

بررسی تأثیر اسانس آویشن شیرازی بر روی متابولیسم گزنوبیوتیک‌ها در مسمویت حاد ناشی از نانوذرات آهن

حدیث کوهی نژاد^۱، آزاده رسولی^۱، رضا حاجی حسینی^{۲*}، آتوسا وزیری^۲ و میثم صغیری^۳

^۱ تهران، دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق، گروه بیوشیمی

^۲ تهران، دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

^۳ گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، دانشکده دامپزشکی، گروه دامپزشکی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۷

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۱



چکیده

با توجه به اهمیت آهن و نقش استرس اکسیداتیو در بروز سمیت آن، در مطالعه حاضر تأثیر نانوذرات آهن و نقش اسانس آویشن شیرازی در تعدیل مسمومیت حاد ناشی از نانوذرات آهن و کاهش سطح فعالیت مارکرهای بیوشیمیایی کبدی و کاهش سطح فعالیت آنزیمهای GST و CYP₄₅₀ مورد بررسی قرار گرفتند. موش‌های صحرایی نر بالغ به ۵ گروه و ۳ زیرگروه، کنترل منفی دریافت‌کننده نرمال سالین، کنترل مثبت دریافت‌کننده ۲۰۰ mg/kg نانوذرات آهن و گروه‌های تیمار با اسانس آویشن شیرازی تقسیم شدند. حیوانات به مدت ۳ روز ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg b.w اسانس آویشن را به صورت درون صفاقی دریافت کرده و سپس، موش‌ها کشته‌شده و بافت کبد به منظور بررسی‌های پاتولوژیکی و بیوشیمیایی برداشته شد. نتایج این تحقیق نشان داد که در بین مارکرهای سرمی، سطح AST سرم پس از تزریق نانوذرات آهن افزایش یافته که نشان‌دهنده آسیب هپاتوسیتها می‌باشد، همچنین تزریق نانوذرات پس از ۷۲ ساعت نیز باعث کاهش سطح فعالیت آنزیمهای GST و CYP₄₅₀ شده است. تیمار حیوانات با اسانس آویشن باعث بازگشت سطح فعالیت مارکر کبدی AST و بازگشت فعالیت آنزیم GST گردید و کانون‌های نکروتیک ناشی از آسیب نانوذرات آهن در هپاتوسیتها تحت تأثیر تیمار با اسانس آویشن کاهش یافت. بنابراین استفاده از نانوذرات آهن موجب آسیب به بافت کبدی و افزایش متابولیسم گزنوبیوتیک‌ها و تیمار با اسانس آویشن می‌تواند در جلوگیری و بهبود این آسیب‌ها مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس آویشن شیرازی، آنزیم متابولیز کننده داروها، نانو ذرات آهن، کبد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۲۴۴۱۵۱۱، پست الکترونیکی: hosseini@pnu.ac.ir

مقدمه

p450 میکروزومهای کبدی، باعث ایجاد متابولیت‌های سمی و فعال می‌شود که این امر می‌تواند موجب آسیب بافت‌های مختلف از جمله کبد شود (۲۹).

۸۰ درصد سلول‌های کبدی را هپاتوسیت‌ها تشکیل می‌دهند. ثبات و درستی غشای هپاتوسیت‌ها لازمه اعمال حیاتی کبد می‌باشد (۳۰). نانوذرات اکسید آهن با توجه به خصوصیات فیزیکوشیمیایی که دارند این ثبات را بر هم زده

کبد بزرگترین اندام در بدن است. یکی از مهمترین اعمال کبد سم‌زدایی مواد آلوده‌کننده محیطی و داروهای شیمیایی است (۶). سلولهای کبدی با استفاده از آنزیم‌های شبکه آندوپلاسمی صاف خود و به طریق اکسیداسیون و متیلاسیون، مواد متعددی نظیر الکل، استروئیدها و باریتوراتها را غیرفعال می‌سازند. در اکثر موارد، در طی عمل سم‌زدایی، فعالسازی متابولیکی توسط آنزیمهای سیتوکروم

غذاها استفاده می‌شود و به‌عنوان ترکیبات معطر در اکثر فرآورده‌های غذایی مهم نظیر مشروبات و دسرهای لبنیاتی استفاده می‌شود (۲۶). با توجه به مطالعات انجام‌شده استفاده از راهکارهای درمانی به‌منظور کاهش اثرات سمی نانوذرات مختلف ضروری به نظر می‌رسد. به همین دلیل در این مطالعه اثرات اسانس آویشن در تعدیل آسیب‌های کبدی ایجادشده توسط نانو ذرات و همچنین تأثیر آن در پارامترهای دخیل در متابولیسم گزنوبیوتیک‌ها و همچنین پارامترهای آسیب‌های کبدی در رت‌های تحت تیمار برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

تهیه اسانس آویشن شیرازی: تهیه اسانس آویشن شیرازی به روش تقطیر با آب توسط دستگاه تقطیر کلونجر (Clevenger): آویشن شیرازی به‌صورت تازه از شهر شیراز جمع‌آوری و توسط دکتر عصری شناسایی شد (Voucher Number: 41754) و مطابق با روش زیر اسانس آن به‌وسیله دستگاه تقطیر با آب کلونجر استخراج شد. در این روش، ۵۰ گرم از دانه‌ها توسط دستگاه مخلوط‌کن تبدیل به پودر شدند. سپس دانه‌های پودر شده در بالن یک لیتری دستگاه ریخته شد و با افزودن ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۹۰ دقیقه جوشانده شد. سپس در قسمت نزولی دستگاه کلونجر، فاز روغنی یا اسانس از آب جدا گردید (۱۷ و ۲۰).

آنالیز اسانس آویشن شیرازی به روش (GC-MS) Gas Chromatography – Mass Spectroscopy: در این روش، اسانس به‌دست‌آمده از آویشن به‌وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز یونی شعله‌ای، جدا سازی می‌شود. آنالیز نمونه‌ها بر اساس نرم‌افزار Euro Chrom 2000 (۴۷) توسط روش نرم‌الیزه کردن سطح و با استفاده از ستون سیلیکای مذاب DB-5 (۰/۲۵ μm ضخامت فیلم، ۳۰m × ۰/۲۵ mm) و

و موجب بروز اختلال در عملکرد کبد می‌گردند (۴۴). نانوذرات به علت اندازه منحصر به‌فردشان با خصوصیات فیزیکوشیمیایی ویژه بسیاری تولید می‌شوند و بدین‌وسیله می‌توانند خطرات پیش‌بینی‌نشده‌ای را برای سلامتی انسان داشته باشند. واکنش شیمیایی بیشتر نانو مواد منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد از جمله رادیکال‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) می‌شود. تولید ROS در محدوده متنوعی از نانو مواد شامل فولرن، نانولوله‌های کربنی و نانوذرات اکسید فلزی مشاهده شده است (۲۱). رادیکال‌های آزاد به غشای سلول آسیب می‌رسانند و با افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و شاخص‌های استرس اکسیداتیو منجر به التهاب بافت و مرگ سلول‌ها می‌شوند (۱۹ و ۳۶). با تولید نانوذرات آهن شناسایی سمیت و عوارض آن ضروری به نظر می‌رسد. لذا، در این مطالعه سمیت نانوذره آهن بر روی آنزیم‌های کبد موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

امروزه مصرف گیاهان دارویی باهدف دستیابی به داروهای کم‌خطر و با حداقل عوارض جانبی روز به‌روز در حال افزایش است و این به دلیل به اثبات رسیدن اثربخشی بسیاری از این مواد در مجامع علمی و مقبولیت آن در اکثر جوامع بشری است (۴۰). یکی از بزرگترین خانواده‌های گیاهی، خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است که دارای پراکنش جهانی می‌باشد (۳۶). آویشن شیرازی بانام علمی، *Zataria multiflora* از خانواده نعنائیان می‌باشد که در مناطق مرکزی و جنوبی ایران وجود دارد (۴۴). از آویشن در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و آرایشی استفاده متنوعی می‌شود. روغن آویشن دارای خواصی نظیر ضداسپاسم، بادشکن، ضدقارچ، ضدعفونی‌کننده، ضدکرم، ضدرماتیسم و خلط‌آور می‌باشد. اسانس آویشن از جمله ده اسانس معروف است که دارای خواص ضدالتهابی و ضدباکتریایی و ضدقارچی، آنتی‌اکسیدان، نگهدارنده طبیعی غذا و تاخیردهنده پیری پستانداران می‌باشد و جایگاه خاصی در تجارت جهانی دارد (۲۵ و ۲۸). همچنین آویشن در انواع

۱۰۰ با $\text{pH} = 7$ هموژن می‌گردد. هموژن بافت به مدت ۵ دقیقه در 3000 g سانتریفوژ می‌شود، سپس محلول رویی به چند میکروتیوپ منتقل شده و در فریزر نگهداری می‌شود.

اندازه‌گیری میزان آنزیم CYP 450 در هموژن بافت کبد: میزان پروتئین Cyp450 در هموژن بافت کبد طبق پروتکل، کیت خریداری‌شده از شرکت Biossay Technology به روش ELISA اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم GST در هموژن بافت کبد: در این روش ابتدا محلول ۱-کلرو-۲،۴-دی‌نیتروبنزن (CDNB) (2,4-dinitrobenzene-chloro ۲۰۱ میلی‌مولار و محلول ۲۰ گلوکوتایون میلی‌مولار تهیه می‌گردد. سپس هموژن بافت کبد سانتریفوژ شده و به محلول فوق اضافه می‌گردد. در نهایت میزان جذب نور در زمان‌های ۲،۱ و ۳ دقیقه پس از مخلوط کردن نمونه با محلول‌ها در طول موج 340 nm قرائت می‌گردد. در نهایت فعالیت آنزیم با توجه به فاکتور فعالیت محاسبه‌شده و فعالیت ویژه آنزیم نیز با تقسیم فعالیت آنزیم بر میزان پروتئین در هر نمونه محاسبه گردید.

اندازه‌گیری میزان پروتئین کل به روش برادفورد در هموژن بافت کبد (۱۲): ابتدا هموژن بافت کبد سانتریفوژ شده و پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها و همچنین محلول‌های استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA: Bovine Serum Albumin) به محلول برادفورد اضافه می‌شوند. پس از گذشت ۱۹ دقیقه میزان جذب نور در طول موج 595 nm قرائت شد. در نهایت غلظت پروتئین هر نمونه از روی منحنی استاندارد محاسبه گردید.

اندازه‌گیری سطح مارکرها آسیب کبدی در پلاسما: پس از خونگیری از قلب توسط سرنگ هپارینه، نمونه خون در 3000 دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و پلاسما جداسازی و در میکروتیوپ به فریزر منتقل شد.

اندازه‌گیری ALP و ALT و AST در پلاسما: سطح ALP و ALT و AST در پلاسما توسط کیت اندازه‌گیری

برنامه دمایی 250°C - 40°C در میزان $4^{\circ}\text{C}/\text{mm}$ ، دمای انژکتوری 250°C ، دمای آشکارساز 265°C و گاز حامل هلیوم (۹۹/۹۹٪) انجام می‌گیرد. دستگاه GC/MS شامل کروماتوگرافی گازی همراه با آشکارساز بوده و ستون مورد استفاده نیز همانند ستون GC با شرایط فوق‌الذکر است. اجزاء و ترکیبات نمونه‌ها توسط مقایسه طیف‌سنجی جرمی با استانداردهای موجود شناسایی می‌شوند. شناسایی ترکیبات مجهول توسط مقایسه شاخص‌های بازداري آنها با ترکیبات استاندارد انجام می‌گردد (۱۷ و ۲۰).

گروه‌های تیمار و نمونه‌گیری: در این تحقیق، از ۱۱۲ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن متوسط ۱۰۰ گرم استفاده گردید که از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. غذای حیوانات از کارخانجات فرآورده‌های غذایی تهران تهیه‌شده که به صورت پلت (Pellet) با فرمول استاندارد بود. حیوانات بالغ نیز دسترسی آزاد به غذا و آب آشامیدنی از طریق بطری داشتند. تیمار حیوانات به صورت زیر انجام شد.

- گروه کنترل منفی (۵ سر): حیوانات به مدت سه روز نرمال سالی (حلال نانوپارتيكل) و حلال اسانس (DMSO) به‌طور همزمان به‌صورت i.p دریافت می‌کنند.

- گروه کنترل مثبت (۵ سر): حیوانات به مدت سه روز، هرروز 200 mg/kg نانوذره آهن و حلال اسانس (DMSO) به‌طور همزمان به‌صورت i.p دریافت می‌کنند.

- گروه‌های تیمار با اسانس آویشن شیرازی (Z. multiflora Boiss. L.): حیوانات به مدت سه روز mg/kg

200 نانوذره آهن و 100 mg/kg b.w و 200 اسانس آویشن به‌طور همزمان به‌صورت i.p دریافت کرده و سپس، پس از سه روز موش‌ها کشته‌شده و بافت کبد به‌منظور بررسی‌های پاتولوژیکی و بیوشیمی برداشته می‌شود.

انجام آزمایشات بیوشیمیایی: تهیه هموژن بافت کبد: 150 میلی‌گرم بافت تهیه‌شده در $1/5$ میلی‌لیتر بافر فسفات mM

خریداری شده از شرکت پارس آزمون ایران و طبق پروتکل کیت اندازه‌گیری شد.

بررسی هیستوپاتولوژیک بافت کبد: بلافاصله پس از بیهوش کردن حیوان و خونگیری، بخشی از بافت کبد در بافر فرمالین قرار داده شده و پس از فیکس شدن بافت، تهیه لام و رنگ‌آمیزی آن، آسیب‌های هیستوپاتولوژیک توسط متخصص آسیب‌شناسی بررسی شد.

تجزیه و تحلیل آماری: آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-19 و آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) انجام شد (۴۸). اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از روش Tukey's بررسی شد. سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel ترسیم شده‌اند.

نتایج

بررسی آنالیز اسانس آویشن به روش (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy: GC-MS): براساس آنالیز انجام‌شده با روش GC-MS، ۱۲ نوع ترکیب

در اسانس استخراج شده از آویشن شیرازی شناسایی گردید (جدول ۱). چهار مورد از این ترکیبات بیشترین درصد اسانس را تشکیل دادند که به ترتیب شامل: Thymol (۶۱/۸۰٪)، Carvacrol (۱۰/۵۴٪)، γ -Terpinene (۴/۴۰٪) و p-Cymene (۷/۵۷٪) بود.

میزان آنزیم CYP 450 ۷۲ ساعت پس از تیمار حیوانات: تزریق نانوذرات آهن پس از ۷۲ ساعت باعث کاهش میزان فعالیت پروتئین CYP 450 گردید ($P < 0.05$)، اما مصرف اسانس آویشن شیرازی در دوزهای ۱۰۰ mg/kg b.w و ۲۰۰ تغییر در میزان فعالیت سطح پروتئین CYP 450 ایجاد نکرد (نمودار ۱) ($P > 0.05$).

میزان فعالیت آنزیم GST ۷۲ ساعت پس از تیمار حیوانات: تزریق نانوذرات آهن پس از ۷۲ ساعت باعث کاهش میزان فعالیت آنزیم GST گردید، مصرف اسانس آویشن شیرازی در دوزهای ۱۰۰ mg/kg b.w و ۲۱۰۰ باعث بازگشت فعالیت به حالت نرمال گردید (نمودار ۲) ($P < 0.05$).

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن

شماره	ترکیب	RI	%
۱	α -Thujene	۹۳۱/۸۶۹۸	۰/۳۹۳۷
۲	α -pinene	۹۴۰/۷۲۵۹	۲/۳۹۱۲
۳	β -pinene	۹۷۶/۷۹۰۵	۱/۰۶۹۲
۴	α -Terpinene	۱۰۳۱/۱۵۱۲	۰/۷۵۳۵
۵	p-Cymene	۱۰۳۹/۳۹۷۴	۷/۵۷۸۵
۶	γ -Terpinene	۱۰۷۳/۱۳۱۶	۴/۴۰۸۳
۷	Thymol	۱۳۰۶/۵۴۷۵	۶۱/۸۰۴۷
۸	Carvacrol	۱۳۱۵/۶۱۵۸	۱۰/۵۴۹۶
۹	Thymyl acetate	۱۳۵۸/۱۱۳	۲/۸۰۷۲
۱۰	Geranyl acetate	۱۳۷۳/۷۲۴۳	۰/۴۹۱۸
۱۱	E-caryophyllene	۱۴۵۸/۱۴۱۲	۲/۵۸۱
۱۲	Aromadendrene	۱۴۷۶/۲۹۵۳	۰/۹۹۹۶

مواردی که با سایه‌نشان داده شده‌اند، ترکیبات اصلی اسانس و میزان درصد نسبی آنها را نشان می‌دهد.

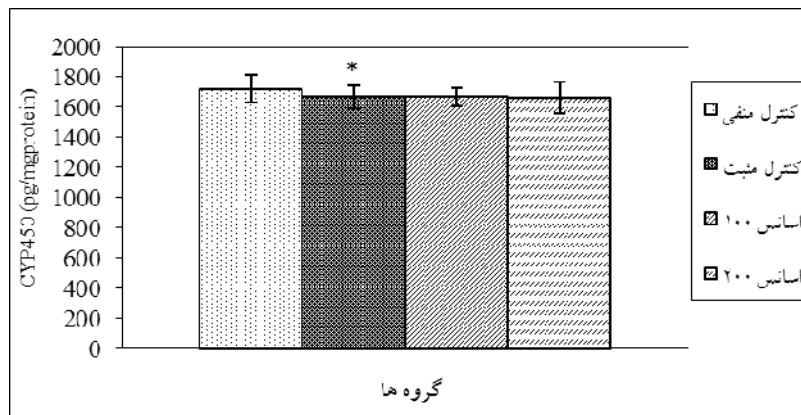
باعث افزایش فعالیت آنزیم AST گردید ($P < 0.05$)، ولی تأثیری بر فعالیت آنزیم ALT و ALP نداشت ($P > 0.05$).

بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی ۷۲ ساعت پس از تیمار حیوانات: تزریق نانوذرات آهن پس از ۷۲ ساعت

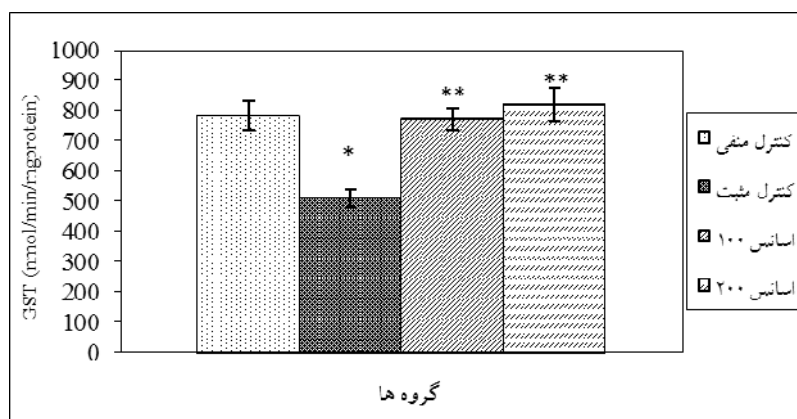
کبد نرمال است (شکل ۱، A1 و A2). در عین حال، دریافت ۲۰۰ mg/kg نانو ذرات آهن موجب القای نکرروز گسترده‌ی هپاتوسلولار و تخریب واکوئل‌ها شد (شکل ۱، B1 و B2). در حالی که در گروه تیمار شده با اسانس آویشن در دو دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg b.w نکرروز کوچک‌تر شده و نیز از آسیب هپاتوسلولار در این ناحیه تا حدی کاسته شد و تخریب واکوئل‌ها دیده نشد (شکل ۱، C1 و C2، D1 و D2).

مصرف اسانس آویشن شیرازی در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg باعث بازگشت میزان آنزیم AST به حالت نرمال گردید (نمودار ۳) ($P < 0/05$) در حالیکه بر روی آنزیم‌های دیگر کبدی بدون تأثیر بود (نمودار ۴ و ۵).

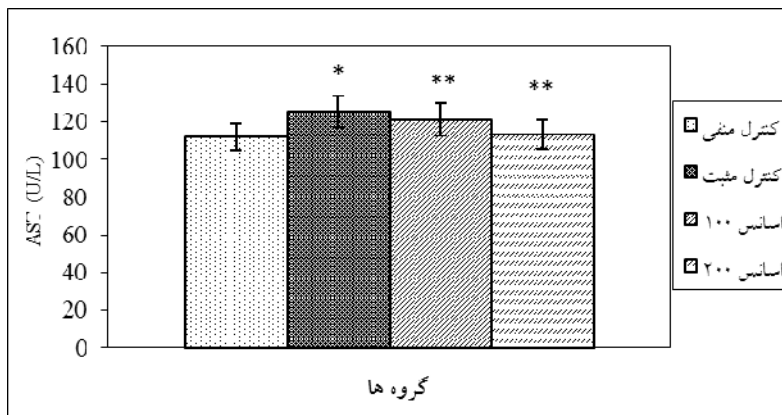
بررسی هیستوپاتولوژیک بافت کبد: نتایج بررسی‌های بافت‌شناسی نشان دادند که کبد حیوانات گروه کنترل طبیعی بوده، تخریب واکوئل، آسیب هپاتوسلولار و هیچ نکرزوی به چشم نخورد و ساختار هسته، سیتوپلاسم، هپاتوسیت‌ها و همچنین، بافت پارانشیم و لوبول‌ها در بافت



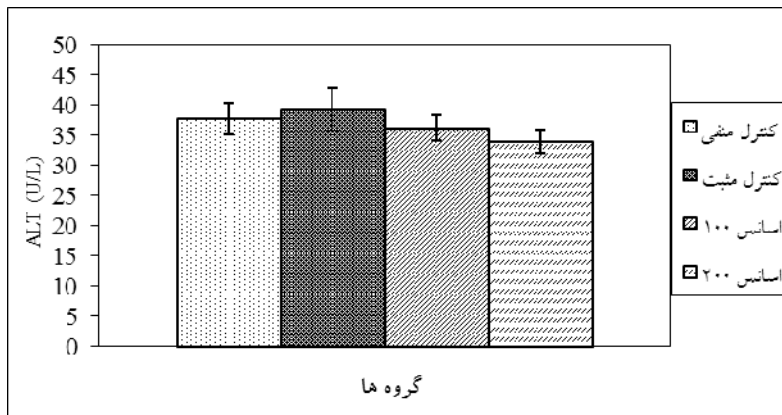
نمودار ۱- میزان فعالیت پروتئین CYP 450. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (mean \pm SEM) بیان شده است. علامت * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن نتایج در گروه نانو ذرات نسبت به گروه کنترل است ($P < 0/05$).



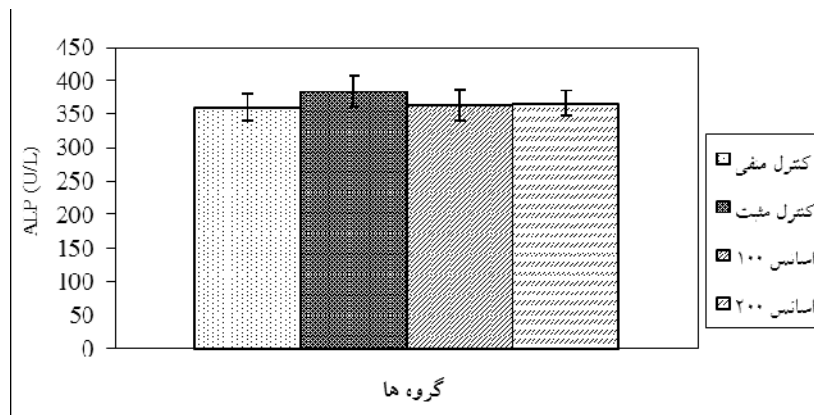
نمودار ۲- میزان فعالیت آنزیم GST. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (mean \pm SEM) بیان شده است. علامت * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن نتایج در گروه نانو ذرات نسبت به گروه کنترل است ($P < 0/05$).



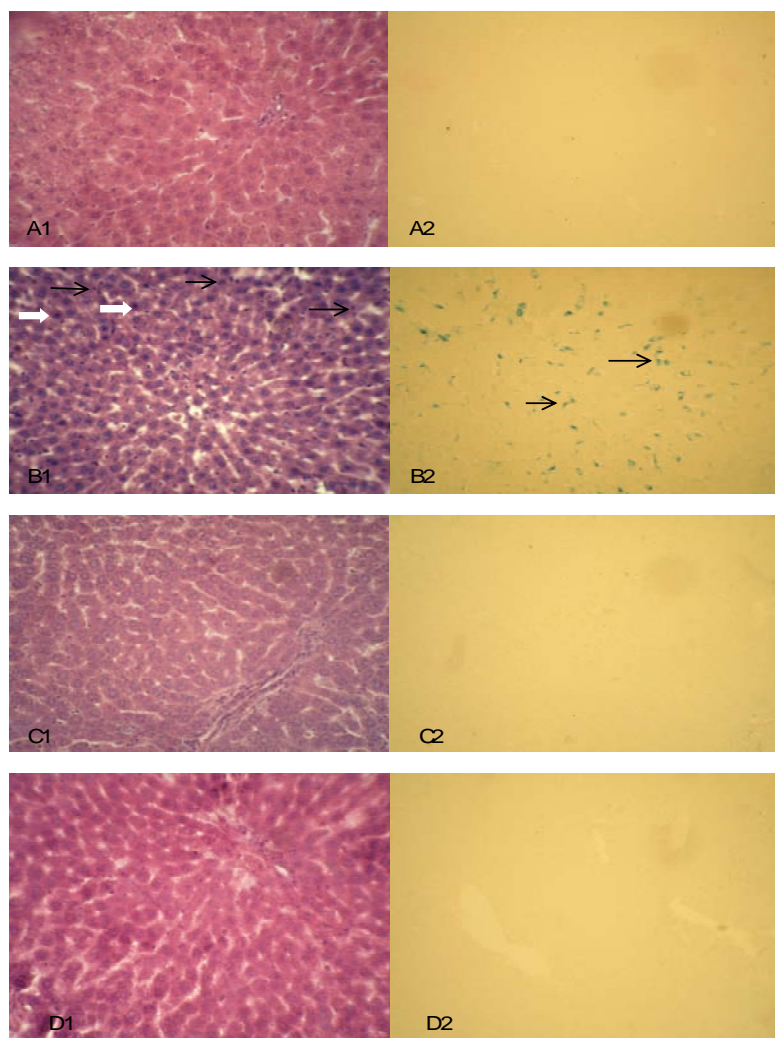
نمودار ۳- میزان فعالیت آنزیم AST. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (mean \pm SEM) بیان شده است. علامت * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن نتایج در گروه نانوذرات نسبت به گروه کنترل است ($P < 0/05$).



نمودار ۴- میزان فعالیت آنزیم ALT. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (mean \pm SEM) بیان شده است. علامت * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن نتایج در گروه نانوذرات نسبت به گروه کنترل است ($P < 0/05$).



نمودار ۵- میزان فعالیت آنزیم ALP. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (mean \pm SEM) بیان شده است. علامت * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن نتایج در گروه نانوذرات نسبت به گروه کنترل است ($P < 0/05$).



شکل ۱- تأثیر E.O بر تغییرات بافتی کبد بعد از تیمار با نانو ذرات آهن. A2 و A1: بافت کبد طبیعی در گروه کنترل. B2 و B1: بافت کبد در گروه نانو ذرات تیمار نشده با E.O، پارانشیم بافت کبد و لوپول‌ها مخصوصاً در اطراف سیاهرگ مرکزی روشن‌تر هستند. نکروز حاد هپاتوسیتی و تخریب واکوتول‌ها مشهود است. C2 و C1: بافت کبد حیوانات در گروه تیمار با نانو ذرات و اسانس آویشن، پارانشیم بافت کبد و لوپول‌ها بویژه نواحی periportal و midzonal روشن‌تر از نرمال است. تخریب واکوتول‌ها دیده نشد، ولی نکروز سلول‌ها نسبت به گروه نانو ذرات کاهش یافته است (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی ۱۰۰× و A, C و ۲۰۰× B, D).

بحث و نتیجه‌گیری

از نانو ذرات امروزه به‌عنوان مسئله‌ای جدید و خطرناک مطرح شده‌اند. در واقع این مورد به علت ماندگاری در محیط و زنجیره غذایی مسمومیت‌هایی را ایجاد می‌کند (۱۸) و (۳۵). رادیکال‌های آزاد به غشای سلول آسیب می‌رسانند و با افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و شاخص‌های استرس اکسیداتیو منجر به التهاب بافت و مرگ سلول‌ها می‌شوند

آلودگی محیط‌زیست، به‌عنوان یکی از مباحث بسیار مهم در زندگی بشر می‌باشد (۱ و ۲)، با توجه به استفاده گسترده از نانو تکنولوژی و نانو ذرات در زندگی امروزه و خطرات ناشی از استفاده گسترده بشر از این تکنولوژی، آلودگی‌های ناشی

اکسید تیتانیوم پیش‌بینی می‌شود واکنش‌های استرس اکسیداتیو و فعالیت گلوکوتاتیون در سلول‌های افزایش یابد (۱۶ و ۳۹). با توجه به مطالعات انجام‌شده روی نانوذرات اکسید آهن بدون پوشش، مشخص شده است که بسیاری از این نانوذرات اثرات سمی زیادی در سیستم‌های بیولوژیک اعمال می‌کنند (۲۷). آهن یکی از عناصر کلیدی در سلول‌های زنده می‌باشد که نقش مهمی در فرایندهای متابولیکی نظیر انتقال اکسیژن و الکترون، فسفریلاسیون اکسیداتیو، تولید انرژی، متابولیسم گزنوبیوتیک، سنتز DNA، رشد سلول، آپوپتوز، تنظیم بیان ژن و التهاب بازی می‌کند. همچنین، آهن به‌عنوان واسطه نکرور هپاتوسلولار و التهاب می‌تواند فرایندهای پراکسیداتیو را فعال و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن کند و از این طریق موجب آسیب رساندن به پروتئین و DNA گردد (۴۳). حیدرنژاد و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارشی کردند که تأثیر نانوذرات نقره ۳۰ نانومتری بر موش BALB/c سبب ایجاد تغییراتی در کبد شامل اتساع در ورید مرکزی، پرخونی، تورم و افزایش سلول‌های کوپفر و ارتشاح سلول‌های التهابی در مسیر وابسته به زمان شد که با نتایج ما در القای نکرور کبدی و تخریب واکوئل‌ها همخوانی داشت (۲۲). حسین و همکاران در سال ۲۰۰۵ سمیت نانوذرات نقره را بر کبد موش صحرایی مورد ارزیابی قرار دادند و پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در معرض نانوذرات میتوکندری نشت قابل ملاحظه و وابسته به دوز لاکتات دهیدروژناز را مشاهده کردند (۳۸).

پارک و همکاران تجویز خوراکی نانوذره نقره به موش ICR در طی ۲۸ روز باعث افزایش آنزیم‌های ALP، ALT و AST شد به طوری که در غلظت بالای نانوذره نقره این تغییرات معنی‌دار بود که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد (۳۴). آدیمی و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارشی کردند که مصرف خوراکی نانوذره نقره در موش نژاد ویستار باعث کاهش معنی‌دار آنزیم ALT و AST در غلظت ۱۰۰ mg/kg شد که با نتایج مطالعه ما

(۱۹ و ۳۶). در این تحقیق بعد از تیمار حیوانات با نانوذرات آهن همراه با اسانس آویشن شیرازی توانایی محافظتی این ترکیب طبیعی در برابر آسیب‌های ناشی از تزریق نانوذرات آهن بر روی متابولیسم گزنوبیوتیک‌ها و اندازه‌گیری میزان سطح پروتئین CYP 450 و میزان فعالیت آنزیم GST و سطح مارکرهای آسیب کبدی، ALT، AST، ALP در پلاسما، مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج این پژوهش نشان داد نانوذرات آهن بر روی عملکرد CYP 450 و GST اثر کرده و باعث کاهش عملکرد آن‌ها و آسیب کبدی می‌گردد (نمودار ۱ و ۲). آنزیم سیتوکروم P450 (CYP 450) در جانوران یکی از اولین سیستم‌های دفاعی است که از سلول در برابر عوامل شیمیایی سمی طبیعی که از گیاهان و طی غذاهای روزانه وارد بدن می‌شوند، حفاظت می‌کند. این آنزیم‌ها همین‌طور در برابر تأثیرات سمی مواد شیمیایی خارجی مقاومت ایجاد می‌کنند. هرکدام از این ترکیبات ممکن است مواد اکسیداتیو را به‌عنوان محصولات جانبی تولید کند که به DNA آسیب می‌رساند (۳۱). بعد از اتصال گزنوبیوتیک، سیتوکروم P450 مولکول اکسیژن و الکترون موردنیاز برای عملکرد خود را از NADPH می‌گیرد. سیتوکروم با آهن در مرحله اکسیداسیون (Fe III) به گزنوبیوتیک متصل می‌شود. بدین ترتیب آهن به آهن دو ظرفیتی احیا می‌شود. الکترون توسط کمپلکس NADPH به سیتوکروم P450 متصل می‌گردد و به مولکول اکسیژن اجازه اتصال می‌دهد (۲۳). همچنین گلوکوتاتیون-S_ترانسفراز (GST) باعث ساخته‌شدن آنزیم‌هایی با کارکردهای متعدد می‌شود که مسئول کاتالیز کردن ترکیبات کارسینوژنیک و سابتوتوکسیک از طریق کونژوگه کردن آنها به گلوکوتاتیون می‌باشد. به دلیل آنکه بسیاری از مواد سمی و مضر از طریق کونژوگه شدن با گلوکوتاتیون غیرفعال می‌شوند، گاهی با نقص در عملکرد GST می‌تواند باعث حساس شدن بافت‌های بدن به مواد سمی و سرطانزای شیمیایی شود (۲۴). همچنین در جریان مسمومیت ناشی از نانوذرات

کبدی ناشی از نانوذرات آهن را تا حدودی بهبود می‌بخشد. نتایج تحقیقات در مورد آنالیز ترکیب‌های اسانس آویشن و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی آن در *in vitro* نشان می‌دهد که تیمول و کارواکرول بیشترین میزان را در اسانس آویشن تشکیل می‌دهند (جدول ۱) و این دو ترکیب باعث خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار زیادی در اسانس می‌شوند (۳۹). یکی از ترکیبات اسانس آویشن به نام کارواکرول دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش می‌دهد و ممکن است بافت کبد را از آسیب‌های ناشی از سمیت مصون بدارد (۵) و (۲۹). سیاه‌دانه در اثر ترکیب با آهن مانع اکسیداسیون آن می‌شود. در بسیاری از بیماری‌ها مانند سیروز کبدی یا آسیب‌های کبدی ناشی از عفونت و مواد شیمیایی که رادیکال آزاد تولید می‌شود، عمل آنتی‌اکسیدانی سیاه‌دانه می‌تواند بسیار مفید واقع شود (۱۰، ۱۳ و ۳۳). دالی در سال ۱۹۹۹ جهت بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی پوست درخت دارچین و دانه‌های هل در موش‌های تغذیه‌شده با غذای پرچرب، غذای حاوی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، گلوکاتیون و رژیم پرچرب همراه با هل یا دارچین به موش‌ها خوراندند و گزارش کردند که فعالیت‌های آنزیماتیک آنتی‌اکسیدانی به‌طور معنی‌دار افزایش می‌یابد (۱۸). باتا چارجی و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مطالعه‌ای تحت عنوان مهار پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش فعالیت گلوکاتیون - S - ترانسفراز (Glutathion-s-transferase) به‌وسیله هل و دارچین در طی کارسینوژنیز کولون که به‌صورت شیمیایی در موش‌های آلبینو ایجاد شده نشان دادند که سوسپانسیون آبی هل و دارچین سبب افزایش سطح آنزیم دتوکسی‌فینگ (فعالیت گلوکاتیون - S - ترانسفراز) می‌شود و به‌طور همزمان سبب کاهش سطوح پراکسیداسیون لیپیدی در گروه‌های تیمار شده با محلول‌های آبی هل و دارچین نسبت به گروه کنترل که کارسینوژن هستند، می‌شوند (۱۱).

مطابقت ندارد (۴). علاوه بر این، نتایج حاصل از این تحقیق نشان‌دهنده افزایش میزان AST در ۷۲ ساعت پس از تیمار با نانوذرات آهن بود (نمودار ۳) ولی هیچ تغییری در میزان آنزیم‌های ALT و ALP مشاهده نشد (نمودار ۴ و ۵). نقش و همکاران گزارش کردند که تزریق درون صفاقی نانوذره ۴ نانومتری در موش نژاد ویستار باعث بیشترین آسیب به سلول کبدی در دوز ۵۰ ppm شد، در صورتی‌که در غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm تغییر معنی‌داری در آنزیم ALT حاصل نشد که با نتایج ما همخوانی نداشت (۳۲). آواشتی و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که تجویز دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره نقره به روش خوراکی (گاواژ) به موش آلبینو باعث افزایش آنزیم‌های ALT، ALP و AST و همچنین تغییرات هیستوپاتولوژی خفیفی مانند پر خونی در کبد شد (۸).

اگرچه مکانیسم‌های محافظتی درون‌سلولی به میزان زیادی آسیب‌های ناشی از ROS را کاهش می‌دهند، اما به علت فراوانی تولید این رادیکال‌های آزاد، وجود راه‌های محافظتی دیگری به‌ویژه آنتی‌اکسیدان‌های مواد غذایی برای سلامت انسان بسیار مهم می‌باشد. وجود ترکیبات طبیعی به‌ویژه نمونه‌های گیاهی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند دارای این ویژگی‌ها می‌باشد (۷ و ۴۲). تعدادی از گیاهان موجود در طب سنتی کشورهای مختلف به علت داشتن آنتی‌اکسیدان‌ها خاصیت محافظت کبدی را دارند (۹ و ۴۶). برای جلوگیری و کاهش و بهبود آسیب‌های حاصله ایجاد شده ناشی از این نانوذرات امروزه استفاده از گیاهان دارویی باهدف دستیابی به داروهای کم‌خطر و با حداقل عوارض جانبی روزبه‌روز در حال افزایش است و این به دلیل اثربخش و عوارض کم بسیاری از این ترکیبات می‌باشد.

در این تحقیق، تیمار حیوانات با اسانس آویشن از کاهش GST و افزایش AST جلوگیری کرده، در نتیجه آسیب‌های

سموم کبدی و رادیکال‌های آزاد هستند (۶، ۱۵ و ۴۵).

نتیجه‌گیری و پیشنهادات

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تیمار حیوانات با اسانس آویشن شیرازی، از طریق تعدیل پارامترهای دخیل در متابولیسم گزنوبیوتیک‌ها (GST، CYP 450) منجر به کاهش آسیب‌های بافتی کبد ناشی از مسمویت نانوذرات آهن شده است و میزان نکرور سلول‌های کبدی را کاهش می‌دهد. همچنین اسانس آویشن شیرازی منجر به مهار افزایش سطح AST سرم به‌عنوان مارکر آسیب کبدی شده است. این اثرات احتمالاً به قابلیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مؤثره اسانس آویشن نسبت داده می‌شود.

تزریق هم‌زمان عصاره پلی‌فنل بذر خارمریم و ریشه شیرین‌بیان همراه با تیواستامید موجب کاهش در مقایسه ALP و SGPT، SGOT، میزان بیلی‌روبین کل و فعالیت با گروه دریافت‌کننده تیواستامید گردید. این بدان معنی است که این عصاره‌ها دارای اثر حفاظتی مؤثری در سلول‌های کبدی در برابر آسیب ایجادشده توسط تیواستامید می‌باشند. علاوه بر این، در مطالعه‌ای نشان داده شد که کورکومین موجود در زردچوبه از طریق خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی خود دارای اثرات مفیدی بر روی آسیب کبدی رت‌های نژاد ویستار داشته است (۳). بررسی‌های بافت‌شناسی انجام‌شده نیز این نتایج را تأیید می‌کند. ترکیبات پلی‌فنلی از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشند (۱۴، ۳۷ و ۴۱). این ترکیبات و به‌خصوص فلاونوئیدها دارای اثر حفاظتی بر روی کبد در برابر آسیب‌های ناشی از

منابع

- ۱- بهرامی سیرمندی، س.، احمدی مقدم، ع.، و حسینی فرد، ج.، ۱۳۹۲. تأثیر اکتومیکوریز و زیاده‌مینیم بر غلظت چند عنصر غذایی (کلسیم، منیزیم، پتاسیم، فسفر و آهن، سدیم، روی، مس و منگنز) پسته رقم فندق، مجله زیست‌شناسی ایران، (۱) ۲۶، صفحات ۷۰-۸۱.
- ۲- نورانی آزاد، ح.، و کفیل زاده، ف.، ۱۳۹۰. تأثیر سمیت کادمیوم بر رشد، قندهای محلول، رنگیزه‌های
- 4- Adeyemi, O. S., and Adewumi, I., 2014. Biochemical Evaluation of Silver Nanoparticles in Wistar Rats, Int Sch Res Notices, ID 196091, 8 p.
- 5- Aeschbach, R., Loliger, R., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., and Aruoma, O. I., 1994. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol, Food Chem Toxicol, 32(1), PP: 31-6.
- 6- Amad, A., Pillari, K. K., Najimi, A. K., and Pal, S. N., 2002. Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post - treatment against thioacetamide induced hepatic damage. J Ethnopharmacol, 79, PP: 35-41.
- 7- Amin, G., 1991. Popular medicinal plants of Iran deputy minister of research publication, ministry of health, treatment and medical education, Tehran, 1, 40p.
- 8- Awasthi, K. K., Verma, R., Awasthi, A., Awasthi, K., and John, P. J., 2015. In vivo genotoxic assessment of silver nanoparticles in liver cells of Swiss albino mice using comet assay, Adv Mater Lett, 6(3), PP: 187-193.
- 9- Baghalian, K., and Naghdibadi, H. A., 2000. Aromatic plants, Andarz Publishers, First Edition, PP: 20 - 105 (Persian).
- 10- Beckstrom Sternberg, S. M., and Duke, J. A., 1994. Potential for synergistic action of

- phytochemicals in spices, In *Spices Herbs and Edible Fungi*, Elsevier Science: Oxford, PP: 201-23.
- 11- Bhattacharjee, S., Rana, T., and Sengupta, A., 2007. Inhibition of lipid peroxidation and enhancement of GST activity by Cardamom and Cinnamon during chemically induced colon carcinogenesis in swiss albino mice. *Asian Pac J Cancer Prev*, 8(4), PP: 578-82.
 - 12- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, PP: 248-54.
 - 13- Burits, M., and Bucar, F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil, *Phytother Res*, 14, PP: 323-8.
 - 14- Carreon, J. P., Iimenez, G. C., and Vega, J. L., 2002. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cellcultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicol in vitro*, 16, PP: 235-25.
 - 15- Chattopadhyay, R. R., 2003. Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract: Part II. *J Ethnopharmacology*, 62, PP: 31-39.
 - 16- Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., and Jia, G., et al., 2006. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo, *Toxicol Lett*, 163(2), PP: 109-20.
 - 17- Dadkhah, A., and Fatemi, F., 2011. Heart and kidney oxidative stress status in septic rats treated with caraway extracts. *Pharm Biol*, 49, PP: 679-686.
 - 18- Dhuley, J. N., 1999. Anti-oxidant effects of Cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark and greater Cardamom (*Amomum subulatum*) seeds in rats fed high fat diet. *Indian J Exp Biol*, 37(3), PP: 328-42.
 - 19- Droge, W., 2002. Free radicals in physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1), PP: 47-95.
 - 20- Fatemi, F., Asri, Y., Rasooli, I., Alipoor, Sh. D., and Shaterloo, M., 2012. Chemical composition and antioxidant properties of γ -irradiated Iranian *Zataria multiflora* extracts, *Pharm Biol*, 50(2), PP: 232-238.
 - 21- Hanini, A., Schmitt, A., Kacem, K., Chau, F., Ammar, S., and Gavard, J., 2011. Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility, *Inter J Nanomed*, 6, PP: 787- 94.
 - 22- Heydarnejad, M. S., Rahnama, S., MobiniDehkordi, M., Yarmohammadi, P., and Aslnai, H., 2014. Silver nanoparticles accelerate skin wound healing in mice (*Mus musculus*) through suppression of innate immune system. *Nanomed J*, 1(2), PP: 79-87.
 - 23- Hywel, L., Thomas, J., and Gillham, B., 1980. *Wills biochemical, Basic of Medical*, Second edition Chapter Xenobiotics Elsevier, 2013, pp, 469-486.
 - 24- Jaitovitch-Groisman, I., Fotohi, N., Schecter, R. L., and Woo, A., 2000. Modulation of glutathion-s-transferase alpha by hepatitis Bvirus and the chemopreventive drug Oltipraz, *J Biol Chem*, 275(43), PP: 33395-403.
 - 25- James, T.K., Rahman, A., and Douglas, J.A., 1992. Control of weeds in five herb crops, *Hort Absts*, 62, 9369 p.
 - 26- Leung, A. Y., and Foster, S., 1996. *Encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs, and cosmetics*. A Wiley Interscience Publication - John Wiley & Sons, Inc, 649 p.
 - 27- Mahmoudi, M., Simchi, A., Vali, H., Imani, M., Shokrgozar, M. A., Azadmanesh, K., and Azari, F., 2009. Cytotoxicity and Cell Cycle Effects of Bare and Poly (vinyl alcohol)-Coated Iron Oxide Nanoparticles in Mouse Fibroblasts. *Adv Eng Mater*, 11, PP: B243-B250.
 - 28- Malik, M. S., Sattar, A., and Khan, S. A., 1987. Essential oils of the species of labiatae, Part III. Studies on the essential oil of *Zataria multiflora*, *Pakistan J Sci Ind Res*, 30, PP: 751-753.
 - 29- Mitra, S. K., Venkataranganna, M. V., Sundaram, R., and Gopumadhavan, S., 1998. Protective effect of HD-03, a herbal formulatin, against various hepato toxic agents in rats. *J Ethnopharmacol*, 63, PP: 181-86.
 - 30- Mokhtari, M., Shariati, M., and geshmardi, N., 2007. Oral effects of lead on thyroid hormones and liver enzymes in rats, *Hormozgan Med J*, 11(2), PP: 115-20.
 - 31- Moure, A., Cruz, J. M., Fraco, D., Dominiguez, J. M., Sinerio, J., Dominguez, H., Minez, M. J., Cparjo, J., and Tony, A., 2001. Natural antioxidants from residual so arces, *Food Chem*, 72, PP: 145-171.
 - 32- Naghsh, N., Nuri, A., Aghababa, H., and Amirkhani Dehkordi, S., 2012. The effect of nanosilver particles on alanin aminotransferase (ALT) aactivity and white blood cells level in male wistar rats, in vivo condition, Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS), 13(9), PP: 1-7 (Persian).

- 33- Nagi, M. N., Alam, K., and Badary, O. A., 1999. Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *Biochem Mol Biol Int*, 47, PP: 143-59.
- 34- Park, E. J., Bae, E., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., and Lee, S.H., et al., 2010. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles, *Environ Toxicol Pharmacol*, 30(2), PP: 162-168.
- 35- Peter, H. H., Irene, B. H., and Oleg, V. S., 2004. Nanoparticles-known and unknown health risks, *J Nanobiothechnol*, 2(1), PP: 12-27.
- 36- Puntarulo, S., 2005. Iron Oxidative stress and Human Health. *Mole Aspe Med*, 26(4-5), PP: 299-312.
- 37- Pyo, Y. H., Lee, T. C., Logendra, L., and Rosen, R. T., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chem*, 85, PP: 19-26.
- 38- Hussain, S.M. and Schlager, J.J., 2009. Safety evaluation of silver nanoparticles: inhalation model for chronic exposure. *Toxicol Sci*, 108(2), pp. 223-224.
- 39- Shi, J. W., Zhang, F., Zhao, Y. L., and Chai, Z. F., 2006. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice, *Toxicol Lett*, 161(2), PP: 115-23.
- 40- Swan, D. K., and Ford, B., 1997. Chemoprevention of cancer: review of the literature. *Oncol Nurs Forum*, 24, PP: 719-727.
- 41- Toit, R., Volsteedt, Y., and Apostolides, Z., 2001. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicol*, 166, PP: 63-6.
- 42- Ulicna, O., Greksak, M., Vancova, O., Zlatos, L., Galbavy, S., Bozek, P., Nakano, M., 2003. Hepatoprotective Effect of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) on CCl4-Induced Liver Damage in Rats, *Physiol, Res*. 52, PP: 461-466.
- 43- Wang, J., and Pantopoulos, K., 2011. Regulation of Cellular Iron Metabolism, *Biochem J* 434, PP: 365-381.
- 44- Wise, J. P., Sr Goodale, B. C., Wise, S. S., Craig, G. A., Pongan, A. F., and Walter, R. B., et al., 2010. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquat Toxicol*, 97(1), PP: 34-41.
- 45- Yoshikawa, M., Xu, F., Morikawa, T., and Ninomya, K., Matsuda, H., 2003. New skeletal flavonoids with hepatoprotective activities from the desert plant *Anastatica hierochuntica*. *Bioorg Med Chem Lett*, 13, PP: 1045-1049.
- 46- Yuspa, H., 2000. Overview of carcinogenesis: past, present and future. *Medicine & Health & Science & Mathematics, Carcinogenesis*, 21, PP: 341-344.
- 47- Euro Chrom 2000 software (Knauer Company, Berlin, German).
- 48- Verma, J.P., 2012. Data analysis in management with SPSS software. Springer Science & Business Media.

Considering the *Zataria multiflora* essential oil effect on the xenobiotic metabolism in acute toxicity induced by iron nanoparticle

Kohi Nejad H.¹, Rasooli A.¹, Hajhosseini R.², Vaziri A.², Saghiri M.³

¹ Biochemistry Dept., Faculty of Sciences, Payame Noor University, East Tehran Branch, Tehran, I.R. of Iran

² Biochemistry Dept., Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran

³ Veterinary Medicine Dept., College of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Garmsar Branch, Garmsar, I.R. of Iran

Abstract

Considering the importance of iron and the role of oxidative stress in its toxicity, the purpose of this study was to compare the effect of iron nanoparticle and *Zataria multiflora* essential oils on the activity of biochemical markers of the liver, also activity of CYP₄₅₀ and GST enzymes was examined in this study. The adult male rats were divided into 5 groups and 3 subgroups, including negative control group receiving normal saline, positive control group receiving 200 mg/kg of iron nanoparticles, and treatment group receiving *Zataria multiflora* essential oils. The rats received 100 mg/kg b.w and 200 mg/kg b.w of *Zataria multiflora* E.O intraperitoneally. Then rats were killed, and their liver tissue was removed for pathologically and biochemically analyze. In the analysis of AST marker after 72 hours, the injection of iron nanoparticles resulted in an increase in activity of these markers, which shows the hepatocellular injury, and the injection of nanoparticles after 72 hours reduced the activity of CYP₄₅₀ and GST enzymes. It was found that the treatment of rat animal with *Zataria multiflora* E.O reactivated the liver marker and GST enzyme. Necrotic foci developed by the damage to iron nanoparticles in hepatocytes were reduced by the treatment with *Zataria multiflora* E.O. So, the use of iron nanoparticles results in damages to the liver tissue and increases in metabolism of xenobiotics, and the treatment with the *Zataria multiflora* essential oil can prevent and resolve these damages.

Key words: *Zataria multiflora* essential oil, drug-metabolizing enzyme, iron nanoparticles, liver