

The co-effect of deuterium depleted water and *Satureja rechingeri* essential oils on drug metabolizing enzyme activities in liver of rats treated with acetaminophen

Parvin ghaderi^{1*}, Faezeh Fatemi²

1. Graduate Student, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Nuclear Fuel Cycle Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran

(Received: Jan. 2, 2016 - Accepted: Apr. 24, 2016)

بررسی تأثیر مصرف همزمان آب فاقد دوتریوم و اسانس گیاه مرزه بر فعالیت آنزیم‌های متابولیزه‌کننده داروها در کبد رت‌های تحت تیمار با استامینوفن

پروین قادری^{۱*}، فائزه فاطمی^۲

۱. کارشناسی ارشد بیوشیمی دپارتمان زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲. دکترای بیوشیمی بالینی، استادیار پژوهشکده چرخه سوخت، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۲/۵)

Abstract

This study was carried out to investigate the hepatoprotective effect of deuterium depleted water with *Satureja rechingeri* essential oil on liver damage. For this purpose, the adult male rats were divided into 16 groups. The negative control group used tap water in 14 days following DMSO i.p injection at day 15th. The treatment group with acetaminophen received tap water in 14 days following 500mg/kg b.w. i.p injection of acetaminophen dissolved in 300ml DMSO at day 15th. The treatment groups receiving deuterium depleted water (30ppm and 60 ppm) plus i.p injection of *Satureja rechingeri* essential oil following 500 mg/kg b.w. acetaminophen injection at day 15th. Then, at 4,8,16 and 24 hours after acetaminophen injection, the blood was taken from hurt puncture and the liver tissues were removed. Then, the biochemical marker levels such as AST, ALT, ALP and bilirubin were measured in plasma. The glutathione s-transferase enzyme activity and protein level, cytochrome P₄₅₀ protein level and glutathione level were also estimated in liver homogenate. Findings indicated no significant changes in the level of serum parameters such as ALT, ALP and bilirubin in groups. While injecting acetaminophen decreased the levels of GST and GSH and increased significantly the level of CYP₄₅₀ and AST. Treatment with deuterium depleted water and *Satureja rechingeri* essential oils are effective in moderating the levels of these parameters, led to returning of these parameters to normal values. Finally, the treatment of rats with high dose of acetaminophen caused liver oxidative damage and using of deuterium depleted water and *Satureja rechingeri* essential oil can be effective in preventing and improving these damages.

Keywords: Acetaminophen, Deuterium Depleted Water, *Satureja rechingeri* Essential Oil, Drug Metabolizing Enzymes, Liver, GST, CYP₄₅₀.

چکیده

در پژوهش حاضر، به بررسی تیمار آب فاقد دوتریوم و اسانس مرزه رشینگری به صورت همزمان جهت پیشگیری از آسیب کبدی پرداخته شده است. بدین منظور، رت‌های نر بالغ به ۱۶ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل منفی ۱۴ روز آب معمولی مصرف کردند و حلال استامینوفن (DMSO) در روز ۱۵ به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه تیمار با استامینوفن، ۱۴ روز آب معمولی و استامینوفن با دز ۵۰۰ mg/kg b.w. در روز ۱۵، به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه‌های تیمار، به مدت ۱۴ روز، آب فاقد دوتریوم (DDW) در دوزهای ۳۰ ppm و ۶۰ ppm و اسانس مرزه دریافت کردند و همانند گروه قبل در روز پانزدهم استامینوفن به آن‌ها تزریق شد. سپس در زمان‌های ۴، ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت پس از تزریق استامینوفن، خونگیری از قلب و جداسازی بافت کبد انجام گرفت. بعد از آن، سطح فاکتورهای بیوشیمیایی نظیر آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و بیلی روبین در پلاسما و همچنین فعالیت آنزیم و سطح پروتئین گلوپروتئین-S- ترانسفراز (GST)، سطح پروتئین سیتوکروم P₄₅₀ (CYP₄₅₀) و گلوپروتئین (GSH) در هموزن بافت کبد اندازه گیری شد. نتایج این تحقیق نشان داد که سطح پارامترهای سرمی مانند ALT، ALP و بیلی روبین در هیچ یک از گروه‌ها تغییر معنی‌داری نداشته است، در حالی که تزریق استامینوفن منجر به کاهش فعالیت آنزیم GST، سطح GSH و افزایش سطح AST و CYP₄₅₀ شده است. تیمار حیوانات با آب فاقد دوتریوم و اسانس در تعدیل سطح این پارامترها مؤثر بوده، بگونه‌ای که باعث بازگشت سطح این پارامترها به مقادیر نرمال شده است. در پایان، تیمار رت‌ها با دوز بالای استامینوفن موجب آسیب اکسیداتیو کبدی شده و استفاده از آب فاقد دوتریوم و اسانس مرزه رشینگری می‌تواند در جلوگیری و بهبود این آسیب‌ها مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: استامینوفن، آب فاقد دوتریوم، اسانس مرزه، آنزیم‌های متابولیزه‌کننده داروها، کبد، GST، CYP₄₅₀.

مقدمه

استامینوفن (پاراستامول، ان استیل پارا آمینو فنل) رایج‌ترین دارویی است که خاصیت ضد تب و ضد درد با اثر التهابی ضعیف داشته و به طور وسیعی در علوم پزشکی و نیز توسط عامه مردم مورد استفاده قرار می‌گیرد (Adams *et al.*, 2001). در عرض دهه گذشته، مصرف استامینوفن به شدت افزایش پیدا کرده است و حدود ۴۰٪ داروهایی که مصرف می‌شوند، حاوی استامینوفن هستند (Adewusi, 2010). علت این موضوع را می‌توان به متابولیسم آسان، امکان تهیه بدون نسخه و قیمت ارزان آن نسبت داد. از سوی دیگر، بسیاری از پزشکان از عوارض مسمومیت با این دارو و جزئیات درمان آن اطلاعات کافی نداشته و بیش از حد این دارو را در اختیار همگان قرار می‌دهند (Allameh & Med, 1999). درمانی می‌تواند سبب مسمومیت کبدی در انسان و حیوان آزمایشگاهی شود (Allameh, 1999). مصرف بیش از حد این دارو به همان اندازه که در دوزهای درمانی، دارویی مؤثر و نسبتاً بی‌خطر معرفی شده است، ولی در دوزهای فوق استامینوفن، به عنوان علت اولیه نارسایی حاد کبد شناسایی شده است (Bradford, 1976) و در دوزهای مکرر فوق درمانی، باعث نارسایی برق‌آسای کبدی یا هیپاتیت فولمینانت نکرودهنده خواهد شد (Canatese & Med, 1981). در دوزهای درمانی، مسیر اصلی متابولیسم استامینوفن، گلوکوروئیداسیون و سولفاتاسیون در کبد می‌باشد که باعث ایجاد متابولیک‌های محلول در آب به نام اسید مرکاپتوریک گردیده و از طریق کلیه‌ها دفع می‌گردد. در حدود ۱۰-۵٪ استامینوفن توسط سیستم آنزیمی P₄₅₀ متابولیزه شده و حد واسط بسیار فعال ان استیل پاراکوئینین (NAPQI) را تولید می‌کند. این متابولیت الکتروفیل توسط گلوکوتاتیون، احیاء و به فرم مرکاپتوریک اسید دفع می‌شود (Catherine, 1996). چندین سیتوکروم P₄₅₀ می‌توانند استامینوفن را به NAPQI تبدیل

کنند که شامل CYP3A، CYP1A2، CYP2E1 (Chattopadhyay, 2003) و CYP2A6، CYP2D6 (Chiu, 1978) می‌باشند. در این میان، CYP2E1، CYP1A2 و CYP3A نقش برجسته‌ای در مسمومیت ناشی از استامینوفن ایفا می‌کنند (Chiu, 1978). در شرایط طبیعی، NAPQI به‌وسیله کانژوگاسیون با گلوکوتاتیون سم‌زدایی می‌شود. در مسمومیت با استامینوفن به دنبال حذف گلوکوتاتیون سلولی، NAPQI به ماکرومولکول‌های سلولی باند می‌شود و به دنبال آن آسیب هپاتوسلولار و مرگ سلولی ایجاد می‌گردد. عقیده بر این است که مسمومیت کبدی استامینوفن زمانی ایجاد می‌شود که ذخیره گلوکوتاتیون به کمتر از ۳۰ درصد نرمال برسد (Chun, 2009). از طرف دیگر، ان استیل پاراکوئینین (NAPQI) به عنوان یک رادیکال آزاد باعث کاهش میزان (GSH) کبدی و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. همچنین، تولید رادیکال سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن در میتوکندری بعد از مصرف زیاد استامینوفن افزایش می‌یابد و افزایش سطح رادیکال‌های آزاد منجر به آغاز پراکسیداسیون لیپیدی و در نهایت نکروز سلول‌های کبدی می‌شود (Council on Scientific Affairs, 1978). به علاوه، تورم سلولی و پرخونی غیر فعال کبدی از نخستین تغییرات مسمومیت کبدی استامینوفن در انسان، رت، موش، سگ، خوک و هامستر گزارش شده است (Dadkhah, 2001; Dadkhah, 2014). در مدت زمان طولانی‌تر با خونریزی و نکروز مرکز لبولی و نفوذ و تجمع ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها نواحی نکروزه ادامه می‌یابد (Allameh, 1999). نکروز کبدی منجر به افزایش سطح سرمی آنزیم‌های اسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) شده، که از کبد به خون آزاد می‌شوند (Dong, 2000; El-Banna, 2013).

کارواکرول^۱ بیش از ۹۰ درصد، پاراسیمن^۲، گاما ترپینن^۳، لیمونن^۴، ۱ و ۸ سینئول^۵، اوژنول^۶، میرسن^۷ و آلفاتوژن می‌باشد. کارواکرول از نظر دارویی به عنوان ضد عفونی کننده، میکروب کش و قارچ کش به کار می‌رود. از بین گونه‌های مختلف مرزه بومی ایران، اسانس و عصاره‌های حاصل از دو گونه مرزه خوزستانی و رشینگری غنی از ترکیبات فنلی کارواکرول در اسانس و اسیدهای فنلی آزاد، به ویژه رزمارینیک اسید در عصاره بوده و به همین جهت از فعالیت بیولوژیکی قابل توجهی برخوردار می‌باشند (Heidarian, 2011).

از آن‌جا که تاکنون مطالعه‌ای در مورد مکانیسم تأثیر آب فاقد دوتریوم (DDW) و اسانس مرزه در برابر داروهای هیپاتوتوکسیک نظیر استامینوفن صورت نگرفته است، در این پژوهش مکانیسم اثر DDW به همراه اسانس مرزه رشینگری بر روی فعالیت و سطح آنزیم‌های متابولیزه کننده استامینوفن و شاخص‌های آسیب بافتی القاء شده توسط استامینوفن در رت بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه و آب فاقد دوتریوم

آب فاقد دوتریوم از مجتمع آب سنگین اراک، سازمان انرژی اتمی ایران تهیه شده است. علاوه بر این، گیاه مرزه رشینگری در فصل تابستان از منطقه خرم‌آباد استان لرستان جمع‌آوری شد. نمونه‌های گیاهی به مدت یک هفته در دمای اتاق و به دور از نور خورشید خشک و سپس جهت اسانس‌گیری به آزمایشگاه منتقل گردید.

از آن‌جایی که آسیب کبدی ناشی از استامینوفن منجر به مرگ می‌شود، دستیابی به ترکیباتی که اثرات آن را خنثی کند، ضروری به نظر می‌رسد. امروزه مصرف عناصر طبیعی با هدف دستیابی به داروهای کم خطر و با حداقل عوارض جانبی، روز به روز 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 (Fatemi, 2010a). از جمله این عناصر و مواد طبیعی کم ضرر و یا بی‌ضرر، می‌توان به آب سبک یا آب فاقد دوتریوم Deuterium Depleted Water یا DDW اشاره کرد. آب سبک، دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی است و باعث تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول می‌شود (Fatemi, 2011). آب فاقد دوتریوم بیشتر به عنوان آب سبک شناخته شده است که ظاهر فیزیکی آن بی‌رنگ، طعم‌دار و با مقدار کمی یون است (Fatemi, 2010b). خواص دوتریوم متفاوت از هیدروژن می‌باشد و گاهی می‌تواند به عنوان یک عنصر غیر وابسته باشد. تقریباً یک اتم از هر ۶۴۰۰ اتم هیدروژن، دوتریوم است. استفاده طولانی مدت از آب سبک، منجر به کاهش شدت آسیب‌های ناشی از قرار گرفتن در معرض اشعه گاما شده و نیز باعث بازیابی سیستم pro-oxidant/anti-oxidant می‌شود (Garba, 1992).

از سوی دیگر مطالعات اخیر نشان داده است که ترکیبات طبیعی حاصله از گیاهان دارویی نقش مؤثری در بالابردن توانایی بدن برای سم‌زدایی مواد شیمیایی و دارویی دارد (Giulivi, 1992). گیاه دارویی مرزه رشینگری (*Satureja rechingeri*) که در این پژوهش به آن پرداخته شده است، گیاهی است متعلق به خانواده نعناع، چندساله و معطر؛ و از جمله گیاهان با ارزش و انحصاری فلور ایران می‌باشد که در مناطق خشک، آفتابی و خاک‌های سنگلاخی آهکی ایران رشد می‌کنند (Goodall, 2003; Guo, 2008; Ying Zuo, 2008; Hayes, 1995). مهمترین ترکیبات شیمیایی اسانس مرزه رشینگری شامل

1. Carvacrol
2. P-Cymene
3. Terpinene
4. Limonene
5. 1-8-Cineole
6. Eugenol
7. Myrcene

تهیه اسانس گیاهی

اسانس‌گیری از نمونه‌ها به روش تقطیر با آب مقطر توسط دستگاه کلونجر انجام گرفت. تقطیر در چندین مرحله انجام شد. در هر مرحله، میزان ۱۵۰ گرم از هر نمونه به بالن ۲ لیتری دستگاه منتقل و به آن ۱۵۰۰ سی‌سی آب مقطر اضافه شد. سپس، بالن به دستگاه کلونجر منتقل شده و پس از گذشت ۳ ساعت، در قسمت نزولی دستگاه، فاز روغنی قابل جداسازی گشت. اسانس حاصل در میکروتیوپ و در فریزر نگهداری شد (Hinson, 1981; James, 2003a; Jose, 2000; James, 1499-1506).

تجزیه اسانس به وسیله دستگاه GC/MS

اسانس به دست آمده از گیاه مرزه رشینگری به وسیله دستگاه گروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز یونی شعله‌ای^۱، جداسازی شد. آنالیز نمونه‌ها بر اساس نرم‌افزار Euro Chrom 2000 توسط روش نرمالیزه کردن سطح^۲ و با استفاده از ستون سیلیکای مذاب DB-5 (۰/۲۵ μ m/۳۰m \times ۰/۲۵mm) ضخامت فیلم، و برنامه دمایی^۳ ۲۵۰-۴۰ $^{\circ}$ C در میزان ۴ $^{\circ}$ C/mm، دمای انژکتوری ۲۵۰ $^{\circ}$ C، دمای آشکارساز ۲۶۵ $^{\circ}$ C و گاز حامل هلیوم (۹۹/۹۹٪) انجام گرفت. شناسایی ترکیبات مجهول توسط مقایسه شاخص‌های بازداری آن‌ها با ترکیبات استاندارد انجام می‌گردد (Hinson, 1981; James, 2003a; Jose, 2000; James, 1499-1506).

آشامیدنی از طریق بطری داشتند. حیوانات در ۱۶ گروه تقسیم شدند. در گروه کنترل منفی (NC)، حیوانات با آب معمولی به مدت ۱۴ روز تیمار شده و حلال استامینوفن (DMSO) در روز پانزدهم به صورت i.p به آن‌ها تزریق شد. در گروه کنترل (C)، حیوانات با آب معمولی به مدت ۱۴ روز تیمار شده و استامینوفن در دوز mg/kg.bw ۵۰۰ در روز ۱۵، به صورت i.p تزریق گردید. در گروه‌های تیمار، تیمار حیوانات با DDW در دو دوز ppm ۶۰ و ۳۰ به علاوه تزریق اسانس مرزه در دوز mg/Kg bw ۲۰ به صورت i.p به مدت ۱۴ روز انجام گردیده و استامینوفن در دوز mg/kg.bw ۵۰۰ به صورت i.p در ۱۵ روز تزریق گردید.

تهیه بافت هموزن و پلاسما

در زمان‌های مختلف پس از تزریق استامینوفن (۴، ۸، ۱۶، ۲۴ ساعت)، رت‌ها بیهوش شده و از بافت قلب حیوانات خونگیری شد. سپس، خون‌های جمع‌آوری شده به وسیله سانتریفیوژ با نیروی ۱۰۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سرم آن جدا و فوراً به فریزر منتقل گردید. بافت کبد رت‌ها نیز به منظور بررسی‌های هیستوپاتولوژیک و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها برداشته شد. بخشی از بافت کبد جهت مطالعات هیستوپاتولوژیک در بافر فرمالین و مابقی جهت بررسی‌های بیوشیمیایی در فویل آلومینیوم به فریزر منتقل گردید.

آزمایشات بیوشیمیایی

اندازه‌گیری پروتئین سیتوکروم P₄₅₀

میزان سطح پروتئین CYP₄₅₀ در هموزن بافت کبد طبق پروتکل کیت خریداری شده از شرکت Biossay Technology به روش ELISA اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری پروتئین GST

میزان سطح پروتئین GST طبق پروتکل کیت خریداری شده از شرکت Biossay Technology به روش ELISA اندازه‌گیری شد.

تیمار حیوانات

موش‌های نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۰ \pm ۱۵۰ گرم و سن ۳-۴ ماهه از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. غذای حیوانات از کارخانجات فرآورده‌های غذایی تهران تهیه شده، که به صورت Pellet با فرمول استاندارد بود. حیوانات بالغ نیز دسترسی آزاد به غذا و آب

1. Flame ionization detector
2. Area normalization

اندازه‌گیری فعالیت GST

میزان فعالیت آنزیم GST کبد به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از CDNB به عنوان سوبسترا بر اساس روش Habig *et al.* (1974)، اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم برحسب nmol/min/mg پروتئین در نمونه‌ها با استفاده از روش برادفورد و همکاران (۱۹۷۶) محاسبه گردید (Goodall, 2003).

اندازه‌گیری گلوپاتین احیا (GSH)

تخمین گلوپاتین احیا در بافت هموژنه بر اساس روش Seldak & Lindsay (1986) انجام گرفت (Guo Ying Zuo, 2008).

آزمایش‌های عملکرد کبدی

به منظور سنجش عملکرد و میزان آسیب بافت کبد، میزان آنزیم‌های سرمی آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و میزان بیلی روبین تام به روش اسپکتروفتومتری طبق پروتکل کیت خریداری شده از شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری شدند.

مطالعات هیستوپاتولوژی

بخش‌های کوچکی از بافت کبد جدا گردید و در فرمالین ۱۰٪ تازه تهیه شده قرار داده شد. نمونه‌ها در اندازه ۶ میکرومتری برش داده و رنگ‌آمیزی شدند. شاخص شدت آسیب بافت کبد بر اساس دژنراسیون واکوتلی و نکروز هپاتوسیت‌ها اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

اختلافات و تفاوت‌های بین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و تست ANOVA تعیین گردید. با استفاده از این نرم‌افزار، Pvalue و SEM داده‌ها، مشخص شد که در نمودارها نشان داده شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم شده‌اند.

نتایج

آنالیز اسانس مرزه رشینگری

ترکیبات بر اساس مقایسه زمان نگهداری نسبی با استانداردها شناسایی شدند (Hayes, 1995). بر اساس آنالیز انجام شده به روش GC/MS، ۲۷ نوع ترکیب در اسانس استخراج شده از گیاه مرزه رشینگری شناسایی گردید که بیشترین میزان ترکیبات مربوط به Cymene-ortho (۵۸/۹۸٪) و Bisabolene-beta (۱۴/۱۳٪) و Terpinen-4-ol (۴/۲۰٪) می‌باشد (جدول ۱).

میزان فعالیت آنزیم GST در زمان‌های مختلف

پس از تیمار حیوانات

همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، فعالیت آنزیم GST در بافت کبد ۱۶ ساعت پس از تزریق استامینوفن به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل منفی کاهش می‌یابد و کاهش فعالیت این آنزیم، تا ۲۴ ساعت پس از تزریق استامینوفن نیز ادامه دارد ($P < 0/05$). درحالی‌که با توجه به نمودارهای ۲ و ۳، تیمار حیوانات با آب فاقد دوتریوم و اسانس منجر به افزایش فعالیت آنزیم GST نسبت به گروه استامینوفن، در ساعات ۱۶ و ۲۴ پس از تزریق استامینوفن به صورت معنی‌داری می‌شود ($P < 0/05$).

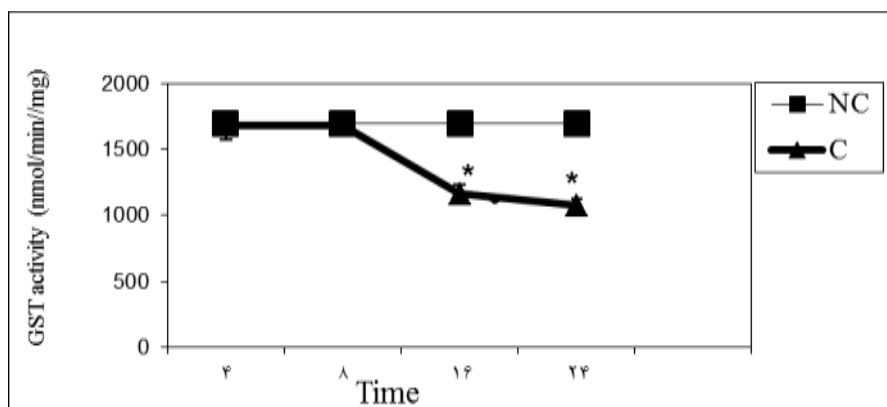
میزان فعالیت پروتئین GST در زمان‌های مختلف

پس از تیمار حیوانات

همان‌طور که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود، فعالیت پروتئین GST در بافت کبد، ۱۶ ساعت پس از تزریق استامینوفن به‌صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل منفی کاهش می‌یابد و کاهش فعالیت این آنزیم، تا ۲۴ ساعت پس از تزریق استامینوفن نیز ادامه دارد ($P < 0/05$). درحالی‌که با توجه به نمودارهای ۵ و ۶ تیمار حیوانات با آب فاقد دوتریوم و اسانس منجر به افزایش فعالیت پروتئین GST نسبت به گروه استامینوفن، در ساعات ۱۶ و ۲۴ پس از تزریق استامینوفن به‌صورت معنی‌داری می‌شود ($P < 0/05$).

جدول ۱. نتایج حاصل از آنالیز GC/MS مرزه رشینگری

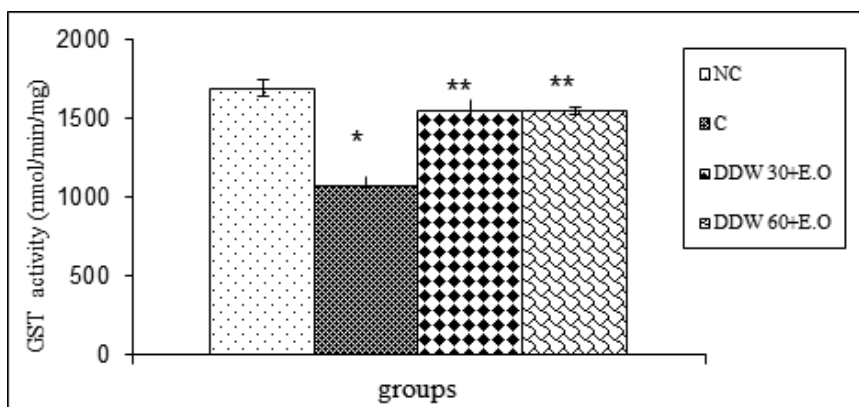
Num.	Common Name	RT	RI	Area	% Area
۱	Pinene-alpha	۶/۸۳	۹۳۵	۲۳۲۳۲۶۰/۸۲	۲/۰۴
۲	Pinene-beta	۸/۰۸	۹۷۷	۲۲۶۰۷۶۴۱/۳	۱/۹۹
۳	Cymene-ortho	۸/۹۸	۱۰۲۳	۶۶۶۹۸۱۷۵۲	۵۸/۸۹
۴	Limonen-alpha	۹/۰۴	۱۰۳۲	۱۳۶۷۹۰۷۰/۵	۱/۲۰
۵	Cymenene-para	۱۰/۴۶	۱۰۹۰	۱۲۲۱۰۱۴۲/۸	۱/۰۷
۶	Linalool	۱۰/۵۶	۱۰۹۷	۳۵۱۷۵۴۱۹/۸	۳/۰۹
۷	Borneol	۱۰/۳۲	۱۱۷۱	۷۹۴۷۳۶/۹۲۹	-/۰۷
۸	Terpinen-4-ol	۱۲/۴۷	۱۱۷۵	۴۷۷۷۹۸۲۶/۶	۴/۲۰
۹	Thymyl acetate	۱۲/۹۷	۱۱۸۶	۲۸۵۴۵۳۰/۰۱	-/۲۵
۱۰	Terpineol-alpha	۱۳/۱۵	۱۱۹۰	۱۶۲۱۵۱۵۱/۴	۱/۴۳
۱۱	Carvacrol methyl ether	۱۳/۰۶	۱۲۴۰	۱۱۶۷۱۸۸۱/۹	۱/۰۳
۱۲	Thymol	۱۴/۶۹	۱۲۹۲	۵۳۹۹۷۰۳/۰۲	-/۴۷
۱۳	Thymol acetate	۱۴/۸۷	۱۲۹۴	۳۰۹۲۷۴۷۴/۸	۲/۷۲
۱۴	Carvacrol	۱۵/۳۸	۱۲۹۹	۱۵۶۳۹۴۱۹/۲	۱/۳۸
۱۵	Eugenol	۱۶/۰۶	۱۳۵۵	۹۶۱۷۳۳۹/۳۷	-/۸۵
۱۶	Carvacrol acetate	۱۶/۱۸	۱۳۷۵	۶۳۱۵۵۷۵/۰۷	-/۵۶
۱۷	Caryophyllene	۱۷/۲۵	۱۴۰۶	۲۱۰۰۶۷۷۱/۲	۱/۸۵
۱۸	Bergamotene	۱۷/۰۴	۱۴۱۶	۴۵۸۵۳۹۱/۱۳	-/۴۰
۱۹	Geranyl acetate	۱۷/۶۶	۱۴۵۵	۳۴۶۱۷۲۲/۰۲	-/۳۰
۲۰	Humulene-alpha	۱۷/۰۹	۱۴۵۹	۱۲۸۴۴۹/۴۴	-/۱۱
۲۱	Curcumene(ar)	۱۸/۳۱	۱۴۸۱	۲۶۶۰۹۴۴/۳۵	-/۲۳
۲۲	Bisabolene-beta	۱۸/۷۷	۱۵۰۴	۱۶۰۶۹۷۱۹۱	۱۴/۱۳
۲۳	Caryophyllene oxide	۲۰/۱۸	۱۵۸۰	۷۹۹۲۱۸۱/۰۸	۰/۷
۲۴	Rosifoliol	۲۰/۴۴	۱۶۰۱	۴۸۶۰۲۴۱/۳۶	-/۴۳
۲۵	Eudesmol-gamma	۲۱	۱۶۳۲	۸۱۶۲۱۲/۰۵۹	-/۰۷
۲۶	Hinesol	۲۱/۳۵	۱۶۴۵	۵۴۶۲۵۳/۲۱۲	-/۰۵
۲۷	Bisabolol epi-alpha	۲۱/۸۳	۱۶۸۵	۵۴۳۱۸۹۸/۲۴	-/۴۸
	Total			۱۱۳۷۱۱۴۹۲۷	-/۱۰۰



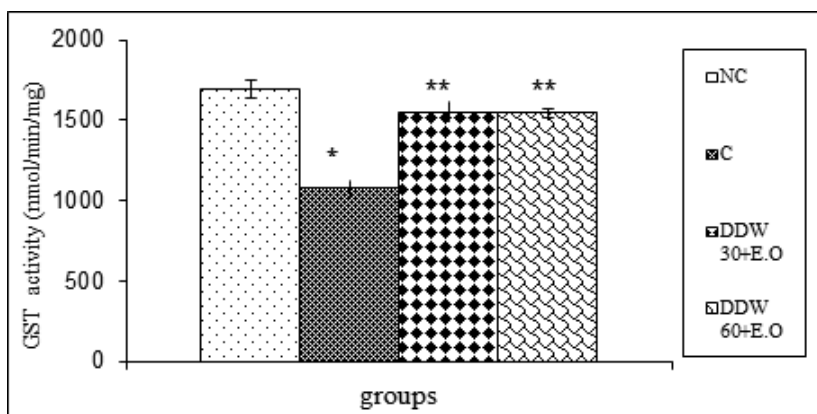
نمودار ۱. تغییرات دوره زمانی در فعالیت GST در موش‌های رت تیمار شده با APAP در مقایسه با گروه کنترل منفی.

NC: گروه کنترل منفی، C: گروه کنترل. داده‌ها میانگین \pm S.E.M. پنج نمونه از هر گروه می‌باشد.

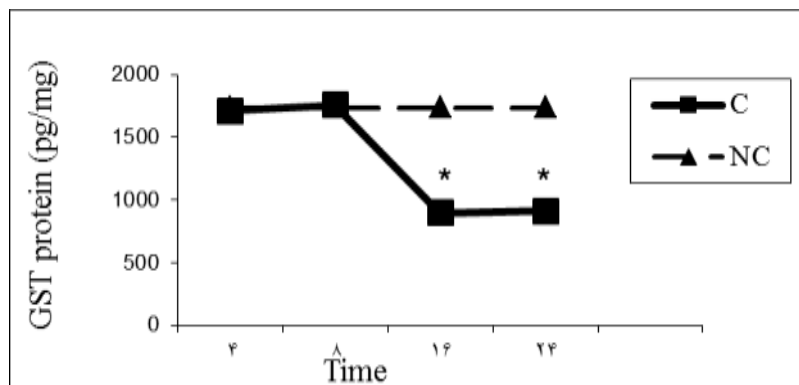
*: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $0/05$ نسبت به گروه کنترل منفی



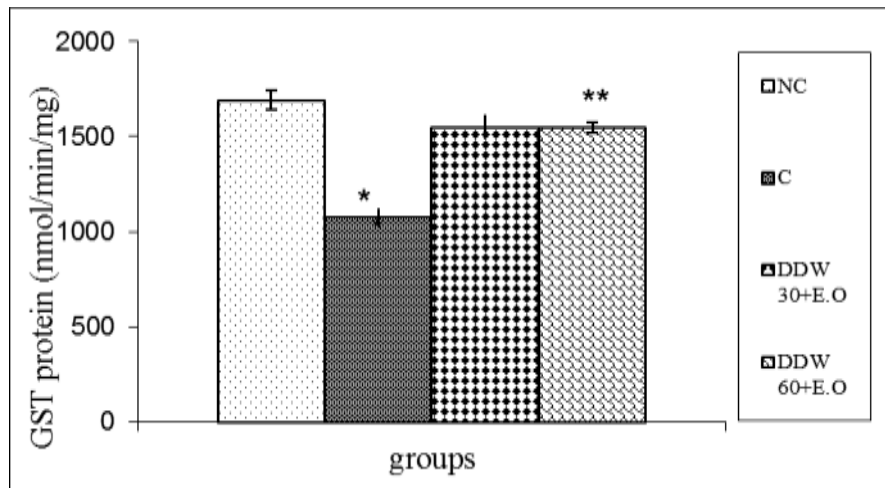
نمودار ۲. اثرات آب فاقد دوتریوم + اسانس مرزه بر سطح فعالیت GST، ۱۶ ساعت پس از تزریق APAP. NC: گروه کنترل منفی، C: گروه کنترل، DDW: آب فاقد دوتریوم، E.O: اسانس مرزه رشینگری
*: اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ بین گروه کنترل منفی و گروه کنترل
**: اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ بین گروه کنترل و آب فاقد دوتریوم + اسانس



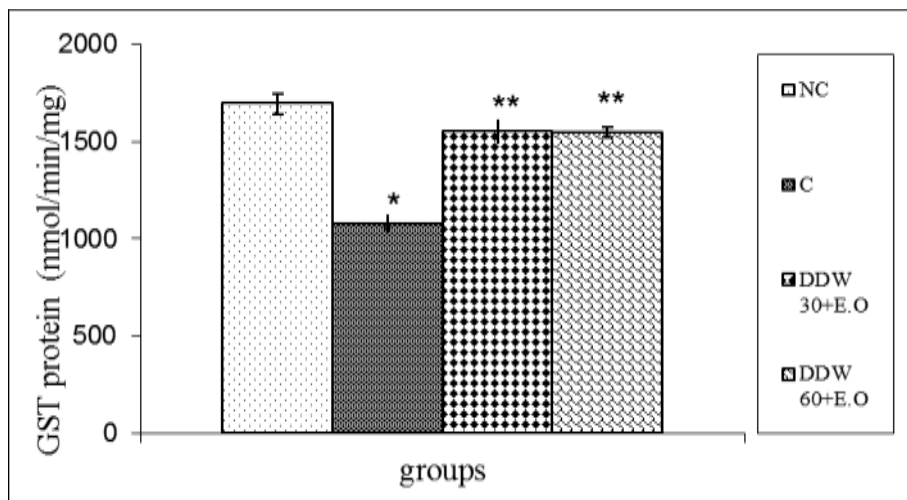
نمودار ۳. اثرات آب فاقد دوتریوم + اسانس مرزه بر سطح فعالیت GST، ۲۴ ساعت پس از تزریق APAP. NC: گروه کنترل منفی، C: گروه کنترل، DDW: آب فاقد دوتریوم، E.O: اسانس مرزه رشینگری
*: اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ بین گروه کنترل منفی و گروه کنترل
**: اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ بین گروه کنترل و آب فاقد دوتریوم + اسانس



نمودار ۴. تغییرات دوره زمانی در سطوح پروتئین GST در موش‌های رت تیمار شده با APAP در مقایسه با گروه کنترل منفی. NC: گروه کنترل منفی، C: گروه کنترل. داده‌ها میانگین \pm S.E.M. پنج نمونه از هر گروه می‌باشد.
*: نشان‌دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل منفی



نمودار ۵. اثرات آب فاقد دوتریوم + اسانس مرزه بر سطح فعالیت پروتئین GST، ۱۶ ساعت پس از تزریق APAP. NC: گروه کنترل منفی، C: گروه کنترل، DDW: آب فاقد دوتریوم، E.O: اسانس مرزه رشینگری
*: اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین گروه کنترل منفی و گروه کنترل
**: اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین گروه کنترل و آب فاقد دوتریوم + اسانس



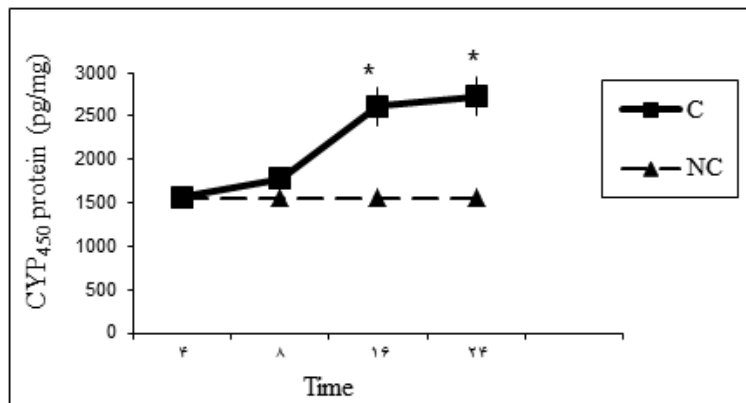
نمودار ۶. اثرات آب فاقد دوتریوم + اسانس مرزه بر سطح فعالیت پروتئین GST، ۲۴ ساعت پس از تزریق APAP. NC: گروه کنترل منفی، C: گروه کنترل، DDW: آب فاقد دوتریوم، E.O: اسانس مرزه رشینگری
*: اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین گروه کنترل منفی و گروه کنترل
**: اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین گروه کنترل و آب فاقد دوتریوم + اسانس

که این روند تا ۲۴ ساعت پس از تیمار نیز ادامه دارد. براساس نتایج حاصل از نمودارهای ۸ و ۹، تیمار حیوانات با آب فاقد دوتریوم و اسانس از زمان‌های ۱۶ و ۲۴ ساعت پس از تزریق استامینوفن، از افزایش سطح پروتئین CYP₄₅₀ جلوگیری کرده است، به طوری که میزان این پروتئین در این گروه کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه استامینوفن، نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

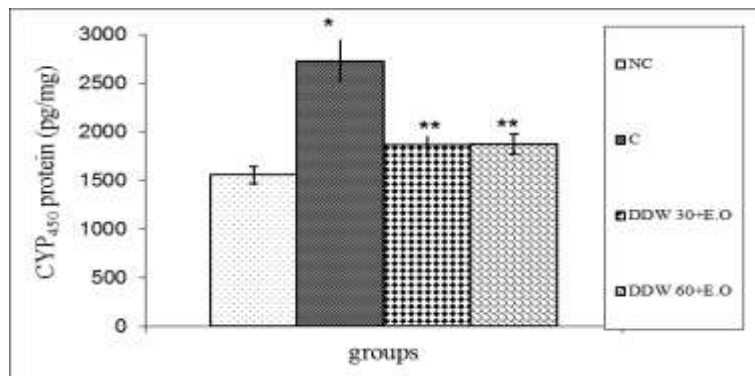
میزان سطح پروتئین CYP₄₅₀ در زمان‌های مختلف

پس از تیمار حیوانات

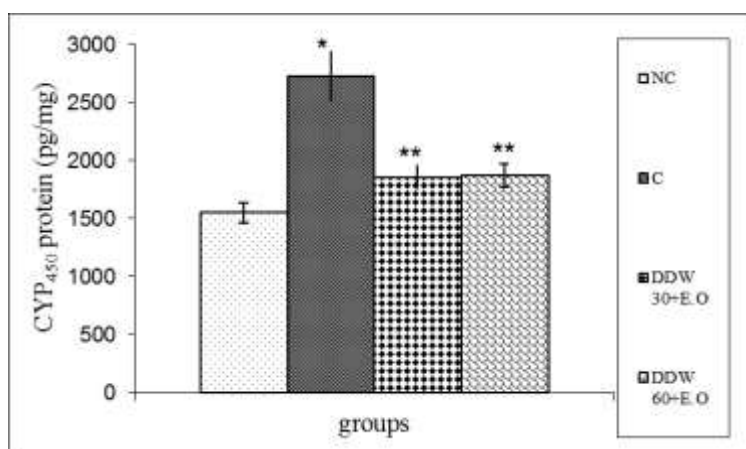
با توجه به نمودار ۷، سطح این آنزیم در زمان‌های ۴ و ۸ ساعت پس از تزریق استامینوفن، تغییری نسبت به گروه کنترل منفی نشان نمی‌دهد، ولی در ۱۶ ساعت پس از تزریق استامینوفن، افزایش معنی‌داری در سطح این آنزیم نسبت به گروه کنترل منفی مشاهده می‌شود ($P < 0.05$).



نمودار ۷. تغییرات دوره زمانی در سطوح پروتئین CYP₄₅₀ در موش‌های رت تیمار شده با APAP در مقایسه با گروه کنترل منفی. NC: گروه کنترل منفی، C: گروه کنترل. داده‌ها میانگین \pm S.E.M. پنج نمونه از هر گروه می‌باشد. *: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $0/05$ نسبت به گروه کنترل منفی



نمودار ۸. اثرات آب فاقد دوتریوم + اسانس مرزه بر سطح پروتئین CYP₄₅₀، ۱۶ ساعت پس از تزریق APAP. NC: گروه کنترل منفی، C: گروه کنترل، DDW: آب فاقد دوتریوم، E.O: اسانس مرزه رشینگری *: اختلاف معنی‌دار در سطح $0/05$ بین گروه کنترل منفی و گروه کنترل **: اختلاف معنی‌دار در سطح $0/05$ بین گروه کنترل و آب فاقد دوتریوم + اسانس

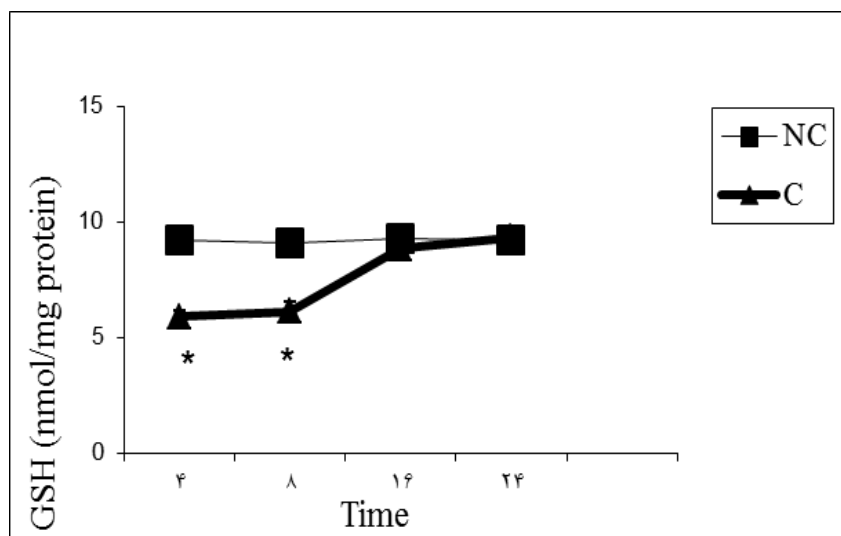


نمودار ۹. اثرات آب فاقد دوتریوم و اسانس مرزه بر سطح پروتئین CYP₄₅₀، ۲۴ ساعت پس از تزریق APAP. NC: گروه کنترل منفی، C: گروه کنترل، DDW: آب فاقد دوتریوم، E.O: اسانس مرزه رشینگری *: اختلاف معنی‌دار در سطح $0/05$ بین گروه کنترل منفی و گروه کنترل **: اختلاف معنی‌دار در سطح $0/05$ بین گروه کنترل و آب فاقد دوتریوم + اسانس

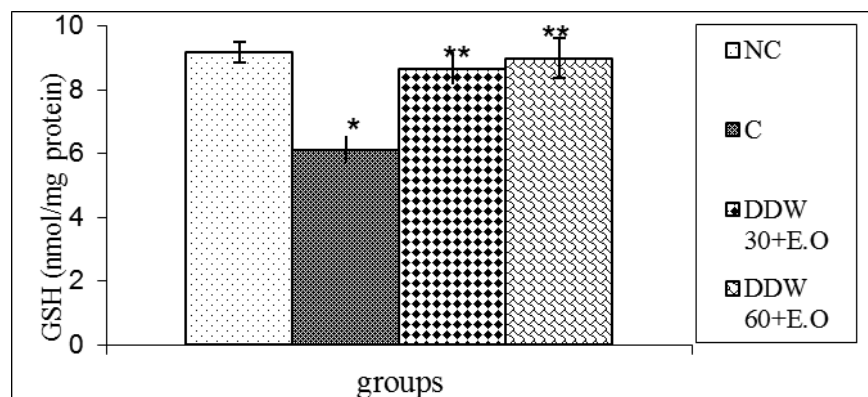
میزان گلوتاتیون احیاء (GSH) در بافت کبد در زمان‌های مختلف بعد از تیمار حیوانات

میزان GSH در هموژن بافت کبد رت‌ها در زمان‌های ۴، ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت پس از تزریق ۵۰۰ mg/kg.bw استامینوفن، اندازه‌گیری شده است. بر اساس نمودار ۱۰، تزریق استامینوفن در زمان ۴ ساعت پس از تیمار منجر به تخلیه گلوتاتیون کبد می‌شود، به طوری که سطح GSH را به طور قابل توجهی در ساعت‌های ۴ و ۸ پس

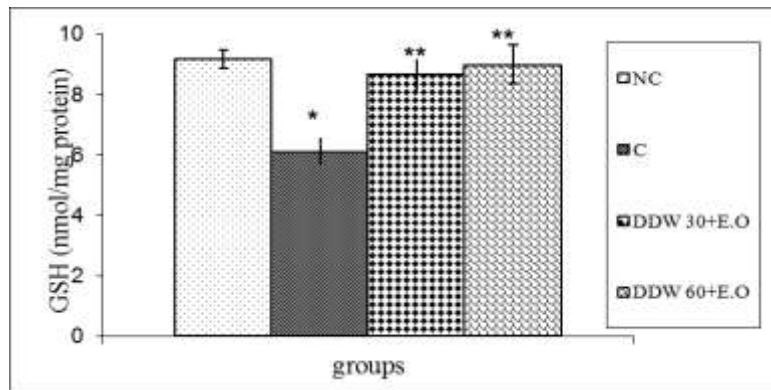
از تیمار، نسبت به گروه کنترل منفی به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد ($P < 0.05$). با این وجود، سطح GSH در زمان‌های ۱۶ و ۲۴ ساعت پس از تزریق استامینوفن به میزان آن در گروه کنترل می‌رسد. در حالی که بر اساس نمودارهای ۱۱ و ۱۲، پیش تیمار رت‌ها با اسانس و آب فاقد دوتریوم می‌تواند سطح GSH را به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) تا مقدار طبیعی بازسازی کند.



نمودار ۱۰. تغییرات دوره زمانی بر سطوح GSH در موش‌های رت تیمار شده با APAP در مقایسه با گروه کنترل منفی. NC: گروه کنترل منفی، C: گروه کنترل. داده‌ها میانگین \pm S.E.M. پنج نمونه از هر گروه می‌باشد. *: نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 0.05 نسبت به گروه کنترل منفی



نمودار ۱۱. اثرات آب فاقد دوتریوم + اسانس مرزه بر سطح فعالیت GSH، ۴ ساعت پس از تزریق APAP. NC: گروه کنترل منفی، C: گروه کنترل، DDW: آب فاقد دوتریوم، E.O: اسانس مرزه رشینگری *: اختلاف معنی‌دار در سطح 0.05 بین گروه کنترل منفی و گروه کنترل **: اختلاف معنی‌دار در سطح 0.05 بین گروه کنترل و آب فاقد دوتریوم + اسانس



نمودار ۱۲. اثرات آب فاقد دوتریوم + اسانس مرزه بر سطح فعالیت GSH، ۸ ساعت پس از تزریق APAP. NC: گروه کنترل منفی، C: گروه کنترل، DDW: آب فاقد دوتریوم، E.O: اسانس مرزه رشینگری
*: اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین گروه کنترل منفی و گروه کنترل
**: اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین گروه کنترل و آب فاقد دوتریوم + اسانس

و ۲۴)، نسبت به گروه تیمار شده با پاراستامول می‌گردد ($P < 0.05$). سطح فعالیت آنزیم ALT، ALP و میزان بیلی‌روبین تام در پلاسما در زمان‌های مختلف پس از تیمار حیوانات در جدول ۳ نشان داده شده است. سطح فعالیت آنزیم ALT، ALP و میزان بیلی‌روبین تام در هیچ یک از زمان‌های تیمار نسبت به گروه کنترل منفی تغییر معنی‌داری نداشته است ($P > 0.05$).

میزان فعالیت آنزیم‌های شاخص آسیب کبدی در زمان‌های مختلف پس از تیمار حیوانات
تزریق پاراستامول سطح آنزیم AST را در ساعت‌های ۸، ۱۶ و ۲۴ در مقایسه با گروه کنترل شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (جدول ۲). همچنین، تیمار رت‌ها با اسانس و آب فاقد دوتریوم به‌طور معنی‌داری از سلول‌های کبدی محافظت کرده و سبب کاهش سطح AST (ساعت‌های ۸، ۱۶

جدول ۲. میزان فعالیت آنزیم AST پلاسما در زمان‌های مختلف پس از تیمار حیوانات

گروه‌ها	ساعت ۴	ساعت ۸	ساعت ۱۶	ساعت ۲۴
NC	۱۰۰/۵۰±۴/۷	۱۰۲/۵۰±۴/۳	۱۰۵/۵۰±۳/۷	۱۱۰±۴/۶
C	۱۰۶±۴/۷۴	۱۷۰/۵±۸/۹۳*	۳۹۳±۲۱/۷*	۳۱۳±۹/۲۶*
DDW30+E.O	۹۸/۲۵±۶/۴۲	۱۰۸/۲۵±۶/۱۴**	۱۳۱±۱۱/۵۵**	۱۳۰/۵±۵/۲۴**
DDW60+E.O	۹۳/۷۵±۴/۴۸	۱۱۷/۵±۵/۳**	۱۴۰±۱۱/۹۵**	۱۳۳/۵±۸/۵**

NC: گروه کنترل منفی، C: گروه کنترل، DDW: آب فاقد دوتریوم، E.O: اسانس مرزه رشینگری
*: اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ بین گروه کنترل منفی و گروه شاهد
**: اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ بین گروه کنترل منفی و گروه آب فاقد دوتریوم + اسانس

جدول ۳. میزان فعالیت آنزیم ALT، ALP و میزان بیلی‌روبین تام در پلاسما در زمان‌های مختلف پس از تیمار حیوانات

گروه‌ها	ALT (U/L)		ALP (U/L)		بیلی‌روبین تام (mg/dl)	
	C	NC	C	NC	C	NC
ساعت ۴	۶۷/۲±۲/۶	۶۵±۳/۲	۲۲۴/۲±۸/۱	۲۲۴/۲±۸/۱	۰/۶±۰/۰۴	۰/۶±۰/۰۲
ساعت ۸	۶۷/۲±۶/۲	۶۶±۳/۲	۲۳۱±۵/۱	۲۲۳±۸/۸	۰/۶±۰/۰۵	۰/۷±۰/۰۱
ساعت ۱۶	۷۲±۱/۵	۶۷±۳/۱	۲۲۴/۲±۱۰/۴	۲۱۴/۳±۹/۱	۰/۶±۰/۰۳	۰/۶±۰/۰۳
ساعت ۲۴	۶۵/۷±۲/۸	۶۹/۱±۴	۲۲۳±۶/۴	۲۲۴/۲±۷/۱	۰/۶±۰/۰۴	۰/۶±۰/۰۴

NC: گروه کنترل منفی، C: گروه کنترل

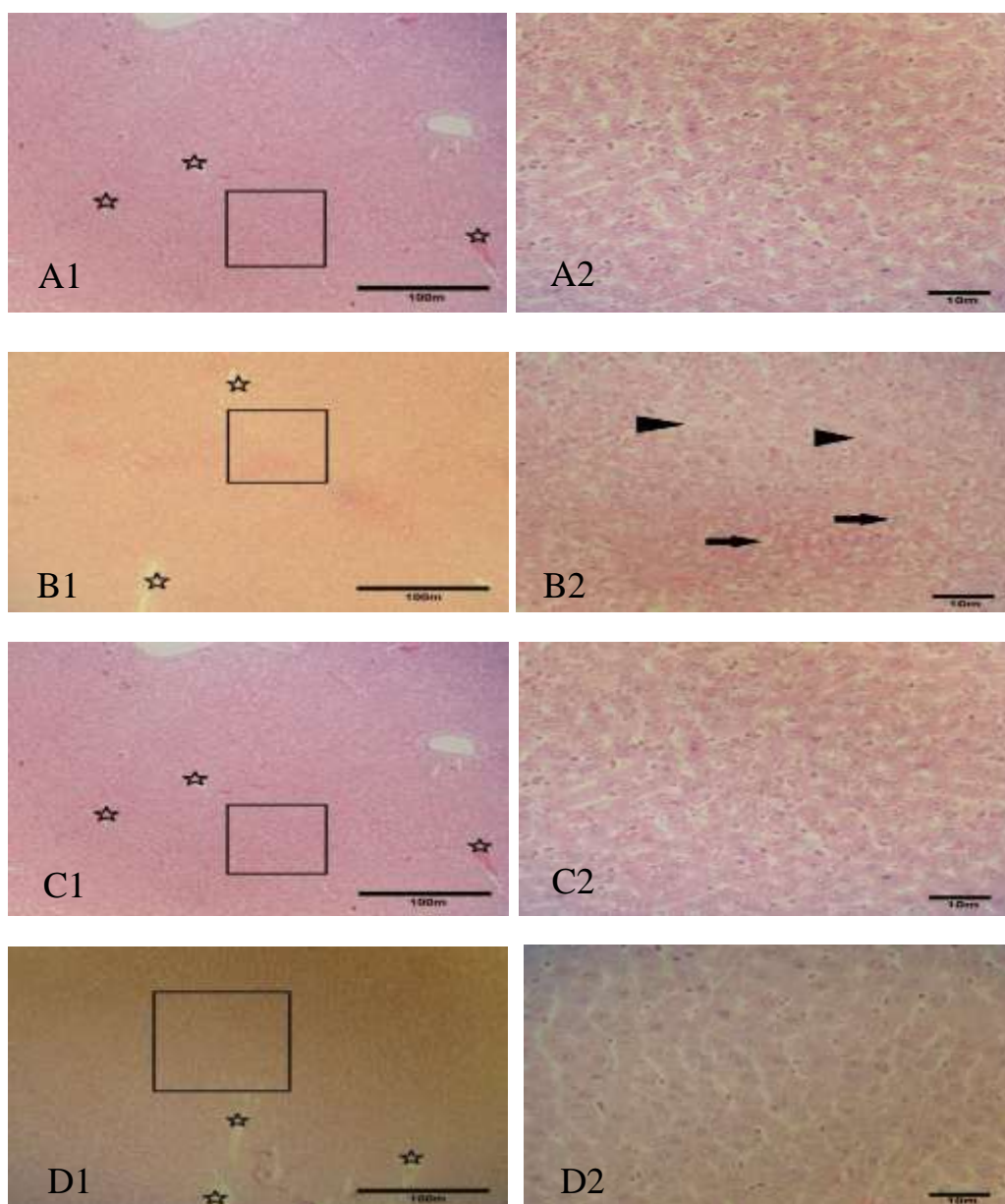
گیاهان یکی از مهمترین منابع تأمین دارو برای درمان دردها به شمار می‌رفتند. از سوی دیگر آب سبک نیز که یک ترکیب طبیعی است، دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد و باعث تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول می‌شود (Heidarian, 2011). بر این اساس، در این تحقیق بررسی اثرات آب فاقد دوتریوم و اسانس مرزه رشینگری در جلوگیری از آسیب‌های کبدی ناشی از استامینوفن مورد بررسی قرار گرفت. در این راستا، علاوه بر بررسی هیستوپاتولوژیک بافت کبد حیوانات و مقایسه شدت آسیب‌های کبدی در گروه‌های مختلف تیمار، سطح مارکرهای آسیب کبدی در پلاسما و همچنین سطح آنزیم‌های دخیل در متابولیسم سموم نظیر GST و CYP₄₅₀ و نیز فاکتورهای دخیل در استرس اکسیداتیو و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی نظیر سطح GSH در هموژن بافت کبد اندازه‌گیری شد.

استامینوفن که با نام علمی پاراستامول نیز شناخته می‌شود، امروزه در سر تا سر دنیا به عنوان دارویی ضد درد، ضد تب و ضد التهاب مورد استفاده قرار می‌گیرد. این دارو به همان اندازه که در دوزهای درمانی، دارویی مؤثر و نسبتاً بی‌خطر معرفی شده است، در دوزهای فوق درمانی می‌تواند سبب مسمومیت کبدی، در انسان و حیوان آزمایشگاهی شود (Hinson, 1981). مصرف بیش از حد استامینوفن، به‌عنوان علت اولیه نارسایی حاد کبد شناسایی شده است (James, 2003a). فرآیند متابولیسم استامینوفن، توسط سیستم سیتوکروم P₄₅₀ شروع شده که منجر به تولید محصول این واکنش به نام NAPQI می‌گردد. اگر شکل‌گیری متابولیت واکنش، بیش از ظرفیت گلوکوتایون کبدی باشد، NAPQI به پروتئین‌های سلولی متصل می‌شود که یک رویداد از شروع آسیب سلولی است که منجر به اختلال در تخلیه ATP میتوکندری، استرس اکسیداتیو، کاهش دیسموتاز، افزایش پراکسید هیدروژن و کاهش گلوکوتایون می‌گردد (Chiu, 1978).

دریافت دوز بالای استامینوفن قادر است در مدت کوتاهی آسیب حاد کبدی را که با نکروز سلول‌های کبدی، ضایعات هیستوپاتولوژیک و آسیب هپاتوسلولار همراه است را القاء نماید. مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شده به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E)، در شکل‌های زیر ارایه شده است. مطالعات بافت‌شناسی بر بیوپسی کبد نشان داده است که ساختار کبد در گروه کنترل منفی طبیعی می‌باشد. هیچ نفوذ و یا جداسازی پلیمور فونوکلتر و یا سلول‌های التهابی تک هسته‌ای در این گروه وجود ندارد (شکل ۱-A). گروه کنترل مثبت که استامینوفن را در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن دریافت داشته‌اند، در شکل ۱-B نشان داده شده است. مطالعات بافت‌شناسی در نمونه‌های این گروه، دژنراسیون واکوتلی (فلش بزرگ) و نکروز کبدی (پیکان) با سلول‌های مجزا را نشان داده است. شکل ۱-C گروه تیمار شده با ۳۰ ppm آب فاقد دوتریوم + ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن از اسانس مرزه رشینگری + ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن APAP را نشان می‌دهد. در این نمونه‌های بافت‌شناسی پارانشیم کبدی طبیعی و لوبول‌ها و ورید مرکزی (ستاره) نشان داده شده است. سلول‌های کبدی هسته و سیتوپلاسمی طبیعی دارند. شکل ۱-D گروه تیمار شده با ۶۰ ppm آب فاقد دوتریوم + ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن از اسانس مرزه رشینگری + ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن APAP را نشان می‌دهد. در این نمونه‌های بافت‌شناسی، پارانشیم کبدی طبیعی و لوبول‌ها و ورید مرکزی (ستاره) نشان داده شده است. سلول‌های کبدی هسته و سیتوپلاسمی طبیعی دارند.

بحث و نتیجه‌گیری

آسیب کبدی ناشی از استامینوفن می‌تواند منجر به مرگ شود، بنابراین دستیابی به ترکیبی که بتواند اثر آن را خنثی کند، ضروری به نظر می‌رسد. استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها از دیرباز در جوامع بشری معمول بوده و تا حدود نیم قرن پیش،



شکل ۱. تأثیر آب فاقد دوتریوم و اسانس مرزه رشینگری بر تغییرات بافت‌شناسی ۲۴ ساعت پس از تزریق APAP. A- گروه کنترل منفی، هیچ نفوذ و یا جداسازی پلیمور فونوکلتر و یا سلول‌های التهابی تک هسته‌ای در این گروه وجود ندارد (A2: $\times 400$ ، A1: $\times 100$ و بزرگ‌نمایی اصلی: A1). B- گروه کنترل مثبت (۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن APAP)، دژنراسیون واکوئلی (فلش بزرگ) و نکروز کبدی (پیکان) با سلول‌های مجزا، مشاهده می‌شود ندارد (B2: $\times 400$ ، B1: $\times 100$ بزرگ‌نمایی اصلی). C- گروه تیمار شده با ۳۰ ppm آب فاقد دوتریوم + ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن از اسانس مرزه رشینگری + ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن APAP، سلول‌های کبدی هسته و سیتوپلاسمی طبیعی دارند ندارد (C2: $\times 400$ ، C1: $\times 100$ بزرگ‌نمایی اصلی). D- گروه تیمار شده با ۶۰ ppm آب فاقد دوتریوم + ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن از اسانس مرزه رشینگری + ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن APAP، پارانشیم کبدی طبیعی و لوپول‌ها و ورید مرکزی (ستاره) ظاهری طبیعی دارند ندارد (D2: $\times 400$ ، D1: $\times 100$ بزرگ‌نمایی اصلی).

صورت مستقیم (۲٪) از طریق ادرار دفع می‌شود. ۵٪ از دارو توسط آنزیم سیتوکروم P₄₅₀ متابولیزه شده و تبدیل به ماده بنزوکینون ایمین (NAPQI) می‌گردد.

پس از مصرف دوز بالای استامینوفن، قسمت اعظم دارو بعد از ترکیب با اسید گلوکورونیک (۶۰٪)، اسید سولفوریک (۳۰٪)، سیستئین و مقداری نیز به

مانند استامینوفن، ترکیباتی یافت می‌شوند که می‌توانند تا حدی مسمومیت ناشی از سوء مصرف چنین ترکیباتی را مهار کنند. از جمله این ترکیبات، مواد مؤثره گیاهی و طبیعی می‌باشند. بنابراین استفاده از گیاهان دارویی و سایر منابع طبیعی مانند آب فاقد دوتریوم، در درمان اختلالات کبدی حائز اهمیت است. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که تیمار با آب فاقد دوتریوم می‌تواند سبب حفاظت کبدی گردد (Knight, 2003). از سوی دیگر، تحقیقات نشان می‌دهد که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاهان می‌تواند بدن را در برابر آسیب‌های کبدی ناشی از سموم و رادیکال‌های آزاد به خوبی محافظت کند (Kumar, 2010). علاوه بر این، برخی از تحقیقات نشان دادند که گیاهان دارویی قادر به برگرداندن سطوح آنتی‌اکسیدان‌ها در مسمومیت‌های کبدی می‌شوند (Kanchana, 2011). در مطالعه‌ای تزریق اسانس بومادران، نکروز و کاهش شدید GSH و GST ناشی از مسمومیت استامینوفن را به طور چشمگیری بهبود می‌بخشد (Kumari, 2012). در مطالعه دیگری در خصوص اثرات محافظتی اسانس آویشن و مریم گلی بر آسیب کبدی ناشی از تجویز دز سمی استامینوفن در موش‌ها، در گروه تیمار با اسانس افزایش معنی‌داری در میزان سطح GSH و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و GPX در خون و بافت کبد مشاهده گردید (Larson, 2005).

نتایج این مطالعه نشان داده‌اند که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی اسانس مرزه و آب فاقد دوتریوم با تعدیل آنزیم‌های دخیل در متابولیسم استامینوفن از جمله GST و CYP₄₅₀ و نیز پارامترهای دخیل در آسیب بافت کبدی از جمله AST منجر به کاهش آسیب بافتی شده‌اند (نمودارهای ۱ تا ۱۲، جدول‌های ۲ و ۳). با توجه به اختلال پراکسیدانت و تعادل آنتی‌اکسیدان استرس اکسیداتیو در سمیت APAP، بسیاری از منابع طبیعی با اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند در محافظت در برابر نارسایی کبدی ناشی از

در مرحله بعد آنزیم گلوتاتیون -S- ترانسفراز با کنژوگه کردن گلوتاتیون با این ترکیب تشکیل کنژوگه ۳- گلوتاتیون -S- ایل استامینوفن می‌دهد که با دخالت آنزیم‌های دیگر به صورت مرکاپتوریک اسید در ادرار دفع می‌شود (James, 1499-1506). در دوزهای بالا، مقادیر بیش از حد NAPQI تولید شده، که با القای استرس اکسیداتیو و اتصال به ماکرومولکول‌های سلولی منجر به آسیب بافت کبد می‌گردد. همچنین این متابولیت با GSH توسط GST ترکیب شده و در مقادیر بالا منجر به کاهش احتمالی آن‌ها می‌گردد (Catherine, 1996; Jose, 2000; James, 1499-1506). نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان داده است که تجویز استامینوفن به موش‌ها سبب کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) در میزان آنزیم و پروتئین GST (نمودارهای ۱ و ۴) همراه با کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) سطح GSH (نمودار ۱۰) و افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) میزان سیتوکروم P₄₅₀ (نمودار ۷) می‌گردد.

از سوی دیگر، آسیب کبدی ناشی از استامینوفن منجر به تخریب غشا هپاتوسیت‌ها می‌شود و آنزیم‌های شاخص کبدی ALT، AST، ALP که به طور معمول در سیتوزول قرار دارند وارد جریان خون شده و سبب افزایش سطوح ترانس آمینازهای سرم، آلکالین فسفاتاز و بیلی‌روبین سرم می‌شود (Kanchana, 2011)، به طوری که در بیمارانی که آمینوترانسفرازهای فوق‌العاده بالا و افزایش خفیف بیلی‌روبین دارند، باید به مسمومیت با استامینوفن مشکوک شد (Khorsandi, 2007). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان داده است که تزریق استامینوفن سبب افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) آنزیم AST سرمی می‌شود (جدول ۲)، در حالی که تأثیر معنی‌داری ($P > 0.05$) بر سطح فعالیت آنزیم‌های ALT، ALP و میزان بیلی‌روبین تام نداشته است (جدول ۳). در مقابل تمام اثرات سمی و مخرب داروهای

Terminalia chebula)، نشان داده‌اند که این گیاهان اثر حفاظتی بر کبد دارند و این اثر محافظتی در ارتباط با ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در این گیاهان است (Olariu, 2007; Rowden, 2005). همچنین، در بررسی‌های *Khorsandi et al.* تأثیر محافظتی زردچوبه (*Curcuma longa*) بر سمیت کبدی ناشی از استامینوفن اثبات شده است و کاهش عمده‌ای را در افزایش حاد ALT و ALP ایجاد کرد (Sabina, 2013).

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، اسانس مرزه (*Satureja rechingeri*)، شامل ترکیباتی نظیر سیمین-ارتو (۵۸/۸۹٪) و بتا-بیس آبولن (۱۳/۱۴٪) می‌باشند که به عنوان ترکیبات اصلی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی مختلف می‌باشند (Sefidkon, 2007). بنابراین، مکانیسم احتمالی مسئول محافظت آسیب کبدی ناشی از استامینوفن ممکن است ایفای نقش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به عنوان یک جاذب رادیکال آزاد از طریق توقف تولید رادیکال‌های تولیدی آنزیم‌های میکروزومال در متابولیسم پاراستامول باشد. همچنین یکی از مطالعات نشان داده است که اثرات محافظت کبدی *Kohautia grandiflora* ممکن است به دلیل خواص آنتی‌اکسیدان‌ها و خواص مهارری رادیکال‌های آزاد باشد (Seldak & Limdsay, 1986). بسیاری از مطالعات نشان داد که DDW ممکن است به عنوان مکمل در پیشگیری و یا درمان از حالات مختلف پاتولوژیک، به‌خصوص در سرطان جهت کاهش سمیت سیتوستاتیک (cytostatic) مورد استفاده قرار گیرد (Walker, 1983; Swan, 1997). تفاوت بین هیدروژن و دوتریوم منجر به تفاوت در رفتار فیزیکی و شیمیایی بین دو ایزوتوپ پایدار می‌شود. غلظت دوتریوم حدود ۱۵۰ ppm در آب‌های سطحی و بیش از ۱۰ میلی‌مولار در موجودات زنده می‌باشد، اما غلظت دوتریوم در DDW کمتر از ۸۰ ppm است که احتمالاً سبب اثرات مطلوب بر ارگانسیم می‌شود (Heidarian,

پاراستامول از طریق مهار رادیکال‌های آزاد اکسیژن فعال از مسیرهای مختلف بیوشیمیایی شرکت کنند (Mann, 1989; Miric, 2010). GSTs یک خانواده از آنزیم در سم‌زدایی طیف وسیعی از ترکیبات زئوبیوتیک است که از طریق کنزوک کردن متابولیت‌های تولید شده توسط CYP₄₅₀ به گلووتاتیون در نگهداری از فرایندهای فیزیولوژیکی طبیعی ضروری است (Mitchell, 1973a). بر این اساس، در پژوهش حاضر، اسانس و آب فاقد دوتریوم، آسیب کبدی القاء شده توسط APAP را، با احیای فعالیت‌های CYP₄₅₀ (نمودارهای ۸ و ۹)، GST (نمودارهای ۲ و ۳-۵ و ۶) و AST سرم (جدول ۲) مهار می‌کند. همچنین، اسانس مرزه و آب فاقد دوتریوم، کاهش GSH کبدی (نمودارهای ۱۱، ۱۲) در رت‌های تیمار شده با APAP را تعدیل می‌کند ($P < 0.05$). این نتایج با تحقیقات قبلی که نشان دادند، تیمار رت‌ها با اسانس بومادران (*Achillea wilhelmsii*) به طور قابل توجهی پارامترهای بیوشیمیایی مانند، فعالیت‌های GST و CYP₄₅₀ و سطح GSH به سطوح نرمال، باز می‌گرداند، مطابقت دارد (Mudge, 1978). همچنین، Kanchana & Mohamed sadiq (2011)، اثر حفاظتی *Plumbago zeylanica* را بر سمیت کبدی ناشی از استامینوفن از طریق کاهش مربوطه AST سرم، ALT، ALP و آلبومین نشان داده‌اند (Nithianantham, 2011). به طور مشابه، رت‌های مسموم با پاراستامول تحت تیمار خوراکی با اسانس آویشن *Thymus capitatus* و مریم گلی *Salvia officinalis*، اثر محافظتی قابل توجهی در مقابل افزایش القاء شده در فعالیت LDH سرم و کبد و مهار کاهش سطوح GSH و افزایش فعالیت‌های SOD و GPX در خون و کبد را نشان داده‌اند (Olariu, 2007). بسیاری از مطالعات انجام شده بر روی گیاهان دارویی مختلف نظیر کنگر فرنگی (*Cynara scolymus*)، تاجریزی (*Solanum nigrum*)، رازیانه (*Feniculum vulgare*)، زینان (*Carum copticum*) و هلیله

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تیمار حیوانات با آب فاقد دوتریوم در هر دو دز ۳۰ و ۶۰ ppm به همراه اسانس مرزه رشینگری، از طریق تعدیل پارامترهای دخیل در متابولیسم استامینوفن (CYP₄₅₀، GST و GSH) منجر به کاهش آسیب‌های بافتی کبد ناشی از مسمومیت استامینوفن شده است و میزان نکرور سلول‌های کبدی را کاهش می‌دهد. این اثر حفاظتی از لحاظ آماری معنی‌داری بوده و قابل مقایسه با گروه استامینوفن بوده است. این اثرات احتمالاً به قابلیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مؤثره اسانس مرزه رشینگری و خواص بیولوژیکی آب فاقد دوتریوم نسبت داده می‌شود.

(2011). یکی از مطالعات گزارش داده است که پیش تیمار DDW کبد را از سموم کروم از طریق اثرات مهارى محافظت می‌کند (Weil, 2007). علاوه بر این، خاصیت آنتی‌اکسیدانی DDW احتمالاً در کنترل کبد در برابر سمیت استامینوفن مؤثر می‌باشد. سایر تحقیقات نیز نشان داده‌اند که پیش درمانی با DDW دوز ۳۰ ppm سبب بهبود آنزیم‌های ALT و AST شده و نقش محافظتی از کبد در برابر مسمومیت با کروم ایفا می‌کند (Jose, 2000). اثر حفاظتی آب فاقد دوتریوم (۳۰ ppm) در برابر مسمومیت chromom بر اندام کبد از طریق بازگردانی سطوح ALT و AST به سطح نرمال ثبت شده است (Weil, 2007).

REFERENCES

- Adams, ML.; Pierce, RH.; Vail, ME.; White, CC.; Tonge, RP.; Kavanagh, TJ.; Fausto, N.; Nelson, SD.; Bruschi, SA; (2001). Enhanced Acetaminophen Hepatotoxicity in Transgenic Mice Overexpressing BCL-2. *Molecular Pharmacology*; 60(5): 907-915.
- Adebusi, EA.; Afolayan, AJ.; (2010). A review of natural products with hepatoprotective activity. *J Med Plant Res*; 4(13): 1318-1334.
- Allameh, A.; Nickseresht, M.; Kheyrdosh, F.; (1999). Role of cytosolic glutathione S-transferase in protection against acetaminophen-induced lipid peroxidation in weanling rats. *Med J*; 133: 213-217.
- Allameh, A.; Nickseresht, M.; Kheyrdosh, F.; (1999). Role of cytosolic glutathione S-transferase in protection against acetaminophen-induced lipid peroxidation in weanling rats. *Med J*; 133: 213-217.
- Bradford, MM.; (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72: 248-254.
- Canatese, J.; Gimson, AES.; Davis, M.; Williams, R.; (1981). Factors contributing mortality in paracetamol induced hepatic failure. *Br Med J*; 282: 199-201.
- Catherine, A.; Evans, R.; Nicholas, JM.; George, P.; (1996). structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *free radic biol med*; 20: 933-56.
- Chattopadhyay, RR.; (2003). possible mechanism of hepatoprotective activity of azadirachta indica leaf extract: part ii. *J ethnopharmacol*; 62: 31-39.
- Chiu, S.; Bhakthan, NMG.; (1978). Experimental acetaminophen-induced hepatic necrosis. *Lab. Invest*; 39: 193.
- Chun, LJ.; Tong, MJ.; Busuttill, RW.; Hiatt, JR.; (2009). Acetaminophen Hepatotoxicity and Acute Liver Failure, *J Clin Gastroenterol*; 43(4), 342-349.
- Council on Scientific Affairs; (2010). Science Brief on Acetaminophen and Liver Injury. May.
- Dadkhah, A.; Allameh, A.; Khalafi, H.; Ashrafi-Helan, J.; (2001a). Inhibitory

- effects of dietary caraway essential oils on 1,2-shrafi-Helan J. Inhibitory effects of dietary caraway essential oils on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis is mediated by liver xenobiotic metabolizing enzymes. *Nutrition and Cancer*; 63: 43-54
- Dadkhah, A.; Fatemi, F.; Ababzadeh, S.; Roshanaei, K.; Alipour, M.; Sadegh Tabrizi, B.; (2014). Potential preventive role of Iranian *Achillea wilhelmsii* C. Koch essential oils in acetaminophen-induced hepatotoxicity, *Botanical Studies*; 55: 37.
- Dixon, M.; Dixon, B.; Aparicio, SR.; Loney, D.; (1975). experimental paracetamol-induced hepatic necrosis: a light and electron-microscopy and histochemical study. *J. Pathol*; 116: 17-29.
- Doina, P.; Olariu, V.; Scurtu, M.; Tulcan, C.; Brudiu, I.; Muntean, D.; Petcu, F.; Padeanu, I.; Ostan, M.; (2012). The effect of deuterium depleted water on some hepatic enzymes' activity in rats intoxicated with chromium (vi), *ecotoxicologie, Zootehnie Si Tehnologii De Industrie Alimentara*.
- Doina, P.M.; Victor Olariu, V.; Scurtu, M.; Tulcan, C.; Ileana Brudiu, I.; Muntean, D.; Petcu, F.; Pădeanu, I.; Ostan, M.; (2012). The effect of deuterium depleted water on some hepatic enzymes' activity in rats intoxicated with chromium (vi), *fascicula: ecotoxicologie, zootehnie si tehnologii de industrie alimentară*; 521-526.
- Dong, H.; Haining, RL.; Thummel, KE.; Rettie, AE.; Nelson, SD.; (2000). Involvement of Human Cytochrome P₄₅₀ 2D6 in the Bioactivation of Acetaminophen. *Drug Metabolism and Disposition*; 28(12): 1397-1400.
- El-Banna, H.; Soliman, M.; Al-wabel, N.; (2013). Hepatoprotective Effects of Thymus and Salvia Essential oils on Paracetamol-Induced Toxicity in Rats, *J. Phys. Pharm. Adv.*; 3(2): 41-47.
- Fatemi, F.; Allameh, A.; Khalafi, H.; Ashrafihelan, J.; (2010a). Hepatoprotective effects of g-irradiated caraway essential oils in experimental sepsis. *Appl Radiat Isotopes*; 68: 280-285.
- Fatemi, F.; Allameh, A.; Khalafi, H.; Rajaei, R.; Rezaei, MB.; (2011). Biochemical properties of γ -irradiated caraway essential oils. *J Food Biochem*; 35: 650-62.
- Fatemi, F.; Allameh, A.; Khalafi, H.; Rezaei, MB.; Seyhoon, M.; (2010b). The effect of essential oils and hydroalcoholic extract of caraway seed on oxidative stress parameters in rats suffering from acute lung inflammation before and after γ -irradiation. *J Med Aroma Plant*; 25(4): 441-455.
- Garba, S.H.; Sambo, N.; Bala, U.; (2009). The effect of the aqueous extract of *kohautia grandiflora* on paracetamol induced liver damage in albino rats. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*; 24(1): 17-23.
- Giulivi, C.; Romero, FJ.; Cadenas, E.; (1992). The interaction of trolox, a water-soluble vitamin E analog, with reduction of the oxoferyl moiety. *Arch. Biochem. Biophys*; 299(1): 302-312.
- Goodall, K.; (2003). The Role of Deuterium in DNA degradation, *Anti-Aging Medical News, Resource*.
- Guo Ying, Zuo.; Fan Yan, Meng.; Xiano Yan, Hao.; Yan Ling, Zhang.; Gen Chun, Wang.; Gui Li, Xu.; (2008). Antibacterial alkaloids from *Chelidonium majus* L. against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*; 11(4): 90-94.
- Hayes, JD.; Pulford, DJ.; (1995). The glutathione-S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 30: 445-600.

- Heidarian, E.; Jafari-Dehkordi, E.; Seidkhani-Nahal, A.; (2011). Effect of garlic on liver phosphatidate phosphohydrolase and plasma lipid levels in hyperlipidemic rats. *Food Chem Toxicol*; 49(5): 1110-1114.
- Hinson, J.A.; Phol, L.R.; Monks, T.J.; Gillette, J.R.; (1981). Acetaminophen induced hepatotoxicity. *Life Science*; 29: 107-111.
- James, L.P.; Mayeux, P.R.; Hinson, J.A.; (2003a). Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metabolism and Disposition*; 31(12): 1499-1506.
- James, L.P.; Mayeux, P.R.; Hinson, J.A.; (2003). Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*; 31(12): 1499-1506.
- Jose, J.K.; Kuttan, R.; (2000). Hepatoprotective activity of *Emblica officinalis* and *Chyavanaprash*. *Journal of Ethnopharmacology*; 72: 135-140.
- Kanchana, N.; Mohamed Sadiq, A.; (2011). Hepatoprotective effect of *plumbago zeylanica* on paracetamol induced liver toxicity in rats. *Int J Pharm Pharm Sci.*; 3(1): 151-154.
- Khorsandi, L.S.; Taheri mobarakeh, M.; Kalantari, H.; (2007). The protective effects of *Curcuma longa* extract on acetaminophen-induced acute hepatotoxicity in mice. *J Rafsanjan Univ Med Sci.*; 6(4): 219-226. (Persian)
- Knight, T.R.; Fariss, M.W.; Farhood, A.; Jaeschke, H.; (2003). Role of Lipid Peroxidation as a Mechanism of Liver Injury after Acetaminophen Overdose in Mice, *Toxicological Sciences*; 76: 229-236.
- Kumar, S.; Gautam, S.; Powar, S.; Sharma, A.; (2010). Microbial decontamination of medicinally important herbals using gamma radiation and their biochemical characterisation. *Food Chem.*; 119: 328-335.
- Kumari, A.; Kakkar, P.; (2012). Lupeol prevents acetaminophen-induced in vivo hepatotoxicity by altering the Bax/Bcl-2 and oxidative stress-mediated mitochondrial signaling cascade. *Life Sci.*; 90(15-16): 561-570.
- Larson, A.M.; Polson, J.; Fontana, R.J.; Davern, T.J.; Lalani, E.; Hynan, L.S.; et al., (2005). Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study, *Hepatology*; 42: 1364-72.
- Mann, J.M.; Louis, M.P.; Kragel, P.J.; Kragel, A.H.; Robert, W.C.; (1989). Cardiac consequences of massive acetaminophen overdose. *The American Journal of Cardiology*; 63: 1018-1020.
- Miric, R.E.; (2010). Deuterium-depleted water in cancer therapy, *Environmental Engineering and Management Journal*; 9(11): 1543-1545.
- Mitchell, Jr.; Jollow, D.J.; Potter, W.Z.; (1973a). Acetaminophen-induced hepatic necrosis i. role of drug metabolism. *J. Pharmacol-Exper. Therap.*; 187: 185-194.
- Mudge, G.H.; Gembory, M.W.; Duggin, G.G.; (1978). Covalent binding of metabolites of acetaminophen to kidney protein and depletion of renal glutathione. *J Pharmacol Exp Ther.*; 206(1): 218-226.
- Nithianantham, K.; Shyamala, M.; Chen, Y.; Latha, L.Y.; Jothy, S.L.; Sasidharan, S.; (2011). Hepatoprotective potential of *Clitoria ternatea* leaf extract against paracetamol induced damage in mice. *Molecules*; 6(12): 10134-45.
- Olariu, L.; Petcu, M.; Tulcan, C.; Chis-Buiga, I.; Pup, M.; Florin, M.; Brudiu, Ileana.; (2007). Deuterium depleted water- antioxidant or prooxidant?, *lucrari stiintifice medicina veterinara vol. xl, timisoara.*
- Olariu, L.; Petcu, M.; Tulcan, C.; Chis-Buiga, I.; Pup, M.; Florin, M.; Brudiu, Ileana.; (2007). Deuterium depleted water- antioxidant or prooxidant? *lucrari stiintifice medicina veterinara vol. xl, timisoara.*
- Rowden, A.K.; Norvell, J.; Eldridge, D.L.; Kirk, M.A.; (2005). Updates on

- acetaminophen toxicity. *Medical Clinics of North America*; 89(6): 1145-1159.
- Sabina, E.; Rasool, M.; Vedi, M.; Navaneethan, D.; Ravichander, M.; Parthasarthy, P.; Rachel Thella, S.; (2013). Hepatoprotective and antioxidant potential of withania somnifera against paracetamol-induced liver damage in rats. *Int J Pharm Pharm Sci.*; 5(2): 648-651
- Sefidkon, F.; Abbasi, K.; Jamzad, Z.; Ahmadi, S.; (2007). The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. *Food Chemistry*, 100(3): 1054-1058.
- Seldak, J.; Limdsay.; (1986). Estimation of total protein bound and non-protein sulfidryl groups in tissue with Elman,s reagent. *Anal. Biochem.*; 25: 192-205.
- Swan, DK.; Ford, B.; (1997). Chemoprevention of cancer: review of the literature. *Oncol Nurs Forum*; 24: 719-727.
- Walker, RM.; Racz, WJ.; McElligott, TF.; (1983). Scanning electron microscopic examination of acetaminophen-induced hepatotoxicity and congestion in mice. *Am. J. Pathol*; 113: 321-330.
- Weil, K.; Hooper, L.; Afzal, Z.; Esposito, M.; Worthington, HV.; van Wijk, AJ.; Coulthard, P.; (2007). Paracetamol for pain relief after surgical removal of lower wisdom teeth, *Cochrane Database Syst Rev.*; 18(3): CD004487.