مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال ششم، شماره سوم، پیاپی بیست و سوم، زمستان ۱۳۹۶ (۵۹-۴۹)

مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن بر روی هپاتوتوکسیسیتی ناشی از نانوذره آهن

اکرم بیاتی[۱]، آزاده رسولی[۲]، رضا حاجی حسینی[۳*]، آتوسا وزیری[٤]

۱. دانشجوی ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق

۲. دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق

۳. استاد دانشگاه پیام نور، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، تهران

٤. استادیار دانشگاه پیام نور، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۱۲ – تاریخ تصویب: ۱۳۹٦/۱۱/۲۸)

چکیده

در این مطالعه، به بررسی اثرات حفاظتی اسانس آویشن شیرازی در برابر آسیب کبدی ناشی از نانوذرات آهن در رت‌های نر بالغ پرداخته شده است. حیوانات به سه گروه تقسیم شدند: گروه کنترل منفی؛ حیوانات به مدت سه روز، نرمال سالین دریافت کردند. گروه کنترل مثبت؛ ۲۰۰ mg/kg b.w نانوذره آهن به صورت درون صفاقی به رت های نر به مدت سه روز تزریق شد. گروه تیمار با اسانس آویشن شیرازی؛ حیوانات به مدت ۳ روز ۲۰۰ mg/kg b.w و ۱۰۰ اسانس آویشن را به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کرده‌اند. پس از ۳ روز، از قلب خونگیری و بافت کبد به منظور بررسی پاتولوژیکی و بیوشیمی برداشته شد. فعالیت کبدی با استفاده از پارامترهای بیوشیمیایی مختلف مانند آلانین ترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) ، آلکالین فسفاتاز (ALP)، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پلاسما (FRAP)، لیپید پر اکسیداسیون (LP) و گلوتاتیون احیاء (GSH) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که نانوذرات باعث افزایش AST و LP و کاهش GSH و FRAP می‌شوند، اما بر روی ALT و ALP اثری ندارد. مصـرف اسـانس آویشن AST و LP و GSHرا به حالت نرمال بر می‌گرداند، اما بر روی FRAP تأثیری ندارد. در پایان، تیمار رت ها با نانو ذرات آهن موجب آسیب اکسیداتیو کبدی شده و استفاده از اسانس آویشن می‌تواند در جلوگیری و بهبود این آسیب‌ها مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آویشن شیرازی، نانوذره آهن، سمیت کبدی، استرس اکسیداتیو.

The Study of the Antioxidant Activity of *Zataria Multiflora* Essential Oil on Hepatotoxicity Induced by Iron Nanoparticles

Akram Bayati[1], Azadeh Rasooli[2], Reza Hajihosseini[3*], Atoosa Vaziri[4]

1. M.Sc. Student, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Ph.D Candidate of Biochemistry, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran
3. Professor of Biochemistry Department, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran
4. Professor assistant, Faculty of Science, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: Nov. 2, 2016 - Accepted: Feb. 17, 2018)

Abstract

The present study investigated the protective effects of *Zataria multiflora* essential oil against iron nano-particle induced liver damage in rats. The rats were divided into three groups. Negative control group which was treated with normal saline for three days. Positive control group the males of which received 200 mg/kg b.w iron nano particle intrapertoneally for three days. And treatment group which receieved *Zataria multiflora* oils (100 and 200 mg/kg b.w) intrapertoneally for three days. After three days, blood samples were drawn from the heart, and the liver tissues were removed for biochemical and histological studies. The hepatoprotective activity was assessed using various biochemical parameters such as alanine aminotransferase (ALT), aspartate amino transferas (AST), alkalin phosphatase (ALP), Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP), lipid peroxidation (LP) and glutathione (GSH). The results showed that iron nano particles increased the serum AST and LP levels but decreased FRAP and GSH levels. However, it had no effect on ALT and ALP. Consumption of *Zataria multiflora* oil reversed AST, LP and GSH levels to the normal levels without any effect on FRAP. In conclusion, it could be argued that while treatment of rats with iron nanoparticle would cause induction of oxidative hepatic damage, consumption of *zataria* essential oil could benefit the recovery and prevention of liver damage.

Keywords: *Zataria Multiflora*, Iron Nanoparticle, Hepatotoxicity, Stress Oxidative.

* نویسندهٔ مسئول: رضا حاجی حسینی E-mail: hosseini@pnu.ac.ir

مقدمه

کبد بزرگ‌ترین غده بدن است و آن را می‌توان به کارخانه‌ای شیمیایی تشبیه کرد که وظیفه تولید، تغییر، انبارکردن و دفع‌مواد را به‌عهده دارد (Alavian, 2013).

سم‌زدایی مواد سمی و گزنو بیوتیک‌ها یکی از مهمترین اعمال کبد است. ممکن است در طی این عمل، مقادیر بسیاری از واسطه های اکسیژن فعال تولید شوند (Mitra *et al*., 1998). دوزهای حاد مواد سمی و برخی داروها یا مصرف طولانی‌مدت بعضی مواد می‌تواند موجب تولید مقادیر بالایی از رادیکال‌های آزادشده، که بر سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی غلبه کند و موجب آسیب‌های کبدی شود (Bruck *et al*., 2001; Zaragoza *et al*., 2000). با توجه به این نکته که کبد اعمال منحصر به فردی را انجام می‌دهد و آسیب این عضو منجر به ضررهای غیرقابل جبرانی در بدن می‌شود، بنابراین تحقیق در مورد موادی که باعث حفاظت کبد شوند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Bruck *et al*., 2001; Kim *et al*., 2000).

فناوری نانو[1]، بهره‌برداری از ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی مواد در این مقیاس اندازه‌های کمتر از ۱۰۰ نانومتر در علوم و صنایع مختلف است. یافته‌های اخیر نشان داده است، اگر ذرات یک ماده خاص در حد چند نانومتر کوچک شوند، این ذرات ویژگی‌های متفاوتی با ذرات اولیه خواهند داشت که از جمله می‌توان به فضای سطحی بزرگ (بالا رفتن فعالیت‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی)، انحلال‌پذیری و سطح تحرک بالاتر اشاره کرد (Buzea *et al*., 2007; David., 2008). نانو ماده‌ها موادی در یک، دو و یا سه بعد در اندازه nm ۱۰۰-۱ هستند. در حالی‌که نانو ذرات موادی کروی هستند، که در هر سه بعد در اندازه نانومتری هستند (Gao *et al*., 2007). بسیاری از محققان اخیراً در دستیابی به موارد استفاده دارویی، بخصوص دارورسانی هدفمند نانوساختارها، تصویربرداری پزشکی با کمک نانو ساختارها و وسایل پزشکی در مقیاس نانومتری هستند (Mao *et al*., 2013).

مکانیسم اصلی عملکرد نانوذرات هنوز شناخته نشده است، اما مطالعات مختلف در محیط‌های *invivo* و *invitro* پیشنهاد می‌کنند که آنها قادرند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تولید کنند و بنابراین، روی غلظت کلسیم درون سلولی، فعال کردن فاکتورهای رونویسی و ایجاد تغییر در سایتوکین‌ها می‌توانند نقش داشته باشند (Cristina *et al*., 2007). استرس اکسیداتیو سلولی با بالا رفتن سطح ROS، کاهش بیان GSH و افزایش یافتن لیپید پراکسیداسیون مشخص می‌شود. سوپراکسیدها، هیدروژن پر اکسیدها، هیدروکسیل‌ها و سایر رادیکال‌های اکسیژن قادرند که به طور مستقیم به DNA، پروتئین‌ها و لیپیدهای سلول آسیب وارد کنند (Agarwal, 2003).

امروزه مصرف گیاهان دارویی 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 اثر بخشی بسیاری از این مواد در مجامع علمی و مقبولیت آن در اکثر جوامع بشری است (Swan *et al*., 1977). بسیاری از ترکیبات گیاهی، خواص آنتی‌اکسیدانی دارند و اثر محافظتی در برابر آسیب‌های کبدی ناشی از سموم کبدی و داروها دارند (Chen *et al*., 2002). همچنین در تحقیقی که Sharififar *et al*. (2007) طی تحقیقاتی که بر روی اسانس آویشن شیرازی و خواص آنتی‌اکسیدانی آن کرده بودند، نشان دادند که از عمده‌ترین ترکیبات اسانس آویشن شیرازی شامل thymul (37059%) و carvacrol (33.65%) و p-cymene (7.72%) است. تحقیقات Esmaeilim *et al*. (2010) بر روی گیاهان دارویی و خواص آنتی اکسیدانی ترکیبات آن نشان داد که گیاه آویشن شیرازی یکی دیگر از مهارکننده‌های رادیکال‌های آزاد است. آنها در این آزمایش، یکی از هدف‌های اصلی در تحقیق خود را

1. Nanotecnology

بررسی بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی تیمول معرفی کردند و نشان دادند که تیمول دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار زیاد است (Smaeili *et al*., 2011; Nedyalka *et al*., 1999).

آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، گیاه علفی و معطر با خواص دارویی بسیاری است. از آن در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی استفاده متنوعی می‌شود. قسمت‌های دارویی این گیاه سرشاخه‌ها و برگ‌های خشک‌شده آن است. آویشن محتوی ۰/۸ تا ۲/۶ درصد (معمولاً ۱ در صد) اسانس است که قسمت اعظم آن را فنل‌ها (۲۰ تا ۸۰ درصد)، هیدروکربن‌های مونوترپنی (مثل p-cymene و y-terpinen) و الکل‌ها (مثل linalool,a-terpinene و thujan-4-ol) تشکیل می‌دهد، که گاهی هر کدام از این ترکیبات تا ۸۰ در صد (یا بیشتر) از ترکیبات اسانس را تشکیل می‌دهند. به طور طبیعی، تیمول جزء اصلی فنلی در آویشن است و کارواکرول نیز یک جزء فرعی است (Fatemi *et al*., 2012; Leung *et al*., 1996). ترکیبات روغن اصلی گیاه آویشن شیرازی از طریق کروماتوگرافی گاز مایع[1]، کروماتوگرافی ستون[2]، رزونانس مغناطیسی هسته‌ای[3] و کروماتتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی[4] مورد مطالعه قرار گرفته است (Shafiee & Javidnia, 1997; Ebrahimzadeh *et al*., Mohagheghzadeh *et al*., 2000; 2003; Shaiq Ali *et al*., 2000).

با توجه به مطالعات انجام‌شده استفاده از راهکارهای درمانی به منظور کاهش اثرات مسمومیتی داروها و مواد مختلف ضروری به‌نظر می‌رسد؛ به همین دلیل، در این مطالعه، اثرات اسانس آویشن در تعدیل آسیب‌های کبدی ایجادشده توسط نانوذرات و همچنین تأثیر آن در پارامترهای دخیل در استرس اکسیداتیو و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تیمار حیوانات

موش‌های نر نژاد ویستار با وزن متوسط ۱۰۰ گرم (۳-۴ ماه) از انستیتوپاستور ایران خریداری شدند. غذای حیوانات از کارخانجات فراورده‌های غذایی تهران به صورت Pellet تهیه شد. حیوانات بالغ نیز دسترسی آزاد به غذا و آب آشامیدنی از طریق بطری داشتند. تیمار حیوانات به صورت زیر انجام شد. در گروه کنترل منفی، حیوانات به مدت سه روز نرمال سالین دریافت می‌کنند. در گروه کنترل مثبت، حیوانات به مدت سه روز، هر روز ۲۰۰ mg/kg b.w نانوذره آهن را به صورت تزریق درون صفاقی دریافت می‌کنند. در گروه‌های تیمار، حیوانات به مدت سه روز ۲۰۰ mg/kg b.w و ۱۰۰ اسانس آویشن را به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند.

تهیه هموژن بافت کبد

۷۲ ساعت پس از تزریق نانوذرات آهن، رت‌ها بیهوش شده و از بافت قلب حیوانات خونگیری شد. سپس، خون‌های جمع‌آوری شده به مدت ۱۰ دقیقه با قدرت ۳۰۰۰*g* سانتریفوژ و سرم آن جدا و فوراً به فریزر منتقل شد. بافت کبد رت‌ها به منظور بررسی‌های پاتولوژیکی و بیوشیمی برداشته شد.

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی در پلاسما و بافت کبد در تمام گروه‌ها

اندازه‌گیری میزان پروکسیداسیون لیپیدها (LP) در هموژن بافت کبد

میزان TBARS که به‌طور عمده مالون دی آلدهید[5]

1. GLC: Gas-Liquid Choromotography
2. CC: Column Choromotography
3. NMR: Nuclear magnetic Resonance
4. GC/MS: Gas Choromotography/ mass spectrometry
5. Malone dialdehyde

(MDA) است و به‌عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدها به حساب می‌آید، در هموژن بافت کبد بـه روش اسـپکتروفتومتری و با استفاده از معرف تیوباربیتوریک اسید (TBA)[1] اندازه‌گیری شد (Wills *et al*., 1969).

اندازه‌گیـری سطـح گلـوتاتیون احیاء (GSH) در هموژن بافت کبد

GSH با استفاده از معرف Ellman's و براساس روش Seldak & Lindsay (1968) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیـری ظرفیـت آنتـی‌اکسیدانی کل پلاسما (آزمون FRAP)

روش FRAP[2] که توسط Benzie & Strain (1996) معرفی شد، یک تکنیک حساس، تکرارپذیر و دقیق است. در این روش، غلظت‌های مختلف از محلول استاندارد یون آهن Fe^{2+} با استفاده از محلول ذخیره آهن ۱۰۰۰ میکرومولار تهیه می‌شود، سپس ۱/۵ میلی لیتر از محلول FRAP (محلول TPTZ و محلول $FeCl_3$) در یک لوله آزمایش ریخته می‌شود و ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های مورد آزمایش به آن افزوده شده و کاملاً ورتکس می‌شود. ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جذب نوری کلیه نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳nm در مقابل بلانک (غلظت صفر استاندارد) قرائت و میزان FRAP در نمونه‌های مورد آزمایش بر اساس منحنی استاندارد محاسبه می‌شود.

اندازه‌گیری فعالیـت آنزیـم‌های ALT، AST و ALP در پلاسما به عنوان مارکر بیوشیمیایی آسیب بافتی

اندازه‌گیری پارامترهای مذکور در پلاسما طبق پروتکل تأیید شده موجود در کیت‌های خریداری شده از شرکت پارس آزمون انجام شد.

بررسی هیستوپاتولوژیکی

پس از سه روز رت‌ها کشته شده و بافت کبد برای بررسی هیستوپاتولوژیک برداشته شده، و در بافر فرمالین ۱۰٪ فیکس می‌شوند. برش‌های نازکی به ضخامت ۶-۵ میکرون از بافت بلوک شده در پارافین تهیه و به روش هماتوکسیلیت و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی می‌شوند؛ سپس لام‌ها به‌منظور مقایسه تغییرات بافتی توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفته و عکس‌برداری می‌شوند.

تجزیه و تحلیل آماری

اختلافات و تفاوت‌های بین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۹ و تست ANOVA تعیین شـد. بـا استفتاده از این نرم‌افزار، Pvalue و SEM داده‌ها، مشخص شد که در نمودارها نشان داده شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel ترسیم شده‌اند.

نتایج

تأثیرات اسانس آویشن بر روی پارامترهای استرس اکسیداتیو

بر اساس جدول ۱، میزان MDA در هموژن بافت کبد رت‌ها در زمان ۷۲ ساعت پس از تزریق ۲۰۰ mg/kg.bw نانوذره آهن، اندازه‌گیری شد. نتایج اندازه‌گیری MDA حاکی از آن است که تزریق نانوذرات آهن، ۷۲ ساعت پس از تیمار، منجر به افزایش این شاخص در بافـت کبـد می‌شود (P<۰/۰۵). اما میزان LP به طور قابـل توجـهی بـا مصـرف اسانس آویشن در دو دوز ۲۰۰ mg/kg b.w و ۱۰۰ به میزان معمول برمی‌گردد (P<۰/۰۵). همچنین جدول ۱ نشان می‌دهد که تزریق نانوذرات در ۷۲ ساعت، باعث کاهش میزان گلوتاتیون کبدی شده، که در گروه تیمارشده با اسانس آویشن در دو دوز ۲۰۰ mg/kg b.w و ۱۰۰ میزان GSH به حاالت نرمال برمی‌گردد (P<۰/۰۵). علاوه بر این، تزریق نانـوذرات آهن منجـر بـه کـاهش معنـی‌دار ظرفیت

1. Thiobarbituric acid
2. Feeric reducing ability of plasma

آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما، ۷۲ ساعت پس از تیمار حیوانات می‌شود (P<۰/۰۵). در حالی‌که، مصرف اسانس آویشن در دو دوز mg/kg b.w ۲۰۰ و ۱۰۰ تأثیری در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما ندارد (P>۰/۰۵) (جدول ۱).

تأثیرات اسانس آویشن بر روی آنزیم‌های کبدی

تزریق نانوذرات آهن در دوز mg/kg b.w ۲۰۰ باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم AST می‌شود (P<۰/۰۵) و مصرف اسانس آویشن در دو دوز mg/kg b.w ۲۰۰ و ۱۰۰ باعث برگشت میزان AST به میزان نرمال می‌شود (P<۰/۰۵) (جدول ۲). همچنین، فعالیت آنزیم‌های ALT و ALP در پلاسما تحت تأثیر نانوذره آهن تغییر نمی‌کند (P>۰/۰۵). به علاوه، مصرف اسانس آویشن در دو دوز mg/kg b.w ۲۰۰ و ۱۰۰ نیز تغییری در سطح این مارکرها ایجاد نمی‌کند (جدول ۲).

مطالعات هیستوپاتولوژی بافت کبد

نتایج بررسی‌های بافت‌شناسی نشان دادند که کبد حیوانات گروه کنترل طبیعی بوده، تخریب واکوئل، آسیب هپاتوسلولار و هیچ نکروزی به چشم نخورد و ساختار هسته، سیتوپلاسم، هپاتوسیت‌ها و همچنین بافت پارانشیم و لوبول‌ها در بافت کبد نرمال است. در عین حال، چنانچه تصاویر نشان می‌دهند، دریافت mg/kg.bw ۲۰۰ نانوذرات آهن موجب القای نکروز گسترده هپاتوسلولار و تخریب واکوئل‌ها شده بود. پارانشیم بافت کبد و لوبول‌ها مخصوصاً در اطراف سیاهرگ مرکزی روشن‌تر بودند (شکل B1،۱ وB2). در حالی‌که در گروه تیمار شده با اسانس آویشن در دو دوز mg/kg b.w ۲۰۰ و ۱۰۰، ناحیه نکروز کوچک‌تر شده و نیز از آسیب هپاتوسلولار در این ناحیه تا حدی کاسته شد و تخریب واکوئل‌ها دیده نشد. پارانشیم بافت کبد و لوبول‌ها بویژه نواحی periportal و midzonal روشن‌تر از نرمال است (شکل C1،۱ و C2، D1 و D2).

جدول ۱. فعالیت آنزیم LP و FRAP و GSH پلاسما ۷۲ ساعت پس از تیمار

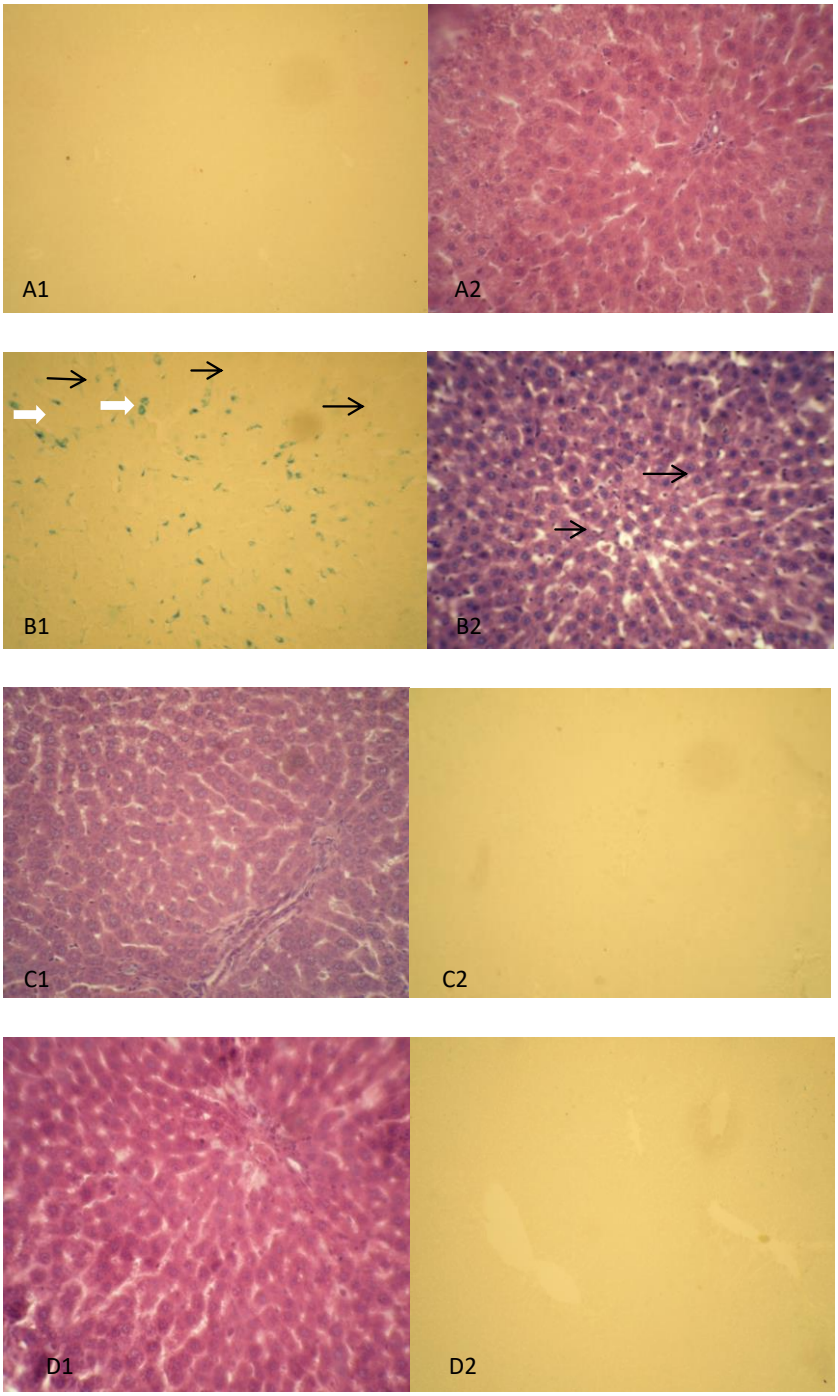
گروه‌ها	LP	GSH	FRAP
	۷۲ ساعت	۷۲ ساعت	۷۲ ساعت
گروه کنترل منفی	۱/۳۹±۰/۱۷	۴۶۰/۴±۱۳/۰۳	۶۳۱/۶۰±۴۰/۳۷
گروه کنترل مثبت	۲/۵۳±۰/۱۱*	۳۴۲/۴±۱۹/۲*	۳۳۶/۰۴±۱۷/۴۵*
گروه تیمار (دوز ۱۰۰ mg/kg b.w)	۱/۴۵±۰/۱۱**	۴۳۵/۲۵±۲۸/۲۸**	۴۴۵/۲۰±۱۵/۱۰
گروه تیمار (دوز ۲۰۰ mg/kg b.w)	۱/۴۱±۰/۱۵**	۴۵۹/۷۵±۱۵/۸۳**	۴۱۲/۲۵±۲۲/۲۷

نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (mean ± SEM) بیان شده است. علامت * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن نتایج در گروه نانوذرات نسبت به گروه کنترل است (P<۰/۰۵).

جدول ۲. میزان فعالیت آنزیم AST و ALT و ALP پلاسما ۷۲ ساعت بعد از تیمار

گروه‌ها	AST	ALT	ALP
	۷۲ ساعت	۷۲ ساعت	۷۲ ساعت
گروه کنترل منفی	۱۱۲±۷/۲۶	۳۷/۸۰±۲/۶۳	۳۶۰±۲۰/۲۴
گروه کنترل مثبت	۱۲۵/۶۰±۸/۳۸*	۳۹/۴۰±۳/۵۵	۳۸۴±۲۲/۰۴
گروه تیمار (دوز ۱۰۰ mg/kg b.w)	۱۲۱/۲۰±۸/۸۶**	۳۶/۲۵±۲/۰۵	۳۶۳/۷±۲۳/۵۷
گروه تیمار (دوز ۲۰۰ mg/kg b.w)	۱۱۳/۵±۷/۶۸**	۳۴±۱/۹۵	۳۶۶/۲±۱۹/۰۸

نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (mean ± SEM) بیان شده است. علامت * نشان‌دهنده معنی‌دار بودن نتایج در گروه نانوذرات نسبت به گروه کنترل است (P<۰/۰۵).



شکل ۱. تأثیرE.O بر تغییرات بافتی کبد بعد از تیمار با نانوذرات آهن. A2 و A1: بافت کبد طبیعی در گروه کنترل. B2 وB1: بافت کبد در گروه نانوذرات تیما نشده با E.O، C2 وC1، D2 وD1: بافت کبد حیوانات در گروه تحت تیمار با نانوذرات و اسانس آویشن در دوزهای ۲۰۰ mg/kg b.w و ۱۰۰ (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی ×۱۰۰ A, C و ۴۰۰ × B, D).

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده و کاربرد نانوفناوری در شاخه‌های مختلف علوم از جمله پزشکی، داروسازی، محیط زیست و صنعت توجه و علاقه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است. با صنعتی شدن نانوتکنولوژی، بررسی اثرات دوزهای مختلف این نانو ذرات و اثرات آنها بر سلامتی حائز اهمیت است.

مکانیسم اصلی نانو ذرات هنوز شناخته نشده

است، اما مطالعات مختلف در محیط‌های *invivo* و *invitro* پیشنهاد می‌کنند که آنها قادرند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[1] را تولید کنند و بنابراین، روی غلظت کلسیم، فعال نمودن فاکتورهای رونویسی و ایجاد تغییر در سایتوکین‌ها می‌توانند نقش داشته باشند (Cristina *et al*., 2007). تجمع ROS می‌تواند منجر به استرس اکسیداتیو شود. در واقع، اختلال در تعامل ردوکس سلولی به دلیل افزایش ROS و اختلال در دفاع آنتی‌اکسیدانی، منجر به تغییرات اکسیداتیو در مولکول‌های فوق می‌شود (Ames *et al*., 1992; Sies *et al*., 2006). درون سلول‌ها سیستم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی برای جلوگیری از استرس اکسیداتیو وجود دارند. در شرایط فیزیولوژیکی سطح شکل‌گیری ROS در تعادل با ظرفیت آنتی‌اکسیدان سلول است. در صورتی‌که سلول به مدت طولانی در معرض استرس‌های محیطی مانند گرما، UV و ... قرار بگیرد و یا در فعالیت دفاعی آنتی‌اکسیدان بدن اختلالی ایجاد شود، این تعادل به هم خورده و سطح شکل‌گیری ROS بیشتر از ظرفیت آنتی اکسیدان بدن می‌شود. نتیجه چنین حالتی ایجاد استرس اکسیداتیو خواهد بود (Alaluf *et al*., 2000; Ames *et al*., 1992). این سیستم‌های حفاظتی شامل گلوتاتیون، تیوردوکسین، سوپر اکسید دسموتاز (SOD)[2]، کاتالاز و پر اکسیداز و ... هستند (Behl *et al*., 2005).

در این مطالعه، ارزیابی اثر سمیت حاد نانوذرات آهن به‌علت کاربرد زیاد آنها در صنایع، بر فاکتورهای بیوشیمی کبد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق نشان داد که نانوذرات آهن باعث افزایش LP (جدول ۱) و AST (جدول ۲)، کاهش GSH (جدول۱) و همچنین کاهش معنی‌داری در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما (جدول ۱) شده، در صورتی‌که بر روی فعالیت آنزیم ALT و ALP تأثیر چندانی ندارد (جدول ۲).

نانوذرات آهن یک ماده اکسید کننده هستند که توسط سیستم آنتی‌اکسیدانی تولید ROS می‌کنند و این ماده پروتئین‌ها و لیپیدهای غشا را مورد حمله قرار می‌دهد، و موجب تجزیه پروتئین‌ها و پراکسیداسیون لیپیدها (افزایش LP) و در نهایت، استرس اکسیداتیو می‌شود. در نتیجه، آسیب‌های وارده به کانال‌های یونی و لیپیدهای غشایی تبادل کنترل نشده یون‌های کلسیم و دیگر یون‌ها باعث مهار فسفوریلاسیون اکسیداتیو درون‌سلولی می‌شود (Jeon *et al*., 1999). همچنین، حجم هسته و هستک‌ها افزایش یافته و در نهایت منجر به نکروز کبدی می‌شود (Amad *et al*., 2002). آسیب‌های وارد شده به سلول توسط افزایش در آنزیم‌های کبدی SGPT، SGOT و ALP در سرم مشخص می‌شود؛ زیرا این آنزیم‌ها درون سیتوپلاسم بوده و بعد از آسیب سلولی وارد گردش خون می‌شوند (Mitra *et al*., 1998).

از طرفی، گلوتاتیون، یک آنتی‌اکسیدان آمینو اسیدی است که عامل فعال آن گروه HS (تیول) است. این ترکیب، هم در خون و هم در بافت‌ها یافت می‌شود و یکی از نقش‌های آن، جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها در غشاهای بیولوژیکی است. گلوتاتیون می‌تواند به طور مستقیم یا به عنوان سوبسترای آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون S- ترانسفراز در سم‌زدایی پراکسی هیدروژن، لیپید هیدروپراکسیدها و ترکیبات الکتروفیلیک شرکت کند (Nordberg *et al*., 2001). همچنین MDA به‌عنوان مارکر استرس اکسیداتیو، آخرین محصول تجزیه لیپیدها است. حضور بالای رادیکال‌های آزاد مخصوصاً پراکسیدها نقش کلیدی در بیماری‌زایی تعدادی از بیماری‌ها مانند دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان، پیری و انتواع بیماری‌های دیگر دارد (Ahmadvand *et al*., 2014). فرایند پراکسیداسیون چربی، یک فرایند اتوکاتالیتیک است و

1. Reactive oxygen species
2. Superoxide dismutase

موجب تصلب شرائین، سرطان و التهاب می‌شود (Valko *et al*., 2006). از دیگر عوارض پراکسیداسیون چربی می‌توان به پیری، آترواسکلروز، آب مروارید، آرتریت روماتوئید و اختلال، در بازسازی سلول‌های عصبی اشاره کرد (Niki *et al*., 2005). در تحقیق Sichani *et al*. (2012) نشان داده شده که موش‌های تیمار شده با نانوذرات نقره افزایش معنی‌داری در میزان مالون دی آلدئید سرم و کاهش معنی‌داری را در میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز سرم و گلوتاتیون پراکسیداز گلبول‌های قرمز نشان دادند.

در بسیاری از مواقع، مکانیسم‌های مهاری مختلف در بدن نمی‌توانند نقش حفاظتی کاملی را اعمال کنند و نیاز به ترکیب‌های کمکی بویژه آنتی‌اکسیدان‌های غذایی است. برخی ترکیب‌های طبیعی و سنتتیک دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است که در محافظت از کبد در مقابل عوامل مخرب نقش مهمی دارند (Adewusi & Afolayan, 2010; Heidarian *et al*., 2011). گیاهان دارویی به‌دلیل سهولت دسترسی، عوارض جانبی کمتر، سمیّت اندک و قیمت ارزان به عنوان جایگزین‌های شیمیایی همواره مورد توجه بوده‌اند. مطالعه Goudarzi *et al*. (2006) نشان داد که عصاره الکلی آویشن شیرازی دارای اثرات چشمگیری بر روی سویه‌های اشرشیاکلی انترو هموراژیک است، ولی معرفی آن به عنوان یک ترکیب ضد باکتریایی نیاز به تحقیقات وسیع‌تری دارد. در مطالعه Azadbakht *et al*. (2002) روی تأثیر آویشن شیرازی بر تریکوموناس واژینالیس نشان داد که تأثیر آویشن شیرازی بر روی تریکوموناس واژینالیس نسبت به داروی مترونیدازول خیلی بیشتر بوده است.

مطالعه Soltan Dallal *et al*. (2012) نشان داد که اسانس آویشن شیرازی بر استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به تتراسایکلین، اریترومایسین، تری متوپریم، سولفا متوکسازول و متی‌سین ایزوله شده از مواد غذایی اثرات خوبی دارد. همچنین Olivera *et al*. (2006) در تحقیقات خود نشان دادند که گیاهانی که درصد تیمول و کارواکرول بیشتری دارنتد، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار بالاتری هستند.

بر مبنای این اطلاعات، در این تحقیق بعد از تیمار حیوانات با دوزهای توکسیک نانوذرات آهن و تیمار آنها با اسانس آویشن، توانایی محافظتی این گیاه در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از نانوذرات با اندازه‌گیری گلوتاتیون، AST، ALT، ALP و FRAP مورد بررسی قرار داده شد. در این تحقیق، مصرف اسانس آویشن در دو دوز ۲۰۰ mg/kg b.w و ۱۰۰ باعث برگشت LP و GSH وAST به میزان نرمال می‌شود (جدول‌های ۱ و ۲) و تأثیری بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما (FRAP) (جدول۱) و آنزیم ALT و ALP (جدول ۲) ندارد. همچنین، تیمار حیوانات با اسانس آویشن منجر به کاهش آسیب‌های پاتولوژیک بافت کبد ناشی از مصرف نانوذرات آهن شده و میزان نکروز سلول‌های کبدی ناشی از پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشاء هپاتوسیت‌ها نیز کمتر شده است (شکل ۱). این نتایج نشان می‌دهد که آویشن، اثرات نانوذرات را کم و اثر حفاظتی بر کبد داشته و این اثر محافظتی می‌تواند در ارتباط با ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در این گیاه باشد.

در تحقیق Eedi *et al*. (2005) بر روی اثر عصاره الکلی دانه شنبلیله بر فعالیت آنزیم‌های کبدی در موش صحرایی نر نشان داده است که احتمالاً عصاره الکلی دانه گیاه شنبلیله با کاهش آسیب در سلول‌های کبدی و همچنین با کاهش سطح لیپیدهای کبدی و جلوگیری از تشکیل کبد چرب باعث کاهش سطح آنزیم‌های ALT و AST در پلاسما می‌شود همچنین، در تحقیق Cheraghi *et al*. (2015) بر تأثیر عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه جعفری بر آسیب‌شناسی بافتی و فعالیت آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین نشان داد که فعالیت آنزیم‌های کبدی (ALP, AST, ALT) در گروه دیابتی در مقایسه با کنترل غیردیابتی

افزایش معنی‌داری دارد (P<۰/۰۱). مداخله عصاره گیاهی موجب کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌ها و ترمیم بافت آسیب‌دیده کبد در موش‌های دیابتی شد (P<۰/۰۱). Peeri *et al.* (2012) بر روی اثر آبی زعفران بر غلظت آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی کبدی در موش‌های دیابتی شده با استرپتوتوزوسین نشان دادند که غلظت گلوتاتیون در گروه زعفران- فعالیت هوازی بیشترین افزایش و گروه کنترل- دیابتی کمترین افزایش را داشت. در تحقیق Sichani *et al.* (2012) بر روی تأثیر عصاره الکلی اسپند بر غلظت مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در موش‌های تیمارشده با نانوذرات نقره نشان داد که گروه تیمار شده با نانوذرات نقره افزایش معنی‌داری در غلظت مالون‌دی‌آلدئید و کاهش معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پر اکسیداز صورت گرفت (P<۰/۰۰۱). همچنین، عصاره اتانولی اسپند اثرات فوق را معکوس نمود به‌طوری‌که غلظت مالون‌دی‌آلدئید کاهش پیدا کرده و افزایش معنی‌داری در میزان آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پر اکسیداز ایجاد شد (P<۰/۰۰۱).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تیمار حیوانات با اسانس آویشن منجر به کاهش آسیب‌های پاتولوژیک بافت کبد ناشی از مصرف نانوذرات آهن شده است و میزان نکروز سلول‌های کبدی ناشی از پر اکسیداسیون فسفولیپیدهای غشاء هپاتوسیت‌ها نیز کمتر شده است. این موضوع منجر به مهار افزایش سطح AST سرم به عنوان مارکر آسیب کبدی و مهار افزایش LP و کاهش GSH شده است.

REFERENCES

Adewusi, E.A.; Afolayan, A.J. (2010). A review of natural products with hepatoprotective activity. J Med Plant Res; 4(13): pp. 1318-1334.

Agarwal, A.; Saleh, R.A.; Bedaiwy, M.A. (2003). Role of reacyive oxygen species in the pathophysiology of human reproductive. Fertile steril; 79(4): pp. 829-43.

Ahmadvand, H.; Amiri, H.; Dalvand, H.; Bagheri, S. (2014). Various antioxidant properties of essential oil and hydroalcoholic extract of Artemisa persica. J. Birjand Univ Med Sci; 20(4): pp. 416-424.

Alaluf, S.; Muir-Howie, H.; Hu, HL.; Evans, A.; Green, M.R. (2000). Atmospheric oxygen accelerates the induction of a post-mitoticphenotype in human dermal fibroblasts: the key protective role of glutathione. Differentiation; 66: pp. 147-55.

Alavian, S.M. (2013). Comprehensive guide to the public cirrhosis. Chapter I: p. 341.

Amad, A.; Pillai, K.K.; Najmi, A.K.; Pal, S.N. (2002). Evaluation of hepatoprotective potential of jigrinepost-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. J Ethnopharmacology; 79: pp. 35-41.

Ames, B.N.; Shigenaga, M.K. (1992). Oxidants are a major contributorto aging. Ann N Y Acad Sci; 663: pp. 85-96.

Azadbakht, M. H.; Ziaei, H.; Abdollahi, F.; Shabankhani, B. (2002). Effect of essential oils of *Artemisia aucheri*, *Zataria multiflora*, and *Myrtus communis* L. on Trichomonas vaginalis J. of medicinal plants; 8: pp. 35-40.

Behl, C. (2005). Oxidative stress in Alzheimer›s disease: implications for prevention and therapy. Subcell Biochem; 38: pp. 65-78.

Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem; 239: pp. 70-76.

Bruck, R.; Shirin, H.; Aeed, H.; Matas, Z. (2001). Prevention of hepatic

cirrhosis in rats by hydroxyl Radical scavengers. J. Hepatology; 35: p. 45.

Bruck, R.; Shirin, H.; Aeed, H.; Matas, Z. (2001). Prevention of hepatic cirrhosis in rats by hydroxyl radical scavengers. J. Hepatology; 35: pp. 457 - 464.

Buzea, C.; Blandino, I.; Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles:Sources and toxicity. Biointerphases; 2: MR17-MR172.

Chen, J.W.; Zhu, Z.Q.; Hu, T.X.; Zhu, D.Y.; (2002). Structure activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radicalscavenging effect. Acta Pharmacol Sin; 23: pp. 667-72.

Cheraghi, J.; Krishchi, P.; Nasri, S.; Borbor, M. (2015). The effect of ethanolic extracts of Petroselinum crispum leaves on histopathological and activity of liver enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. J. Ilam Univ Med Sci; 23(7): pp. 190-202.

David, B.; (2008). How meaningful are the resuls of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterilaztion?. Toxicol Sci.; 101: pp. 183-185.

Eedi, A.; Eedi, M.; Sokhteh, M. (2005). Effect of alcohol extract of fenugreek seeds on the activity of liver enzymes in rats. J. Med Plants.

Fatemi, F.; Asri, Y.; Rasooli, I.; Alipoor, S.H.D.; Shaterloo, M. (2012). Chemical composition and antioxidant properties of γ-irradiated Iranian *Zataria multiflora* extracts. Pharm Biol; 50(2): pp. 232-238.

Gao, L.; Zhuang, J.; Nie, L.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Gu, N.; *et al*. (2007). Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. Nat Nanotechnol; 9: pp. 577-83.

Goudarzi, M.; Sattari, M.; Najar piraieh, S.; Goudarzi, G.; Bigdeli, M. (2006). Antibacterial effects of aqueous and alcoholic extracts of Thyme on enterohemorrhagic Escherichia coli. Yafteh; 3(8): pp. 69-63.

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): pp. 1110-1114.

Karam Sichani, S.; Naghsh, N.; Razmi, N. (2012). Effects of alcoholic extract of *Peganumharmala* L. on malondialdehyde concentration and catalaseand glutathione peroxidase activity in mice treated with nanosilver particles. J Mazand Univ Med Sci; 22(95): 10-17.

Kim, K.H.; Bae, J.H.; Cha, S.W.; Han, S.S. (2000). Role of metabolic activation by cytochorome P450 in thioacetamide-induced suppression of antibody response in male BALB/C mice. Toxicol Lett; 114: pp. 225-235.

Leung, A.Y.; Foster, S. (1996). Encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs, and cosmetics. A Wiley Interscience Publication. John Wiley & Sons, Inc; p.649.

Mao, H.Y.; Laurent, S.; Chen, W.; Akhavan, O.; Imani, M.; Ashkarran, A.A.; Mahmoudi, M. (2013). Graphene: promises, facts, opportunities, and challenges in nanomedicine. Chem Rev; 113: pp. 3407-3424.

Mitra, S.K.; Venkataranganna, M.V.; Sundaram, R.; Gopumadhavan, S. (1998). Protective effect of HD-03 a herbal formulation against various hepatoxic agents in rats. J Ethnopharmacology; 63: pp. 181-186.

Niki, E.; Yoshida, Y.; Saito, Y.; Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. Biochem Biophys Res Commun; 338: pp. 668-676.

Nordberg, J.; Arner, E. (2001). Reactive oxygen species, antioxidant, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Bio Med; 31(11): pp. 1287-312.

Peeri, M.; Mosalman Haghighi, M.; Azarbayjani, M.A.; Khajelou, A. (2012). The effect of aqueous extract of saffron and aerobic training on concentration of hepatic non-enzymatic antioxidant levels

in stz-induced diabetic rats. Q J sport Biosci Res; 2: pp. 5-16.

Politeo, O.; Juki, M.; Milo, M. (2006). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants. Croatica Chemica Acta; 545-552.

Seldak, J.; Limdsay.; (1986). Estimation of total protein bound and non-protein sulfidryl groups in tissue with Elman,s reagent. Anal.Biochem; 25: pp. 192-205.

Sharififar, F.; Moshafi, Mansouri, S.H.; Khodashenas, M.; Khosoodi, M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. Food Cont; 18: pp. 800-805.

Soltan Dallal, M.M.; Bayat, M.; Yazdi, M.H.; Agha Amiri, S.; Ghorbanzadeh, M.; Abedi, T.; *et al.* (2012). Evaluation of the antimicrobial effect of essential oils on Staphylococcus thyme antibiotic resistant Staphylococcus aureus isolated from food. Kurdistan Med J; XVII: pp. 29-21.

Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncola, J.; Izakovic, M.; Mazura, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact; 160: pp. 1-40.

Wills, E.D. (1969). Lipid peroxide formation in microsomes: General consideration. Biochem J; 113: pp. 315-324.

Zaragoza, A.; Andres, D.; Sarrion, D.; Cascales, M. (2000). Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by phenobarbital pretreatment in rats, inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. Chem Biol Interact; 124: pp. 87-101.