



Scan online to view this article

Investigation of Anti-diabetic and Liver protective Effects of Kombucha syrup on Streptozotocin induced male wistar mice

Amir Arasteh *, Hanieh Shirghasemi Alalan, Seyedeh Negar Mousavi Jolandan, Saeed Veisi, Reza Baghban Khosro Abadi, Seyedeh Narges Naeemi

Young researcher and elite club, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Abstract

Aim and Background: Diabetes is one of the most serious health problems in today's society. Also, therapeutic theories are problematic for general liver diseases such as cirrhosis, fatty liver and chronic hepatitis. Low effect of drugs in many patients has made it inevitable to examine and find other treatments. Current study, examines the anti-diabetic and liver protective effects of Kombucha syrup in wistar male rats.

Materials and Methods: The composition of fresh Kombucha syrup was evaluated after 7 days of fermentation with GC-MS and its anti-oxidant activity by DPPH method. The mice were divided into five groups and in order to investigation of anti-diabetic and liver protective effects, test groups obtained daily 2 and 4 ml/kg of Kombucha syrup orally for 14 and 32 days, respectively. Blood sugar levels by glucometer and liver enzymes were measured by parsazmoon company kits. The results were analyzed using Student's T-Test and ANOVA using SPSS software version 22.

Results: Kombucha syrup with 12.66% glucuronic acid and 4.57% ethanol has anti-oxidant properties. The highest anti-oxidant property was reported at 89.58%. Blood sugar levels in first and second test groups (160 and 112 mg/dl) showed a significant decrease compared to the negative control group (436 mg/dl). The activity of liver enzymes in the first and second test groups also showed a significant decrease compared to the negative control group.

Conclusion: Kombucha syrup, with its high anti-oxidant properties, has beneficial effects in managing diabetes and maintaining the health of liver cells against toxic compounds.

Key words: Diabetes, liver protective, Kombucha syrup, streptozotocin

Corresponding author:

Young researcher and elite club, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Email: arasteh@iaurasht.ac.ir



برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

بررسی اثرهای ضد دیابتی و محافظت کبدی شربت کامبوچا در موش های نر ویستار دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

امیر آراسته*، هانیه شیرقاسمی آلالان، سیده نگار موسوی جولدان، سعید ویسی، رضا باغبان خسرو آبادی، سیده
نرگس نعیمی

باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

چکیده

سابقه و هدف: امروزه دیابت یکی از مشکل های جدی در سلامت جوامع است. هم چنین، نظریه های درمانی برای بیماری های
عمومی کبد مثل سیروز، کبد چرب و هیپاتیت مزمن مسئله ساز هستند. تأثیر کم داروها در بسیاری از بیماران، نیاز به بررسی و
یافتن راه های دیگر درمانی را اجتناب ناپذیر ساخته است. پژوهش حاضر به بررسی اثر ضد دیابتی و محافظت کبدی شربت کامبوچا
در موش های نر نژاد ویستار پرداخته است.

مواد و روش ها: ترکیب های شربت کامبوچای تازه پس از ۷ روز تخمیر با کروماتوگرافی گازی-طیفسنجی جرمی و فعالیت
آنتی اکسیدانی آن با روش DPPH بررسی شد. موش ها به پنج گروه تقسیم شده و گروه های آزمون برای بررسی اثرهای ضد دیابتی
و محافظت کبدی به ترتیب برای ۱۴ و ۳۲ روز، شربت کامبوچا را روزانه به صورت خوراکی با دوزهای ۲ و ۴ میلی لیتر به ازای هر
کیلوگرم از وزن حیوان دریافت کردند. میزان قندخون با گلوکومتر و فعالیت آنزیم های کبدی با کیت های شرکت پارس آزمون
اندازه گیری شد. نتایج با استفاده از آزمون آماری Student's T-Test و ANOVA و با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۲
مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: شربت کامبوچا با ۱۲/۶۶ درصد گلوکوکورونیک اسید و ۴/۵۷ درصد اتانول خاصیت آنتی اکسیدانی دارد. بیشترین خاصیت
آنتی اکسیدانی به میزان ۸۹/۵۸ درصد گزارش شد که این میزان همان درصد رادیکال های آزاد احیاء شده توسط عصاره است.
قندخون در گروه های آزمون اول و دوم (۱۶۰ mg/dl و ۱۱۲)، نسبت به گروه کنترل منفی (۴۳۶ mg/dl) کاهش معناداری نشان
داد. فعالیت آنزیم های کبدی نیز در گروه های آزمون اول و دوم، نسبت به گروه کنترل منفی کاهش معناداری نشان داد.

نتیجه گیری: شربت کامبوچا با خاصیت آنتی اکسیدانی بالا، اثرهای مفیدی در مدیریت بیماری دیابت و حفظ سلامت سلول-
های کبدی در برابر ترکیب های سمی دارد.

واژه های کلیدی: دیابت، محافظت کبدی، شربت کامبوچا، استرپتوزوتوسین

مقدمه

بیماری دیابت یکی از بیماری های شایع در انسان است که
طبق تخمین فدراسیون بین المللی دیابت، چهار درصد مردم

نویسنده مسئول:

باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد رشت، دانشگاه آزاد
اسلامی، رشت، ایران

پست الکترونیکی: arasteh@iaurasht.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۵

الکل حاصله توسط باکتری‌ها به عنوان منبع کربن مصرف شده و به اسیدهایی چون اسید استیک، اسید لاکتیک، اسید گلوکونیک و اسید گلوکورونیک تبدیل می‌گردد (۴،۷). وجود سایر متابولیت‌ها به همراه بو و عطر چای، یک نوشیدنی خوش طعم و غنی از ویتامین‌های گروه (ب) را به وجود می‌آورد. این مجموعه هم‌زیست، ظاهری ژله‌ای و سفید دارد و پس از هر دوره تولید شربت کامبوچا، می‌توان دوباره از آن برای تخمیر استفاده کرد. اگر در فرایند تخمیر اندازه ظرف تغییری نکند، قارچ کمی ضخیم‌تر شده ولی استفاده از ظرف بزرگ‌تر، موجب گسترش قارچ در تمام سطح محلول خواهد شد. شکل زیر قارچ کامبوچا را در فرایند تخمیر نشان می‌دهد (۸).



شکل ۱- سیستم میکروبی هم‌زیست مولد شربت کامبوچا. سیستم هم‌زیست به‌طور معمول به شکل ظرف خود در می‌آید. (تصویر از نویسندگان)

نوشیدنی کامبوچا یک "پروبیوتیک" است که مصرف آن سیستم دفاعی بدن را تقویت کرده (۹،۱۰) و موجب بهبود علائم بیماری‌هایی چون دیابت (قند)، سرطان، فشار خون، چربی خون، آلرژی، روماتیسم، سیاتیک، آرتروز، آرتريت روماتوئید و غیره می‌شود (۱۱،۱۲). شربت کامبوچا محتوی مایرستین^{۱۲} است که در شرایط آزمایشگاهی اثر لیپوژنز و انتقال گلوکز از غشای سلول‌ها را تقلید می‌کند (۱۳). این

مبتلا به این بیماری هستند. در این میان دسترسی به داروها و موادی که بتواند از میزان عوارض این بیماری بکاهد، بسیار حائز اهمیت است. استفاده از گیاهان دارویی و ترکیب‌های سنتی از دیرباز برای کاهش عوارض بیماری‌ها و پیش‌گیری از بسیاری امراض مورد توجه بوده است. نوشیدنی کامبوچا یکی از این ترکیب‌ها است که برای ساکنین مناطق آسیای شرقی شناخته شده‌تر است. نوشیدنی کامبوچا ترکیبی از چای معمولی و شکر است که با استفاده از قارچ‌های موجود در کامبوچا تخمیر شده و ترکیب شیمیایی آن تغییر کرده است. این نوشیدنی به‌طور معمول حاوی مقادیر بسیار کم اتانول بوده (بین ۱/۲ تا ۲ درصد) و میزان اتانول آن به شرایط تخمیر بستگی دارد (۱). قارچ کامبوچا یک لایه پلی‌ساکاریدی حاوی انواع مخمرها و باکتری‌ها است (۲). این باکتری‌ها شامل باکتریوم گزیلینوم^۱، باکتریوم گلوکونیکوم^۲، استوباکتر گزیلینوم^۳، استوباکتر کتوژنوم^۴، استوباکتر گزیلینوئیدس^۵ و لاکتوباسیلوس آئروبیک^۶ و مخمرها شامل ساکارومیسس سرویزیه^۷، ساکارومیسس لودویگی^۸، ساکارومیسس اپیکولاتوس^۹، شیزوساکارومیسس پومبه^{۱۰} و نیز مخمرهایی از جنس زیگوساکارومیسس^{۱۱} است (۳-۶). در فرایند تخمیر، ابتدا قند ساکارز موجود در محیط توسط مخمرها به گلوکز و فروکتوز تجزیه شده و فروکتوز نیز طی فرایند ایزومریزاسیون به گلوکز تبدیل می‌شود. در مرحله بعد مونوساکاریدها توسط مخمرها تخمیر شده و به الکل و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌شوند. حضور دی‌اکسیدکربن موجب گازدار شدن نوشیدنی می‌شود. علاوه بر این، رشد قارچ سیستم سلولزی مناسب برای جای‌گیری باکتری‌ها در یک بستر متخلخل را فراهم کرده و محلی امن برای رشد و تکثیر آن‌ها ایجاد می‌کند.

¹ Bacterium xylinum

² Bacterium gluconicum

³ Acetobacter xylinum

⁴ Acetobacter ketogenum

⁵ Acetobacter xylinoides

⁶ Lactobacillus aerobis

⁷ Saccharomyces cerevisiae

⁸ Saccharomyces ludwigii

⁹ Saccharomyces apiculatus

¹⁰ Schizosaccharomyces pombe

¹¹ Zygosaccharomyces

¹² myricetin

قارچ به دلیل ترکیب‌های خاص و دارا بودن "اسید گلوکورونیک" نه تنها مانع از سرطانی شدن سلول‌ها می‌شود، بلکه رشد سلول‌های سرطانی را نیز متوقف می‌سازد (۱۴،۱۵). نوشیدنی کامبوچا سرشار از آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر ویتامین‌های E و C، بتاکاروتن و سایر کاروتنوئیدهاست (۱۵). این چای مانند چای سیاه محتوی پلی فنول‌ها و سایر آنتی‌اکسیدان‌ها است (۱۶،۱۷). از آنجایی‌که نوشیدنی کامبوچا حاصل فرایند تخمیر است، به مراتب از چای سیاه مفیدتر بوده و مصرف آن به تنظیم متابولیسم بدن کمک می‌کند (۲). آزمایش روی حیوانات نشان می‌دهد که این نوشیدنی با افزایش محدودیت کالری منجر به کاهش وزن می‌شود (۷،۱۸). اسیدهای ارگانیک موجود در کامبوچا ترکیب‌های آهن سه‌ظرفیتی موجود در منابع گیاهی را به یون آهن دو ظرفیتی تبدیل می‌کند که موجب در دسترس قرار گرفتن آهن‌هایی با منشأ گیاهی برای سلول‌ها می‌شود (۱۸). هم‌چنین ویتامین C موجود در کامبوچا جذب آهن را افزایش می‌دهد. محققان نوشیدن کامبوچا را به‌ویژه به افراد مسن و گیاه‌خواران توصیه می‌کنند تا با افزایش جذب آهن از فقر آهن در آن‌ها جلوگیری شود (۱۰). اما مطالعه‌های اخیر نشان داده است که این قارچ، قند خون موش‌های آزمایشگاهی مبتلا به دیابت را به شدت کاهش می‌دهد (۱۹، ۱۰، ۲). نتایج این تحقیقات، نوشیدنی کامبوچا را به‌عنوان نامزد جدید درمان دیابت معرفی کرده است. در این مطالعه اثر شربت کامبوچا بر میزان قندخون موش‌های دیابتی و هم‌چنین اثر محافظتی آن بر سلول‌های کبدی در برابر ترکیب‌های سمی مثل تتراکلرید کربن در موش‌های نر نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد

نمونه قارچ کامبوچا از شرکت دانش بنیان مستقر در پارک علم و فناوری گیلان تهیه شده و شربت تازه کامبوچا با استفاده از آن تهیه گردید. خوراک مخصوص موش تولیدی خوراک دام پارس و کیت‌های تشخیص کمی گلوکز و آنزیم-های کبدی از شرکت پارس آزمون تهیه شدند. از دی فنیل

پیکریل هیدرازیل (DPPH^{13}) و استرپتوزوتوسین^{۱۴} محصول شرکت سیگما استفاده شد.

تهیه شربت کامبوچا

برای تهیه نوشیدنی کامبوچا، ۲۰ گرم چای سیاه در ۱۰ لیوان آب‌جوش به‌مدت ۱۰ دقیقه دم کشید و پس از ۱۰ دقیقه صاف شد. سپس محلول در یک کاسه بلوری بزرگ ریخته شد و ۱۵۰ گرم شکر و ۲ قاشق غذاخوری سرکه سیب به آن اضافه گردید. پس از هم‌دم شدن با محیط، قارچ کامبوچا به آن اضافه شد و به برای یک هفته در محلی تاریک و گرم قرار گرفت. در این مدت به‌منظور تأمین اکسیژن و جلوگیری از ورود گرد و خاک، روی ظرف با یک پارچه توری پوشیده شد. بعد از یک هفته قارچی جدید روی سطح کاسه را پوشانید و نوشیدنی کامبوچا تولید شد. قارچ به ظرف دیگری منتقل شد و نوشیدنی حاصل پس از عبور از صافی پارچه‌ای در یک ظرف شیشه‌ای ریخته شد و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۴ درجه یخچال قرار گرفت (۱۱).

بررسی ترکیب‌های شربت کامبوچا با کروماتوگرافی

گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-Mass)

شربت کامبوچای تولید شده، پس از آگیری دوباره در متانول حل شد و به دستگاه GC-MS تزریق گردید. برنامه دمایی Oven از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد شروع و سپس با سرعت ۶ درجه بر دقیقه تا ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بالا برده شد و یک دقیقه و بیست و سه ثانیه در آن دما قرار گرفت. سپس دوباره با سرعت ۱۰ درجه بر دقیقه به دمای ۲۹۰ درجه رسانیده شد. برنامه دمایی محل تزریق ۲۹۰ درجه و از فاز متحرک هلیوم با سرعت یک میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد (۲۰).

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH

شربت کامبوچای تولید شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به‌عنوان استوک با حجم‌های مختلف از اتانول مخلوط شد و غلظت‌های مختلف نمونه (از ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه گردید. سپس، آزمایش DPPH

¹³ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

¹⁴ Streptozotocin

بررسی اثر ضد دیابتی

برای بررسی اثر ضد دیابتی، شربت کامبوچا روزانه به صورت گاوژ به حیوانات خورانیده شد و میزان قند خون در نمونه خون انتهای دم همه موش‌ها، قبل و بعد از پایان دوره دو هفته‌ای آزمایش، با دستگاه گلوکومتر بررسی و ثبت شد (شکل ۲).



شکل ۲- روش گاوژ کردن (سمت راست) و خونگیری از دم موش و اندازه‌گیری قندخون (سمت چپ)

موش‌ها توسط ماژیک‌های رنگی علامت‌گذاری شدند. سپس موش‌ها بر اساس قند خون در، مطابق جدول (۱)، در گروه‌های مختلف قرار گرفتند.

جدول ۱- گروه بندی موش‌ها برای بررسی اثر ضد دیابتی

گروه	تعداد	دوره زمانی (روز)	شربت کامبوچا (ml/kg) از وزن بدن	زمان خونگیری
شاهد ۱	۵ موش سالم	۱۴	بدون تیمار (آب مقطر)	روز اول و پایان روز ۱۴
شاهد ۲	۵ موش سالم	۱۴	۲	روز اول و پایان روز ۱۴
کنترل منفی	۵ موش دیابتی	۱۴	بدون تیمار (آب مقطر)	روز اول و پایان روز ۱۴
آزمون ۱	۵ موش دیابتی	۱۴	۲	روز اول و پایان روز ۱۴
آزمون ۲	۵ موش دیابتی	۱۴	۴	روز اول و پایان روز ۱۴

گروه شاهد ۱: شامل ۵ موش سالم نر بودند که هر روز ۲ میلی لیتر آب مقطر به ازای هر گیلوگرم از وزن بدن از طریق گاوژ دریافت کردند.

گروه شاهد ۲: شامل ۵ موش سالم نر بودند که روزانه ۲ میلی لیتر شربت کامبوچا به ازای هر گیلوگرم از وزن بدن از طریق گاوژ دریافت کردند.

برای هر غلظت به طور جداگانه انجام شد. لوله نمونه (S)، حاوی ۰/۵ میلی لیتر شربت کامبوچا، ۳ میلی لیتر اتانول و ۰/۵ میلی لیتر محلول DPPH در اتانول بود. لوله کنترل (C) نیز مشابه لوله نمونه تهیه شد، ولی به جای شربت کامبوچا، اتانول اضافه شد و در لوله بلانک (B) نیز به جای محلول DPPH، اتانول ریخته شد. لوله‌ها برای ۶۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند تا شدت رنگ از بنفش پررنگ به زرد تبدیل شود. سپس میزان جذب لوله‌های کنترل و نمونه در طول موج ۵۱۸ نانومتر، در مقابل محتویات لوله بلانک، خوانده شد و با استفاده از رابطه (۱)، درصد فعالیت آنتی اکسیدانی محاسبه گردید (۲۱).

رابطه (۱)

$$[\frac{Abs.S}{Abs.C} \times 100] - 100 = \text{درصد فعالیت آنتی اکسیدانی}$$

حیوانات مورد استفاده و نحوه نگهداری آن‌ها

حیوانات مورد آزمایش در این تحقیق ۳۰ سر موش نر ویستار سفید (دیابتی) و ۱۰ موش نر سالم با وزن تقریبی $160 \pm$ گرم و سن دو تا سه ماه و ۲۵ موش سفید ماده با وزن تقریبی $280 \pm$ گرم بودند. حیوانات از مرکز تحقیقات وارنا و شهید میرغنی گیلان تهیه شدند و آزمایش‌ها در همان مرکز انجام شد. درجه حرارت محیط 25 ± 2 درجه سانتی گراد بوده که در طول شبانه روز ثابت نگهداشته می‌شد و قفس‌ها در دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند. آب و غذا در تمام طول آزمایش بدون هیچ محدودیتی در اختیار آن‌ها قرار می‌گرفت. قفس‌های نگهداری حیوانات از جنس پلی کربنات در ابعاد $40 \times 25 \times 15$ با سقف مشبک از جنس استیل بود که در هر کدام پنج سر موش نگهداری می‌شد. کف قفس‌ها با تراشه‌های چوب مفروش شد و خاک اره‌های موجود در کف قفس هر روز یکبار تعویض می‌شد. حیوانات قبل از انجام آزمایش، وزن شده تا در محدوده وزنی خاصی باشند. تعداد کل موش‌ها در هر آزمایش ۲۵ سر بودند که به صورت زیر به گروه‌های شاهد ۱ و ۲، کنترل و آزمون ۱ و ۲ تقسیم شدند. بیماری دیابت با تزریق درون صفاقی محلول حاوی ۶۰ میلی گرم استرپتوزوتوسین به ازای هر کیلوگرم از وزن حیوان، القا شد.

گروه کنترل منفی: شامل ۵ موش دیابتی نر بودند که هر روز ۲ میلی لیتر آب مقطر به ازای هر گیلوگرم از وزن بدن از طریق گاواژ دریافت کردند.

گروه آزمون ۱: شامل ۵ موش دیابتی نر بودند که روزانه ۲ میلی لیتر شربت کامبوچا به ازای هر گیلوگرم از وزن بدن از طریق گاواژ دریافت کردند.

گروه آزمون ۲: شامل ۵ موش دیابتی نر بودند که روزانه ۴ میلی لیتر شربت کامبوچا به ازای هر گیلوگرم از وزن بدن از طریق گاواژ دریافت کردند.

بررسی اثر محافظت کبدی

برای بررسی اثر محافظت کبدی، مخلوط روغن زیتون و تتراکلرید کربن به میزان ۱ میلی لیتر به ازاء هر کیلوگرم از وزن حیوان با سرنگ به درون محفظه صفاق حیوان تزریق شد. شربت کامبوچا نیز روزانه به صورت گاواژ به حیوانات خوراندید شد. فعالیت آنزیمهای کبدی آلانین ترانس آمیناز (ALT)، آسپاراتات ترانس آمیناز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در سرم خون پنج گروه موش ذکر شده در جدول (۳)، بعد از یک دوره ۳۲ روزه با کیت های شرکت پارس آزمون اندازه گیری شد.

جدول ۲- گروه بندی موش ها برای بررسی اثر محافظت کبدی

گروه	تعداد	دوره زمانی (روز)	داروی تزریقی (نسبت ۱:۱) (ml/kg)	شربت کامبوچا (ml/kg) از وزن بدن	زمان خونگیری
شاهد ۱	۵	۳۲	روغن زیتون	-	پایان روز ۳۲
شاهد ۲	۵	۳۲	روغن زیتون	۲	پایان روز ۳۲
کنترل منفی	۵	۳۲	روغن زیتون + تتراکلرید کربن	-	پایان روز ۳۲
آزمون ۱	۵	۳۲	روغن زیتون + تتراکلرید کربن	۲	پایان روز ۳۲
آزمون ۲	۵	۳۲	روغن زیتون + تتراکلرید کربن	۴	پایان روز ۳۲

گروه شاهد: شامل ۵ موش نر بودند که هفته ای ۲ بار از روغن زیتون به میزان ۱ میلی لیتر به ازاء هر کیلوگرم از وزن حیوان به صورت درون صفاقی دریافت کردند.

گروه شاهد ۲: شامل ۵ موش نر بودند که هفته ای ۲ بار از روغن زیتون به میزان ۱ میلی لیتر به ازاء هر کیلوگرم از وزن حیوان به صورت درون صفاقی دریافت کردند. همچنین روزانه ۲ میلی لیتر از شربت کامبوچا به ازای هر گیلوگرم از وزن بدن به صورت گاواژ دریافت نمودند.

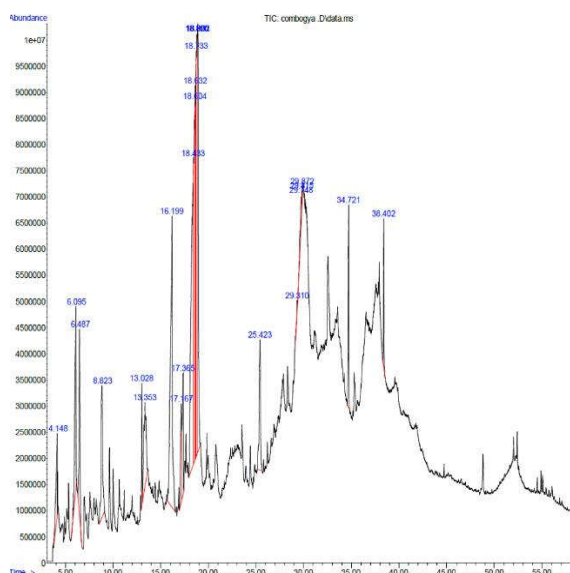
گروه کنترل ۱: شامل ۵ موش نر بودند که هفته ای ۲ بار از روغن زیتون و تتراکلرید کربن (به نسبت ۱:۱) به میزان ۱ میلی لیتر به ازاء هر کیلوگرم از وزن حیوان به صورت درون صفاقی دریافت نمودند.

گروه آزمون ۱: شامل ۵ موش نر بودند که هفته ای ۲ بار از زیتون و تتراکلرید کربن (به نسبت ۱:۱) به میزان ۱ میلی لیتر به ازاء هر کیلوگرم وزن حیوان به صورت درون صفاقی دریافت کردند، به علاوه روزانه ۲ میلی لیتر از شربت کامبوچا به ازای هر گیلوگرم از وزن بدن به صورت گاواژ دریافت نمودند.

گروه آزمون ۲: شامل ۵ موش نر بودند که هفته ای ۲ بار از زیتون و تتراکلرید کربن (به نسبت ۱:۱) به میزان ۱ میلی لیتر به ازاء هر کیلوگرم وزن حیوان به صورت درون صفاقی دریافت کردند، به علاوه روزانه ۴ میلی لیتر از شربت کامبوچا به ازای هر گیلوگرم از وزن بدن به صورت گاواژ دریافت نمودند.

آنالیز آماری

نتایج حاصل با استفاده از آزمون آماری Student's T-Test و ANOVA بیان گردیده و با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت بررسی اثر ضد دیابتی و محافظتی شربت کامبوچا در برابر آسیب های کبدی القا شده با تتراکلرید کربن در موش ها از آزمون های آنالیز واریانس بین آزمودنی، تی- تست مستقل و تی- تست زوجی استفاده شد. در بررسی آنزیم های کبدی با توجه به وجود یک عامل با پنج سطح از آزمون آنالیز واریانس استفاده شد و از آنجایی که هر آزمودنی فقط یک بار مورد آزمایش قرار می گیرد، آنالیز واریانس از نوع بین آزمودنی یک طرفه است و برای مقایسه های دو به دو از پس آزمون Tukey



شکل ۳- گاز کروماتوگرام حاصل از بررسی شربت کامبوچا

جدول ۳- ترکیب‌های موجود در شربت کامبوچا

ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	احتمال حضور (درصد)	درصد حضور در نمونه
۱	هیدروکسی متیل فورفوال	۱۸/۱۳	۹۸	۲۳/۵۳
۲	گلوکورونیک اسید	۱۸/۴۳	۹۸	۱۲/۶۶
۳	فوران کربوکسیک اسید	۲۹/۹۷	۹۶	۷/۷۳
۴	فلوئورو بنزیل الکل	۱۶/۱۹	۹۷	۶/۱۵
۵	فوران کربوکسیلیک اسید	۶/۰۹	۹۵	۴/۵۹
۶	فورفورال	۶/۴	۹۶	۳/۵۳
۷	گلوکسیتول	۲۵/۴	۹۹	۲/۹۷
۸	مرکاپتو اتانول	۸/۴	۹۳	۲/۷۷
۹	پالمیتیک اسید	۱۳/۲	۹۶	۲/۶۵
۱۰	استئاریک اسید	۱۳/۳	۹۴	۱/۵۳

نتایج حاصل از روش DPPH

به منظور بررسی اثرهای آنتی‌اکسیدانی شربت کامبوچا از آزمون مهار رادیکال آزاد دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) استفاده شد و نتایج مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش با سه بار تکرار برای ده غلظت مختلف (۱۰۰-۱۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر) از شربت کامبوچا انجام شد و میانگین مقادیر محاسبه شده برای هر غلظت، برای رسم نمودار استفاده شد (شکل ۴).

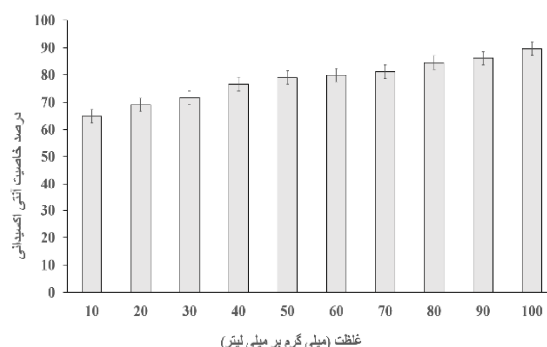
استفاده شد. جهت بررسی قندخون در دو زمان مختلف از آزمون T-Test استفاده گردید و از آنجا که هر آزمودنی دو بار مورد آزمایش قرار می‌گیرد، تی-تست از نوع زوجی (تکراری) استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS)

بر این اساس، حضور ماده فورفورال^{۱۵} به میزان ۳/۵۳ درصد، اتانول^{۱۶} به میزان ۴/۵۷ درصد، فوران کربوکسیلیک اسید^{۱۷} به میزان ۴/۵۹ درصد، گلوکورونیک اسید^{۱۸} به میزان ۱۲/۶۶ درصد، سوکسینیک اسید^{۱۹} به میزان ۳/۰۲ درصد، هیدروکسی متیل فورفورال^{۲۰} به میزان ۲۳/۵۳ درصد، فوران کربوکسیک اسید^{۲۱} به میزان ۷/۷۳ درصد، گلوکسیتول^{۲۲} به میزان ۲/۹۷ درصد، فلوئورو بنزیل الکل^{۲۳} به میزان ۶/۱۵ درصد، مرکاپتو اتانول^{۲۴} به میزان ۲/۷۷ درصد، هگزا دکانوئیک اسید یا همان پالمیتیک اسید^{۲۵} به میزان ۲/۶۵ درصد و اکتا دکانوئیک اسید یا همان استئاریک اسید^{۲۶} به میزان ۱/۵۳ درصد گزارش شد. شکل (۳)، نمودار کلی به دست آمده از کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی و جدول (۳) ترکیب‌های شناسایی شده را نشان می‌دهد.

- ¹⁵ Furfural
- ¹⁶ Ethanol
- ¹⁷ 2-Furancarboxylic acid
- ¹⁸ Glucuronic acid
- ¹⁹ Succinic acid
- ²⁰ 5-Hydroxymethylfurfural
- ²¹ 2-Furancarboxaldehyde
- ²² Glucitol
- ²³ 2-Fluorobenzyl alcohol
- ²⁴ 4-Mercaptophenol
- ²⁵ n-Hexadecanoic acid
- ²⁶ Octadecanoic acid



شکل ۴- درصد فعالیت آنتی اکسیدانی شربت کامبوچا در غلظت های مختلف

همان طور که در شکل (۴) مشاهده می شود، با افزایش غلظت شربت کامبوچا، میزان خاصیت آنتی اکسیدانی تا غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر افزایش دارد. بر این اساس، بیشترین درصد فعالیت آنتی اکسیدانی در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از شربت کامبوچا و به میزان ۸۹/۵۸ درصد محاسبه شد. با توجه به الگوی افزایش درصد خاصیت آنتی اکسیدانی، این غلظت از محلول (۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) بالاترین اثر آنتی اکسیدانی را نشان می دهد و در غلظت های بالاتر نیز تغییر محسوسی مشاهده نخواهد شد.

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد دیابتی شربت کامبوچا

جهت مقایسه میزان تغییرهای قندخون در موش های دیابتی و تیمار شده با شربت کامبوچا در گروه های مختلف و هم چنین قبل و بعد از تیمار از آزمون های تحلیل واریانس و تی- تست استفاده شد. شایان ذکر است، در مورد داده ها نرمال از تحلیل واریانس بین آزمودنی یک طرفه، تی- تست مستقل و تی- تست زوجی و در مورد داده های غیر نرمال از معادل ناپارامتری آن، یعنی آزمون های کروسکال-والیس^{۲۷}، استفاده گردید. به همین منظور، ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف^{۲۸}، وضعیت نرمال بودن داده ها بررسی شد.

جدول ۴- بررسی نرمال بودن داده های مربوط به تغییرهای قندخون در گروه های مورد آزمایش

گروه های مورد آزمایش	P-value	نتیجه
شاهد ۱ (آب)	۰/۹۷۷	نرمال
شاهد ۲ (شربت کامبوچا (۲ml/kg))	۰/۹۵۵	نرمال
کنترل منفی (آب)	۰/۷۶۷	نرمال
آزمون ۱ (شربت کامبوچا (۲ml/kg))	۰/۹۸۰	نرمال
آزمون ۲ (شربت کامبوچا (۴ml/kg))	۱	نرمال

با توجه به نتایج مندرج در جدول (۴)، از آنجا که داده های مربوط به قندخون قبل و بعد از تیمار در گروه های مختلف، نرمال بود ($P\text{-value} > \alpha = 0/05$)، بنابراین جهت مقایسه اثر حفاظتی شربت کامبوچا قبل و بعد از تیمار در موش های دیابتی، از آزمون تی- تست زوجی استفاده شد و هم چنین از آنجا که داده های مربوط به تغییرهای قند خون در گروه های مختلف، نرمال بوده است ($P\text{-value} > \alpha = 0/05$) جهت مقایسه تغییرهای قند خون در گروه های دیابتی از تحلیل واریانس بین آزمودنی یک طرفه و برای گروه های کنترل از آزمون تی- تست مستقل استفاده گردید. جدول (۵) میزان قند خون قبل و بعد از ۱۴ روز دریافت شربت کامبوچا در گروه های مورد آزمایش را نشان می دهد.

جدول ۵- میزان قند خون قبل و بعد از ۱۴ روز دریافت شربت کامبوچا در گروه های مورد آزمایش

گروه های مورد آزمایش	قند خون (mg/dl)	
	روز صفر *	روز ۱۴ *
شاهد ۱ (آب)	۸۵/۴۰ ± ۳/۱۷۲	۸۶/۶۰ ± ۱/۹۱۳
شاهد ۲ (شربت کامبوچا (۲ml/kg))	۸۳/۲۰ ± ۳/۰۷۲	۸۰/۶۰ ± ۳/۴۸۷
کنترل منفی (آب)	۳۹۰/۶۰ ± ۴۲/۳۸۳	۴۳۶/۴۰ ± ۴۳/۵۱۳
آزمون ۱ (شربت کامبوچا (۲ml/kg))	۳۷۰/۸۰ ± ۴۸/۷۵۵	۱۶۰/۰۰ ± ۲۸/۰۳۶
آزمون ۲ (شربت کامبوچا (۴ml/kg))	۳۷۳/۰۰ ± ۵۶/۲۷۷	۱۱۲/۲۰ ± ۱۷/۴۳۳

* میانگین ± خطای استاندارد میانگین (Mean ± SEM)

نتایج حاصل از بررسی قندخون، قبل و بعد از تیمار با شربت کامبوچا نشان داد که میزان قند خون در گروه های شاهد، قبل و بعد از تیمار تغییر معنی داری نکرده، ولی در

²⁷ kruskal-wallis

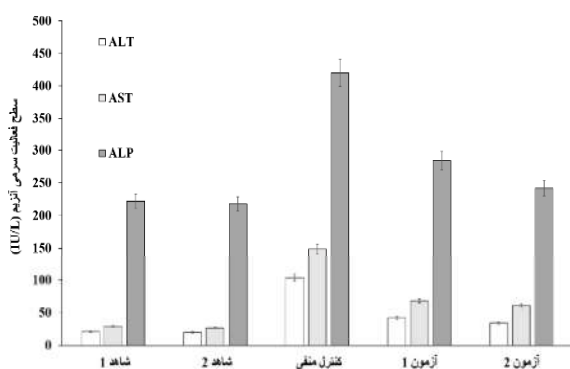
²⁸ Kolmogorov-smirnov

($P\text{-value} > \alpha = 0.05$)، بنابراین جهت مقایسه اثر حفاظتی آن بر کبد آسیب دیده در موش‌ها، از آزمون تحلیل واریانس بین آزمودنی یک‌طرفه استفاده گردید (جدول ۷).

جدول ۷- اثرهای حفاظتی شربت کامبوچا بر سطح سرمی فعالیت آنزیم‌های کبدی

گروه‌های مورد آزمایش	سطح سرمی فعالیت آنزیم‌های کبدی		
	(ALT) Mean±SEM	(AST) Mean±SEM	(ALP) Mean±SEM
شاهد ۱ (روغن زیتون)	۲۱±۰/۷۰۷	۲۹±۱/۰۰۰	۲۲۲±۲/۰۲۵
شاهد ۲ (روغن زیتون+ شربت کامبوچا ((۲ml/kg))	۲۰±۱/۰۰۰	۲۷±۱/۳۰۴	۲۱۸±۱/۸۴۴
کنترل منفی (تتراکلیدکربن+روغن زیتون)	۱۰۴±۱/۴۱۴	۱۴۹±۱/۷۰۲	۴۲۰±۲/۵۵۰
آزمون ۱ (تتراکلیدکربن+روغن زیتون+ شربت کامبوچا ((۲ml/kg))	۴۱±۱/۱۴۰	۶۸±۱/۰۰۰	۲۸۴±۲/۴۷۰
آزمون ۲ (تتراکلیدکربن+روغن زیتون+ شربت کامبوچا ((۴ml/kg))	۳۴±۱/۳۰۴	۶۱±۱/۴۱۴	۲۴۲±۲/۱۲۱

همان‌طور که در جدول (۷) مشاهده می‌شود، سطح سرمی فعالیت آنزیم‌های کبدی در گروه شاهد ۱ که فقط روغن زیتون دریافت کرده بودند، نرمال بوده و تفاوت معنی‌داری با میزان گزارش شده در گروه شاهد ۲ نداشت. در حالی‌که، میزان فعالیت آنزیم‌ها در هر سه آنزیم کبدی، در گروه‌های آزمون ۱ و ۲ کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل منفی، که شربت کامبوچا دریافت نکرده بودند، نشان داد. نتایج به‌طور مقایسه‌ای در شکل (۶) نشان داده شده است.

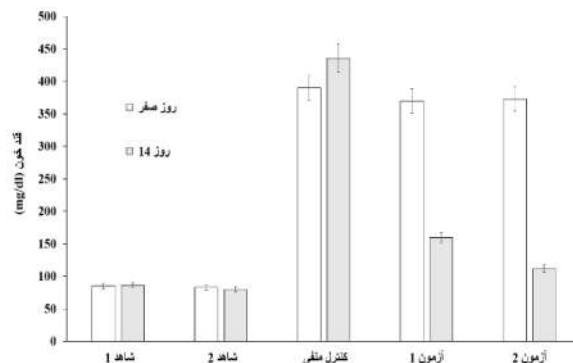


شکل ۶- اثرهای حفاظتی شربت کامبوچا بر سطح سرمی آنزیم‌های کبدی

بحث

شربت کامبوچا موجب کاهش قندخون می‌شود
مشخص شده که با القای استرپتوزوتوسین در موش‌های رت، فعالیت NADH دهیدروژناز افزایش یافته و فعالیت سیتوکروم C اکسیداز در زنجیره تنفسی میتوکندریایی

گروه کنترل منفی که موش‌های دیابتی از شربت کامبوچا دریافت نکرده‌اند، افزایش زیادی داشته است. میزان قندخون پس از تیمار در گروه‌های آزمون ۱ و ۲ نسبت به گروه کنترل منفی، کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۵).



شکل ۵- میزان قندخون قبل و بعد از دو هفته دریافت شربت کامبوچا در گروه‌های مورد آزمایش

نتایج حاصل از بررسی اثر محافظت کبدی شربت کامبوچا

جهت مقایسه میزان آسیب کبدی در گروه‌های مختلف از آزمون تحلیل واریانس استفاده شد. شایان ذکر است، در مورد داده‌ها نرمال از تحلیل واریانس بین آزمودنی یک‌طرفه و در غیر این‌صورت از معادل ناپارامتری آن یعنی آزمون کروسکال-والیس استفاده شد. به‌همین منظور ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، وضعیت نرمال بودن داده‌ها بررسی گردید.

جدول ۶- بررسی نرمال بودن سطوح فعالیت سرمی ALT، AST و

ALP در گروه‌های مورد آزمایش

گروه‌های مورد آزمایش	P-value (ALT)	نتیجه	P-value (AST)	نتیجه	P-value (ALP)	نتیجه
شاهد ۱ (روغن زیتون)	۱	نرمال	۱	نرمال	۰/۹۷۹	نرمال
شاهد ۲ (روغن زیتون+ شربت کامبوچا ((۲ml/kg))	۱	نرمال	۰/۹۹۹	نرمال	۰/۹۹۹	نرمال
کنترل منفی (تتراکلیدکربن+روغن زیتون)	۱	نرمال	۱	نرمال	۱	نرمال
آزمون ۱ (تتراکلیدکربن+روغن زیتون+ شربت کامبوچا ((۲ml/kg))	۰/۹۹۶	نرمال	۱	نرمال	۰/۹۷۲	نرمال
آزمون ۲ (تتراکلیدکربن+روغن زیتون+ شربت کامبوچا ((۴ml/kg))	۰/۹۹۹	نرمال	۱	نرمال	۱	نرمال

با توجه به نتایج مندرج در جدول (۶)، از آنجا که داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم‌های ALT، AST و ALP در کبد آسیب دیده و تیمار شده با شربت کامبوچا، نرمال بوده است

کاهش می‌یابد. این موضوع سبب نشت الکترون از غشای داخلی میتوکندری و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در بافت‌های در معرض استرپتوزوتوسین می‌شود (۲۳، ۲۲) که از جمله دلایل تخریب سلول‌های بتای پانکراس در اثر استرپتوزوتوسین است. استرپتوزوتوسین یک آنالوگ N-استیل گلوکز آمین است که برای القاء دیابت نوع I به‌طور تجربی استفاده می‌شود. این ترکیب، سلول‌های هدف خود را به مستعد تخریب می‌سازد (۲۴).

زنجیره تنفسی میتوکندریایی محل مهم تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌ویژه در مرحله کمپلکس‌های NADH دهیدروژناز و سیتوکروم C اکسیداز این زنجیره است (۲۵). اختلال در میتوکندری و کاهش بیوسنتز ATP در بیماری دیابت نوع I شناخته‌شده است (۲۶، ۲۷). در افراد دیابتی و مسن، گلیکوزیلاسیون (اتصال آنزیمی قند) محصول‌های نهایی مشتق از گلوکز افزایش می‌یابد و تشکیل این محصولات گلیکوزیله با هایپرگلیسمی افزایش می‌یابد. تحقیقات مختلف درباره بیماری دیابت نشان می‌دهد که القای دیابت با تزریق استرپتوزوتوسین سبب افزایش معنی‌داری در سطح سرمی گلوکز، کلسترول، تری گلیسرید، فاکتورهای کلیوی (اوره، اسیداوریک، کراتینین) و آنزیم‌های عمل‌کرد کبدی (ALP, ALT, AST) در موش‌های دیابتی نسبت به موش‌های نرمال می‌شود و سطح سرمی انسولین به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. گزارش شده است که افزایش قندخون و افزایش کراتینین و اوره از مارکرهای مهم اختلال کلیوی در دیابت نوع I محسوب می‌شود (۲۸). افزایش قندخون، اتواکسیداسیون پروتئین‌های گلیکوزیله شده، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، کاهش عمل‌کرد آنتی اکسیدان‌ها، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب غشاها به‌عنوان عامل اصلی آپوپتوز یا نکروز سلول می‌باشند که در بیماری دیابت رایج هستند (۳۰، ۲۹). در سال ۲۰۱۸، Zubaideh و همکاران، اثر ۴ نوع چای کامبوچا را بر قندخون و فاکتورهای چربی خون موش‌های صحرایی بررسی کردند. آن‌ها دریافتند که میزان قند خون در موش‌های آزمون که شربت کامبوچا دریافت کرده بودند (۱۱۰ mg/dl) نسبت به کنترل منفی (۴۱۳ mg/dl) کاهش

معناداری پیدا کرده است که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد (۲۳). Ahmad و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲، به بررسی ویژگی‌های کاهنده نوشیدنی کامبوچا بر قند و چربی خون در موش‌های دیابتی شده با آلوکسان پرداختند. آن‌ها نشان دادند که چای کامبوچا در مقایسه با چای سیاه، مهار کننده بهتر آلفا آمیلاز و فعالیت لیپاز در پلاسما و لوزالمعده و همچنین سرکوب‌گر بهتر افزایش سطح گلوکز خون است. جالب است که کامبوچا باعث تأخیر قابل توجهی در جذب کلسترول-LDL و تری گلیسریدها و افزایش قابل توجه در کلسترول-HDL می‌گردد (۲). نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز خوراکی شربت کامبوچا (۴ و ۲ ml/kg) به مدت ۱۴ روز، سبب کاهش معنی‌داری در سطح سرمی گلوکز در گروه‌های آزمون اول و دوم (۱۶۰ و ۱۱۲ mg/dl)، نسبت به گروه کنترل منفی (۴۳۶ mg/dl) نشان داد.

شربت کامبوچا برای سلول‌های کبدی اثر محافظتی دارد

پیدا کردن یک داروی طبیعی مناسب برای درمان بیماری‌های کبدی کار ساده‌ای نیست و درمان‌های مؤثر مثل اینترفرون، کلشی‌سین، بنی‌سیلامین و کورتیکوئیدها متناقض هستند (۳۲، ۳۱). کبد یک نقش بیوشیمیایی حیاتی و مرکزی در متابولیسم، هضم، سم‌زدایی و حذف مواد از بدن دارد (۳۴، ۳۳). آسیب کبدی ایجاد شده با تتراکلریدکربن به‌خوبی مشهود است و به‌طور معمول از آن به‌عنوان یک مدل مناسب برای مطالعه اثرهای حفاظت کننده کبدی داروها استفاده می‌شود (۳۷-۳۵). تتراکلریدکربن یک ماده اکسیدکننده و سم کبدی قوی است که پس از ورود به بدن مشابه بسیاری از مواد از جمله استامینوفن، برخی آنتی‌بیوتیک‌ها، اتانول و تیواستامید عمل کرده و بر سلول‌های کبدی آثار هیپاتوتوکسیکی دارد و توسط سیستم اکسیدکننده میکروزومی وابسته به سیتوکروم P₄₅₀ متابولیزه می‌شود و با تولید رادیکال‌های آزاد و فعال تری-کلرومتیل و تری‌کلروپراکسیل منجر به پراکسیداسیون اسیدهای چرب غشاءسلولی و در نهایت استرس اکسیداتیو می‌گردد (۴۰-۳۸). در این شرایط، تعادل کلسیم در سلول‌ها نیز مختل می‌شود که هر دو عامل مذکور باعث مرگ سلولی

به نظر می‌رسد که اثر بخشی آن بر سمیت ایجاد شده از تتراکلریدکربن، بیش‌تر مربوط به وجود ترکیب‌های آنتی-اکسیدانی، مهار سیتوکروم P₄₅₀ و جمع‌کنندگی رادیکال‌های آزاد و مهار پراکسیداسیون لیپوزومال باشد. البته لازم به ذکر است برای پی بردن به این‌که این اثر مربوط به چه ترکیب یا ترکیب‌هایی است، مطالعه‌های بیوشیمیایی و فارموکولوژی بیش‌تری مورد نیاز است. همه این اثرهای شربت کامبوچا را به‌عنوان یک نوشیدنی کاربردی در مدیریت بیماری دیابت معرفی می‌کند.

سپاسگزاری

نویسندگان از تمام همکاران و دوستانی که در انجام این پژوهش همکاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

می‌شوند. با آسیب غشاء پلاسمای سلول‌های کبدی، ترانس آمینازها که شاخص‌ترین آنزیم‌های کبدی هستند از سیتوزول وارد جریان خون شده و غلظت آن‌ها در خون بالا می‌رود (۴۱، ۳۵).

آنتی‌اکسیدان‌ها قادرند در مقادیر کم، غشاهای سلولی و ترکیب‌های مختلف موجود زنده را در مقابل اکسیدان‌ها حفظ کنند (۴۳، ۴۲). در این مطالعه از تتراکلریدکربن به‌عنوان عامل ایجاد هپاتوتوکسیک و از شربت کامبوچا که محتوی آنتی‌اکسیدان است به‌عنوان دارو در نقش عامل محافظت‌کننده استفاده شد. همان‌طور که در جداول (۶) مشاهده می‌شود، تزریق تتراکلریدکربن موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آمینو ترانسفراز کبدی در گروه کنترل منفی نسبت به گروه‌های شاهد شده است که بیانگر تخریب هپاتوسیت‌ها و آزاد شدن این آنزیم‌ها از سیتوزول به درون پلاسماست. اما در گروه‌های آزمون تجربی ۱ و ۲ که شربت کامبوچا را به‌ترتیب به‌میزان ۲ و ۴ ml/kg دریافت نمودند، فعالیت این آنزیم‌ها کاهش یافت. این کاهش به موازات افزایش دوز مصرف دارو بیش‌تر نمایان شد و در مقایسه با گروه کنترل منفی، تفاوت معنی‌داری را نشان داد که مبین نقش محافظتی شربت کامبوچا بر سلول‌های کبدی است. در پژوهش Ahmad و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲، چای کامبوچا بر عملکرد مؤثر کبد و کلیه موش‌های صحرایی دیابتی اثر مشهودی بر جای گذاشت و در فعالیت آسپارات ترانس آمیناز، آلانین ترانس آمیناز و گاما گلوتامیل ترانس-پپتیداز کاهش معناداری مشاهده گردید که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد (۲).

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که شربت کامبوچا می‌تواند به‌طور معنی‌داری موجب کاهش میزان قندخون و در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین گردد. محتوای فنولی و اسیدهای آلی موجود در شربت کامبوچا می‌تواند اثرهای ضد دیابت آن را توضیح دهد. هم‌چنین شربت کامبوچا موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی (AST, ALT, ALP) در پلازما می‌گردد.

1. Talebi M, Frink LA, Patil RA, Armstrong DW. Examination of the varied and changing ethanol content of commercial Kombucha products. *Food Analytical Methods*. 2017;10(12):4062-7.
2. Aloulou A, Hamden K, Elloumi D, Ali MB, Hargafi K, Jaouadi B, et al. Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. *BMC complementary and alternative medicine*. 2012;12(1):63.
3. Dutta D, Gachhui R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2007;57(2):353-7.
4. Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M. A review on kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2014;13(4):538-50.
5. Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food microbiology*. 2014;38:171-8.
6. Martinez Leal J, Valenzuela Suárez L, Jayabalan R, Huerta Oros J, Escalante-Aburto A. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA-Journal of Food*. 2018;16(1):390-9.
7. Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, Chakraborty W, Bhattacharya D, Gachhui R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International journal of food microbiology*. 2016;220:63-72.
8. Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*. 2007;102(1):392-8.
9. Bhattacharya S, Gachhui R, Sil PC. Hepatoprotective properties of kombucha tea against TBHP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis. *Pathophysiology*. 2011;18(3):221-34.
10. Pauline T, Dipti P, Anju B, Kavimani S, Sharma S, Kain A, et al. Studies on toxicity, anti-stress and hepato-protective properties of Kombucha tea. *Biomedical and environmental sciences: BES*. 2001;14(3):207-13.
11. Dufresne C, Farnworth E. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food research international*. 2000;33(6):409-21.
12. Vīna I, Semjonovs P, Linde R, Deniņa I. Current evidence on physiological activity and expected health effects of kombucha fermented beverage. *Journal of medicinal food*. 2014;17(2):179-88.
13. Ong KC, Khoo H-E. Insulinomimetic effects of myricetin on lipogenesis and glucose transport in rat adipocytes but not glucose transporter translocation. *Biochemical pharmacology*. 1996;51(4):423-9.
14. Jayabalan R, Chen P-N, Hsieh Y-S, Prabhakaran K, Pitchai P, Marimuthu S, et al. Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells—characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. 2011.

15. Wang Y, Ji B, Wu W, Wang R, Yang Z, Zhang D, et al. Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014;94(2):265-72.
16. Bhattacharya S, Gachhui R, Sil PC. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. *Food and chemical toxicology*. 2013;60:328-40.
17. Jayabalan R, Subathradevi P, Marimuthu S, Sathishkumar M, Swaminathan K. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*. 2008;109(1):227-34.
18. Hosseini SA, Gorjian M, Rasouli L, Shirali S. A comparison between the effect of green tea and kombucha prepared from green tea on the weight of diabetic rats. *Biosci Biotechnol Res Asia*. 2015;20(1):141-5.
19. Srihari T, Karthikesan K, Ashokkumar N, Satyanarayana U. Antihyperglycaemic efficacy of kombucha in streptozotocin-induced rats. *Journal of Functional Foods*. 2013;5(4):1794-802.
20. Vázquez-Cabral BD, Rocha-Guzmán NE, Gallegos-Infante JA, González-Herrera SM, González-Laredo RF, Moreno-Jiménez MR, et al. Chemical and sensory evaluation of a functional beverage obtained from infusions of oak leaves (*Quercus resinosa*) inoculated with the kombucha consortium under different processing conditions. *Nutrafoods*. 2014;13(4):169-78.
21. Pure AE, Pure ME. Antioxidant and antibacterial activity of kombucha beverages prepared using banana peel, common nettles and black tea infusions. *Applied Food Biotechnology*. 2016;3(2):125-30.
22. Raza H, Prabu SK, Robin M-A, Avadhani NG. Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress. *Diabetes*. 2004;53(1):185-94.
23. Zubaidah E, Ifadah RA, Kalsum U, Lyrawati D, Putri WDR, Srinta I, et al. Anti-diabetes activity of Kombucha prepared from different snake fruit cultivars. *Nutrition & Food Science*. 2019.
24. Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J, Siegmund T, Finke R, et al. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997;82(1):143-6.
25. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circulation research*. 1999;85(4):357-63.
26. Jain SK, Kannan K, Lim G, Matthews-Greer J, McVie R, Bocchini JA. Elevated blood interleukin-6 levels in hyperketonemic type 1 diabetic patients and secretion by acetoacetate-treated cultured U937 monocytes. *Diabetes Care*. 2003;26(7):2139-43.
27. Santos MS, Santos DL, Palmeira CM, Seça R, Moreno AJ, Oliveira CR. Brain and liver mitochondria isolated from diabetic Goto-Kakizaki rats show different susceptibility to induced oxidative stress. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2001;17(3):223-30.
28. Eidi A, Eidi M, Esmaeili E. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 2006;13(9-10):624-9.
29. Desco M-C, Asensi M, Márquez R, Martínez-Valls J, Vento M, Pallardó FV, et al. Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes*. 2002;51(4):1118-24.
30. Wolf S. Diabetes mellitus and free radicals. *Br Med Bull*. 1993;49(3):642-52.

31. Motalleb G. Evaluation of Phenolic content and total antioxidant activity in *Berberis vulgaris* fruit extracts. 2005.
32. Hosseini SA, Rasouli L, Gorjian M, Yadollahpour A. A comparative study of the effect of Kombucha prepared from green and black teas on the level of blood glucose and lipid profile of diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*. 2016;5(2).
33. Abdel-Salam OM, Sleem AA, Shaffie NM. Effect of *Viscum album* on acute hepatic damage caused by carbon tetrachloride in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2010;40(3):421-6.
34. Rhoades RA, Bell DR. *Medical physiology: Principles for clinical medicine*: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
35. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*. 2006;99(1):191-203.
36. Batakov E. Effect of *Silybum marianum* oil and legalon on lipid peroxidation and liver antioxidant systems in rats intoxicated with carbon tetrachloride. *Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiya*. 2001;64(4):53-5.
37. Clawson GA. Mechanisms of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pathology and immunopathology Research*. 1989;8(2):104-12.
38. Amaral JS, Seabra RM, Andrade PB, Valentao P, Pereira JA, Ferreres F. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. *Food chemistry*. 2004;88(3):373-9.
39. Soni B, Visavadiya NP, Madamwar D. Ameliorative action of cyanobacterial phycoerythrin on CCl₄-induced toxicity in rats. *Toxicology*. 2008;248(1):59-65.
40. Tipoe GL, Leung TM, Liong EC, Lau TYH, Fung ML, Nanji AA. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces liver inflammation, oxidative stress and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury in mice. *Toxicology*. 2010;273(1-3):45-52.
41. Cos P, Rajan P, Vedernikova I, Calomme M, Pieters L, Vlietinck AJ, et al. In vitro antioxidant profile of phenolic acid derivatives. *Free radical research*. 2002;36(6):711-6.
42. Dkhil MA, Moniem AEA, Al-Quraishy S, Saleh RA. Antioxidant effect of purslane (*Portulaca oleracea*) and its mechanism of action. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011;5(9):1589-93.
42. Dkhil MA, Moniem AEA, Al-Quraishy S, Saleh RA. Antioxidant effect of purslane (*Portulaca oleracea*) and its mechanism of action. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011;5(9):1589-93.
43. Özbek H, Ugras S, Bayram I, Uygan I, Erdogan E, Öztürk A, et al. Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil: A carbon-tetrachloride induced liver fibrosis model in rats. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences*. 2004;31(1):9-17.