1727-1738.

7-Baer-Dubowska, W., Szaefer, H. and Krajka- Kuzniak, V. 1998. Inhibition of murin hepatic cytochrom P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. Xenobiotica. 28:735-743.

8-Basavaraj, V.C., Karnakumar, V.B.and Rajabhau, S.Sh. 2011. Evaluation of Hepatoprotective Activity of Flowers of "Tagetes erecta linn". Int. J. Pharm & Bio. 2:692-695.

9-Basch, E., Bent, S., Foppa, I., Haskmi, S., Krol, D., Mele, M., Szapary, P., Ulbricht, C., Vora, M. and Yong, S. 2006. Marigold (*Calendula officinalis* L.): An evidence-based systematic reviewby the natural standard research collaboration, J. Herb. Pharmacother, 6(3-4) 135.

10-Boll, M., Weber, L. W. D., Becker, E. and Stampfi, A. 2001. Mechanism of carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. Hepato-cellular damage by reactive CCL4 metabolites Zei. Nat. J. 56: 649-659.

11-Brenes, A and Roura, E. 2010. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. Anim. Feed Sci. &Tech. 158: 1-14.

12-Chalchat, J.C., Garry, R. P., Michet, A. 1991. Chemical composition of essential oil of *Calendula officinalis* L. (pot marigold). Flav. & Frag. J. 6(3): 189–192.

13-Chinnasamy, S., Murugan, R., Rathinasamy, P., Ganesan, K. 2011. Hepatoprotective Effect of Herbitars, A Polyherbal Formulation Against CCL4 Induced Hepatotoxicity in Rats. J. Pharm. Res. 4(3): 676-679.

14-Christake, E., Paneri, v., Giannenas, I., Papazahariadou, M., Botsoglou, N.A and. Spais, A.B. 2004. Effect of mixture of herbal extract on broiler chicken infected with *Eimeria tenella*. Anim. Res. 53: 137-144.

15-Cordova, C.A., Siqueira, I.R., Netto, C.A., Yunes, R.A., Volpato, A. 2002. Protective properties of butanolic extract of the Calendula officinalis L. against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. Redox. Rep. 7: 95-102.

16- Drotman, R.B. and Lawhorn, G.T., 1978. Serum enzymes as indicators of chemical-induced liver damage.Drug & Chem. Toxi. 1: 163–171.

17-Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F tests, Biometrics. 11: 1 – 42

18-Fernandez, G., Villarruel, M. C., De Ferreyra, E. C., De Fenos, O., Mbernacchi, A. S., De Castro, C. R and Castro, J. A. 1984. Carbon tetrachloride-induced early biochemical alterations but not necrosis in pigeon's liver. Inf. Res. 15: 463-466.

19-Ferre, N., Camps, K., Cabre, M., Paul, A. 2001.Hepatic paraoxygenase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. Met. J. 50: 997-1000.

20- Fronza, M., Heinzmann, B., Hamburger, M., Laufer, S., Merfort, I. 2009. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. J. Ethn. 126(3): 463-7.

21-Fossati P and Lorenz P. 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. J. Clin. Chem. 28: 2007.

22-Guinot, P., Gargadennec, A., Valette, G., Fruchier, A., Andary, C. 2008. Primary flavonoids in marigold dye: extraction, structure and involvement in the dyeing process. Phyt. Annal. 19(1): 46-51.

23-Harsh, M. 2005.Text book of Pathology. 5Th. New Delhi; Jaypee Brothers. 608-610.

24- Jayasekhar, P., Mohanan, P. V., Rathinam, K. 1997. Hepatoprotective activity of ethyl acetate extract of *Acacia catechu*. Ind. J. Pharm. 29: 426-8.

25-Havel, R. J. 1986. Functional activities of hepatic lipoproteins receptors.Annu. Rev. Phys. 48: 119-134.

26-Hernandez, F., J. Madrid, V. Garcia, J. Orengo and M. D. Megias. 2004. Influence of two plant extracts on broiler performance, digestibility and digestive organ size. Poult. Sci. 83: 169-174.

27-Jayasekhar P, Mohanan PV, Rathinam K .1997. Hepatoprotective activity of ethyl acetate extract of Acacia catechu. Indian Journal Pharmaceutical.29: 426-428.

28-Jordan FTW, Pattison M. 1992. Poultry disease 4th edition. W.B. Sauder company ltd London. 169-171.

29- Kassab, S., Cummings, M., Berkovitz, S., van, H. R., Fisher, P. 2009. Homeopathic medicines for adverse effects of cancer treatments. Coch. Data. Syst. Rev. 15(2): CD004845.

30- Kasprzyk, Z., Pyrek, J. 1968. Triterpenic alcohols of *Calendula officinalis* L. flowers Phytochemistry. J. Anim. Sci. 7(9): 1631-1639.

31- Kumar, S. S., Kumar, B. R. and Mohan, G. K. 2009. Hepatoprotective effect of *Trichosanthes cucumerina* Var cucumerina L. on carbontetrachloride induced liver damage in rats. J. Ethn.123: 347–350.

32- Lin, L.T., Liu, L.T., Chiang, L.C., Lin, C.C. 2002. In vitro anti-hepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada. Phyto. Res. 16: 440-444.

33- Meyer, S.A. and Kulkarni, A.P. 2001. Hepatotoxicity. In: Introduction to biochemical toxicology. New York. John. 487.

34- Muley, B.P., Khadabadi, S.S., Banarase, N.B. 2009. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calen-*

www.SID.ir

Archive of SID

dula officinalis L. Rev. Trop. J. Pharm. Res. 8: 455-465.

35- Pietta, P., Bruno, A.M.P., Rava, A. 1992. Separation of flavonol-2-O-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography. J. Chrom. 593: 165-170.

36- Preethi, K.C and Kuttan, G. 2009. Antiinflammatory activity of flower extract of Calendula officinalis Linn. And its possible mechanism of action. Ind. J. Exp. Bio. 47: 113-120.

37- Pyo, Y.H., Lee, T.C., Logendra, L. and Rosen, R.T. 2004. Antioxidant activity and phenoliccompounds of Swiss chard (Beta vulgaris subspecies cycla) extracts.Food Chemistry. 85. 19-26.

38- Reitman S and Frankel S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic transminase and serum glutamic pyruvic transaminase. American. J. Clin. Path. 20: 56-59.

39- Rios, J.L., Recio, M.C., Máñez, S., Giner, R.M. 2000. Natural triterpenoids as anti inflammatory agents. Studies in Natural Products Chemistry. 22(3): 93- 143.

40- Robjohns, S. 2009. Carbon tetrachloride toxicological overview. J. Health Pro. Agen. 1-11.

41- Rusu, M. A., Tamas, M., Puica, C. 2005. Ioana Roman and Mihaela Sabadas. The Hepatoprotective Action of Ten Herbal Extracts in CCL4 Intoxicated Liver.Phyt. Res. 19: 744–749.

42- Sadeghi, H. Ghaitasi, E. Mazrooghi, N. Sabzali, S. 2007. The hepatoprotective effects of dorema auchri on carbon tetrachloride induced liver damage in rats. J shahrekord univ med sci. 9: 38-43

43- Saman, S. and Cook, N.C. 1996. Flavonoids chemistry, metabolism, cardio protective effects, dietary sources. J. Nut. Bio.7: 66-76.

44- Sadeghi H, Ghaitasi E, Mazrooghi N, Sabzali S .2007. The hepatoprotective effects of dorema auchri on carbon tetrachloride induced liver damage in rats. J shahrekord university of medical science journal. 9: 38-43.

45- SAS (Statistical Analysis System). 2001. SAS/STAT® 8.0. User's guide. SAS Institute Inc. Cary, NC.

46- Satoshi, M., Kiyoto, S., Hiroe, M., Makoto, I., Takenori, Y., Torao, I. and Yeunhwa, G.U.2004. Antioxidant and immune enhancing of *Echinacea purpurea*. Biol Pharmaceut Bull. 27: 1004-1009.

47- Sell, S. 1990. Is there a liver stem cell.Cancer Res. 50: 3811.

48- Sethuraman, M. G., Lalitha, K.G., Rajkapoor, B. 2003. Hepatoprotective activity of *Sarcostemma brevistigma* against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. Curr. Sci. 84: 1186-7.

49- Schuppan, D., Jia, J. D., Brinkhaus, B. and Hahn, E. G. 1999. Herbal products for liver diseases. J. Hepatology. 30(4): 1099-1104.

50- Shams Ghafarokhi, M., Razafsha, M.,Allameh, A. and Razzaghi Abyaneh, M. 2003. Inhibitory effect of Aqueous Onion and Garlic Extracts on growth and keratinase activity in trichophyon Mentagro phytes.J. Irn. Biomed. 7: 113-118.

51- Shimizu, H., Uetsuka, K., Nakayama, H. and Doi, K. 2001. carbontetrachloride-induced liver acute liver injury in Mini and Wister rats. J. Exp. & Tox. Path. 53(1): 11-17.

52- Sun, F.. 2000. Evaluation of oxidative stress based on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apoptosis and necrosis caused by thioacetamide in rat liver. Biochimica et Biophysica Acta ,1500: 181-185.

53- Takahashi, K., Mashiko, T. and Akiba, Y. 2000. Effects of dietary concentration of xylitol on growth in male broiler chicks during immunological stress. Poult. Sci. 79: 743-747.

54- Ulicna, O., Greksak, M., Vancova, O., Zlatos, L., Galbavy, S. and Bozek, P. 2003. Hepatoprotective effect of Roobos tea (*Aspalathus linearis*) on CCL4 induced liver damage in rats. J. Phys. Res. 52: 461-466.

55- Venukumar, M.R., Latha, M.S. 2002. Hepatoprotective of the methanolic extract of *Curculigo orchioides* in CCL4-treated male rats. Ind. J. Pharm. 34: 269-75.

56- Wilkinson JH, Baron DN, Moss DW, Wolter PG. 1972. Standardization of clinical enzyme assays: Reference method for aspartate and alanine transaminase. J. Clin. Path. 25: 940.

57- Wegmann, T. and Smithies, O. 1966. A simple hemagglutination system requiring small amounts of red cells and antibodies. J. Transfusion. 6:67-75.

58- Wells, F. E. 1988.Tests in liver and biliary tract disease. In: Gowenlock, H. A. (Ed.), Varley's Pract. Clin. Bio. CRC Press, Florida.

59- Wilkinson JH, Baron DN, Moss DW, Wolter PG. 1972. Standardization of clinical enzyme assays: Reference method for aspartate and alanine transaminase. J.Clin. Path. 25: 940.

60- Wolf, P. L. 1999. Biochemical diagnosis of liver disease. J. Clin. Bio. 14: 59-64.

61- Yang, H., Lee, M.K., Kim, Y.C. 2005. Protective activities of stilbene glycosides from Acermono leaves against H_2O_2-induced oxidative damage in primary cultured rat hepatocytes. J. Agri. Food Chem. 53: 4182-6.

62- Zaragoza, A., Andres, D., Sarrion, D. and Cascales, M. 2000. Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by Phenobarbital pretreatment in rats, inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. Chemico-Biological Interactions. 124: 87-101.

63- Zix, M.H. and Agarwal, R. 1997. Novel cancer chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin. Biochm. Biophys. Res. Commun., 239: 334-339.

64-Zlatkis A, Zak B, and Boyle AJ. 1953. A new method for the direct determination of serum cholesterol. J.Clin. Med. 41: 486-492.

www.SID.ir