

## تأثیر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) در جلوگیری از آسیب‌های بافت کبد در رت‌های تحت تیمار با تتراکلرید کربن

محمدحسین عبدالمحمدی<sup>۱\*</sup>، ابوالفضل دادخواه تهرانی<sup>۲</sup> و معصومه بابایی<sup>۳</sup>

\*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، ایران

پست الکترونیک: mh.abdolmohammadi@gmail.com

۲- استادیار، گروه پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، ایران

۳- کارشناس، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، ایران

تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۳

تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۳

### چکیده

تتراکلرید کربن طی متابولیسم توسط سیتوکروم P450 به رادیکال  $CCL_3O$  تبدیل می‌شود. این متابولیت فعال توسط آنزیم گلویتایون-s-ترانسفراز (GST: Glutathion s-transferase) با اتصال به گلویتایون باعث کاهش GSH کبدی و ایجاد آسیب اکسیداتیو در سلول‌ها می‌شود. به همین دلیل، ترکیب‌های دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌توانند از بروز آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از  $CCL_4$  جلوگیری کنند. در این مطالعه، رت‌ها به ۵ گروه تقسیم شدند. تتراکلرید کربن با دوز ۲ ml/kg bw و اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) با دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg bw و همچنین BHT با دوز ۱۰ mg/kg bw به صورت درون صفاقی (iP) به رت‌ها تزریق شد و نمونه‌های خون و کبد در زمان‌های مختلف پس از تزریق دارو جمع‌آوری شد. فعالیت آنزیم GST، سطح گلویتایون احیاء (GSH) و میزان پراکسیداسیون لیپیدها (LP: Lipid Peroxidation) در هموزن بافت کبد و همچنین سطح مارکرهای آسیب بافتی (ALP (Alkaline Phosphatase)، AST (Aspartate Amino Transferase)، ALT (Alanine Amino Transferase) و بیلی‌روبین) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، در پلاسما اندازه‌گیری شد. نتایج این تحقیق نشان داد که تزریق  $CCL_4$  منجر به کاهش فعالیت آنزیم GST و همچنین کاهش سطح GSH و افزایش سطح LP در کبد شد که با افزایش سطح AST و ALT همراه بود. تیمار رت‌ها با اسانس آویشن همانند BHT منجر به جلوگیری از تغییرات فوق‌گرددید. به‌طور کلی،  $CCL_4$  منجر به القاء آسیب اکسیداتیو در بافت کبد شد و تیمار رت‌ها با اسانس آویشن، احتمالاً به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی قوی، می‌تواند تا حدودی از بروز این آسیب‌ها در بافت کبد جلوگیری کند.

واژه‌های کلیدی: آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.)، تتراکلرید کربن، کبد، رت.

### مقدمه

قرار گرفت. هم‌اکنون از  $CCL_4$  به‌عنوان مدلی برای مطالعه آسیب‌های کبدی نظیر کبد چرب، فیپروزیس، مرگ ناشی از مسمومیت کبد و سرطان کبد و همچنین مکانیسم تأثیر

تتراکلرید کربن ( $CCL_4$ ) برای اولین بار به‌عنوان حلال و پاک‌کننده چربی‌ها در سطح خانگی و صنعتی مورد استفاده

گیاه درمانی دانش کهنسالی است که ریشه در اعماق تاریخ دارد و همواره یکی از پایه‌های اصلی مکاتب طبی مشهور از قبیل مکاتب رایج در تمدن‌های باستانی مصر، هند، بابل، چین، آشور، یونان و ایران بوده است. امروزه تعداد قابل توجهی از داروهای موجود، شامل اسانس و عصاره‌های تام گیاهی و یا ترکیب‌های جداسازی شده از گیاهان نظیر آتروپین، دیگوسین، هیوسین و حتی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند. آویشن یکی از شناخته شده‌ترین گیاهان دارویی از تیره نعنا می‌باشد که گونه‌های مختلفی از آن در کوهستان‌های ایران می‌روید و نام‌های گوناگونی دارد. در طب سنتی از این گیاه به‌عنوان ضداسپاسم، درمان سیاه‌سرفه، برونشیت، عفونت ریه، سرماخوردگی، آنفلوآنزا و برای درمان نفخ و گرفتگی‌های عضلانی استفاده می‌شود. عصاره آویشن حاوی ماده‌ای به نام «تیمول» است که برای بیماری آسم مفید است. به همین دلیل محصولات زیادی به‌ویژه به‌صورت شربت از آن تهیه شده است. خاصیت ضد میکروبی تیمول، بسیار قوی و حدود ۲۵ بار از فنل در مورد تعدادی از میکروب‌ها، بیشتر است (Eftekhar *et al.*, 2009). تیمول و کاراکرول از جمله مهمترین ترکیب‌های اسانس آویشن می‌باشند که بیش از ۷۰٪ اسانس را تشکیل می‌دهند. وجود این ترکیب‌ها در اسانس آویشن، دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی آن می‌باشد (Fatemi *et al.*, 2012). امروزه یافتن فرمولاسیون‌های جدید به‌ویژه با منشأ گیاهی از جمله راهبردهای درمانی است. بنابراین در این مطالعه، با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی برخی گیاهان سنتی ایران و عصاره‌های آنها، عملکرد اسانس گیاه دارویی آویشن در کاهش آسیب‌های ناشی از مسمومیت کبدی حاصل از  $CCl_4$  مورد بررسی قرار گرفته است. در این طرح تأثیر این اسانس بر روی سطح پارامترهای دخیل در استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانی از جمله پراکسیداسیون لیپیدها (LP)، میزان گلووتاتیون احیاء (GSH) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما (FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma) و همچنین سطح مارکرهای پلاسمایی آسیب بافت کبد (آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و بیلی‌روبین) در موش‌های صحرایی مطالعه خواهد شد.

داروهای هپاتوتوکسیک، به میزان زیادی استفاده می‌شود (Weber *et al.*, 2003). مسمومیت با  $CCl_4$  و یا دیگر هالوآلکان‌ها از طریق مکانیسم‌های متفاوتی از جمله اتصال کوالان متابولیت‌ها، پراکسیداسیون لیپیدها، ایجاد آلدئیدهای فعال، هیپومتیلاسیون اسیدهای نوکلئیک و فعال کردن سایتوکین‌های التهابی انجام می‌شود.  $CCl_4$  به‌وسیله ایزوآنزیم‌های مختلف سیتوکروم P450 نظیر CYP2E1، CYP2B1 و CYP2B2 متابولیزه شده و رادیکال تری‌کلرومتیل  $CCl_3$  را تشکیل می‌دهد. این رادیکال با ماکرومولکول‌های سلولی (اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و لیپیدها) اتصال برقرار کرده، در نتیجه فرایندهای مهم سلولی از جمله متابولیسم چربی‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Muriel *et al.*, 2001). اتصال بین  $CCl_4$  و DNA نیز به‌عنوان شروع‌کننده سرطان کبد عمل می‌کند. همچنین پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع در فسفولیپیدهای غشاء، نفوذپذیری غشاء میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی و غشاء پلاسمایی را تغییر داده و منجر به از دست رفتن کلسیم سلول و در نهایت تخریب سلول می‌گردد (Muriel *et al.*, 2001). همچنین، محصولات پراکسیداسیون لیپیدها نظیر مالون دی‌آلدئید با اتصال به پروتئین‌ها، از فعالیت آنزیم‌های مهم جلوگیری می‌کنند. به‌علاوه، مسمومیت با  $CCl_4$  می‌تواند منجر به هیپومتیلاسیون اجزاء و ماکرومولکول‌های سلولی از جمله RNA و در نتیجه مهار سنتز پروتئین گردد (Zimmermann *et al.*, 1976; Muriel *et al.*, 2001). به‌طور کلی، مجموعه‌ای از فرایندهای فوق منجر به مرگ سلولی حاصل از مسمومیت با  $CCl_4$  می‌گردد (Muriel *et al.*, 2001). با توجه به یافته‌های فوق، روشن است که  $CCl_4$  با تولید رادیکال‌های آزاد و اکسیداسیون بیوماکرومولکول‌ها منجر به آسیب و مرگ سلول می‌شود، بنابراین آنتی‌اکسیدان‌ها و گیرنده‌های رادیکال‌های آزاد می‌توانند با متوقف کردن واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون لیپیدها از آسیب‌های سلولی ناشی از متابولیت  $CCl_4$  جلوگیری کنند. در این میان بسیاری از مواد طبیعی از جمله محصولات گیاهان دارویی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و بی‌تأثیر نیستند (Weber *et al.*, 2003).

## مواد و روشها

استخراج اسانس آویشن توسط دستگاه کلونجر (Clevenger) در این روش ۱۰۰ گرم از اندام‌های هوایی آویشن پودر شده و با ۱ لیتر آب در بالن مخصوص دستگاه مخلوط شد و به مدت ۲ ساعت جوشانده شد. سپس اسانس استخراج شده از آب در قسمت نزولی دستگاه جدا شد و در لوله‌های تیره در فریزر نگهداری شد. شرایط کار با حیوانات توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس مورد تأیید قرار گرفت.

### تیمار حیوانات و نمونه‌گیری

در این تحقیق از ۱۰۰ سر رت نر بالغ نژاد ویستار استفاده شد که به صورت تصادفی به ۵ گروه (هر گروه شامل ۵ سر رت) تقسیم شدند. حیوانات از انستیتو پاستور ایران خریداری شده و به خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی قم منتقل شدند. غذای حیوانات از کارخانجات فرآورده‌های غذایی تهران تهیه شده که به صورت pallet با فرمول استاندارد بود. در طول مدت آزمایش حیوانات در شرایط نرمال نگهداری شدند و دسترسی به آب و غذای کافی داشتند.

روش تیمار حیوانات به صورت زیر می‌باشد:

- گروه کنترل: در این گروه حیوانات ۵۰۰ میکرولیتر حلال اسانس (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) و روغن زیتون ۲ ml/kg bw به صورت ip دریافت کردند.

- گروه CCl<sub>4</sub>: در این گروه همانند گروه قبل و CCl<sub>4</sub> که به نسبت ۱ به ۱ در روغن زیتون حل شده بود با دوز ۲ ml/kg bw به صورت ip به حیوانات تزریق شد.

- گروه‌های تیمار CCl<sub>4</sub>+ اسانس: در این گروه CCl<sub>4</sub> همانند گروه قبل و اسانس آویشن با دوزهای mg/kg ۲۰۰ و ۱۰۰ به صورت ip به رت‌ها تزریق شد.

سپس در زمان‌های مختلف (۴، ۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت) پس از تزریق CCl<sub>4</sub>، رت‌ها توسط اتر بیهوش شدند و نمونه خون توسط سرنگ هپارینه از بافت قلب حیوانات جمع‌آوری شد. همچنین بافت کبد رت‌ها نیز به منظور بررسی‌های بیوشیمیایی برداشته شده و پس از شستشو در

نرمال سالین سرد در یک فویل آلومینیوم در فریزر نگهداری شد.

جدا کردن پلاسما و انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی در پلاسما

نمونه خون در ۳۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و پلاسما توسط سمپلر جدا شده و در میکروتیوب در فریزر نگهداری شد.

### سنجش مارکرهای آسیب کبدی در پلاسما

فعالیت آنزیم‌های ALT، AST، ALP و همچنین سطح بیلی‌روبین در پلاسما توسط کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون ایران و طبق پروتکل ارائه شده در کیت به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما (آزمون FRAP)

روش FRAP (Ferric reducing ability of plasma) یک تکنیک حساس، تکرارپذیر و دقیق است. در این روش غلظت‌های مختلف از محلول استاندارد یون آهن Fe<sup>2+</sup> تهیه شد. سپس محلول کار FRAP (محلول TPTZ و محلول FeCl<sub>3</sub>) به پلاسما و همچنین محلول‌های استاندارد اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میزان جذب نوری کلیه نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۳nm در مقابل بلانک (غلظت صفر استاندارد) قرائت شد و میزان FRAP در نمونه‌های مجهول براساس منحنی استاندارد محاسبه شد.

### تهیه هموژن بافت کبد

بخشی از نمونه‌های بافت کولون و کبد جدا شد و در یک لوله آزمایش با بافر فسفات سالین (Phosphate Buffer Saline: PBS) سرد (pH=۷/۳) مخلوط گردید و توسط دستگاه هموژنایزر، بافت همگن شد و هموژن ۲۰٪ وزنی-حجمی تهیه شد.

میزان MDA در هر نمونه توسط ضریب خاموشی آن محاسبه می‌شود (Wills, 1969).

#### روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمام داده‌های حاصل از گروه‌های تجربی با استفاده از نرم‌افزار SPSS توسط آزمون one-way ANOVA و تعقیبی توکی محاسبه و در ۵ گروه کلی مطرح شده در روش اجرا مقایسه شدند. همچنین با استفاده از این نرم‌افزار، سطح معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) محاسبه شد.

#### نتایج

تأثیر اسانس آویشن بر روی سطح AST در پلاسما در رت‌های تحت تیمار با  $CCL_4$

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، سطح AST پلاسما در زمان ۴ ساعت پس از تزریق  $CCL_4$  به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد ( $p < 0.05$ ,  $F = 4.61$ ) و تا ۲۴ ساعت نیز نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $p < 0.05$ ,  $F = 4.021$ ). همچنین نتایج اندازه‌گیری AST نشان می‌دهد که تیمار حیوانات با اسانس آویشن همانند آنتی‌اکسیدان مرجع (BHT: Butylated hydroxytoluene) تا حدودی از افزایش سطح این مارکر جلوگیری کرده، به طوری که سطح آن در این گروه‌های تیمار، به صورت معنی‌داری کمتر از گروه  $CCL_4$  است ( $p < 0.05$ ,  $F = 4.123$ ).

تأثیر اسانس آویشن بر روی سطح ALT در پلاسما در رت‌های تحت تیمار با  $CCL_4$

شکل ۲ نشان می‌دهد که سطح ALT پلاسما ۴ ساعت پس از تزریق  $CCL_4$  به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته که تا ۲۴ ساعت نیز ادامه دارد ( $p < 0.05$ ,  $F = 4.724$ ). تیمار رت‌ها با اسانس آویشن همانند BHT از افزایش شدید آن جلوگیری کرده، به طوری که سطح ALT در گروه‌های تیمار به صورت معنی‌داری کمتر از گروه  $CCL_4$  است ( $p < 0.05$ ,  $F = 3.998$ ).

اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم گلوکوتاتیون S-ترانسفراز در هموزن بافت کبد

فعالیت آنزیم GST به روش Habig و با استفاده از سوبسترای CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. در این روش، آنزیم GST موجود در نمونه منجر به اتصال CDNB به گلوکوتاتیون شده و در نهایت جذب کمپلکس حاصل با گذشت زمان در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Habig et al., 1974). فعالیت ویژه آنزیم براساس واحد آنزیم به ازای هر میلی‌گرم پروتئین که توسط آزمون برادفورد اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976)، محاسبه گردید.

اندازه‌گیری میزان گلوکوتاتیون احیاء (GSH) در هموزن بافت کبد

GSH با استفاده از معرف Ellman's و براساس روش Seldak و Lindsay اندازه‌گیری شد. در این روش گلوکوتاتیون با ترکیبی به نام دی‌تیو نیتروبنزوئیک اسید (Dithiobis-2-nitrobenzoic acid: DTNB) کمپلکسی را تشکیل می‌دهد که در طول موج ۴۱۲nm جذب دارد. در نهایت میزان GSH به کمک منحنی استاندارد محاسبه شد (Seldak & Lindsay, 1968).

سنجش مقدار MDA (Malondialdehyde) به عنوان محصولات پراکسیداسیون لیپیدها در بافت کبد

مالون دی‌آلدئید (MDA)، که ناشی از شکست هیدروپراکسیدها در جریان پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد، از جمله ترکیب‌هایی است که به طور مؤثری با معرف تیوباریتوریک اسید (TBA) واکنش داده و به همین دلیل، این گونه ترکیب‌ها، مواد واکنش‌دهنده با تیوباریتوریک اسید (Thiobarbituric Acid Reactive Substances: TBARS) نامیده می‌شوند. اندازه‌گیری TBARS رایج‌ترین روش برای سنجش پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد. اساس این روش بر اتصال MDA با TBA و تشکیل کمپلکس صورتی رنگ است که در طول موج ۵۲۵nm حداکثر جذب را دارد. در نهایت

۸ ساعت از تزریق  $CCL_4$  افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد که تا ۲۴ ساعت روند صعودی را طی می‌کند ( $p < 0.05$ ,  $F = 3.97$ ). تیمار حیوانات با اسانس آویشن و BHT از افزایش سطح MDA در هموژن بافت کبد در اثر  $CCL_4$  جلوگیری می‌کند، به طوری که سطح MDA در این گروه‌های تیمار کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد ( $p < 0.05$ ,  $F = 3.81$ ).

تأثیر اسانس آویشن بر روی سطح گلوتاتیون احیا (GSH) در هموژن بافت کبد رت‌های تحت تیمار با  $CCL_4$  سطح گلوتاتیون احیا در هموژن بافت کبد ۴ ساعت پس از تزریق  $CCL_4$  کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد که تا ۲۴ ساعت نیز ادامه دارد ( $p < 0.05$ ,  $F = 4.11$ ) (شکل ۷). تیمار حیوانات با اسانس آویشن و BHT از کاهش سطح GSH در بافت کبد جلوگیری کرده، به طوری که سطح گلوتاتیون در این گروه‌های تیمار به صورت معنی‌داری بیشتر از سطح آن در گروه  $CCL_4$  است ( $p < 0.05$ ,  $F = 4.27$ ) (شکل ۷).

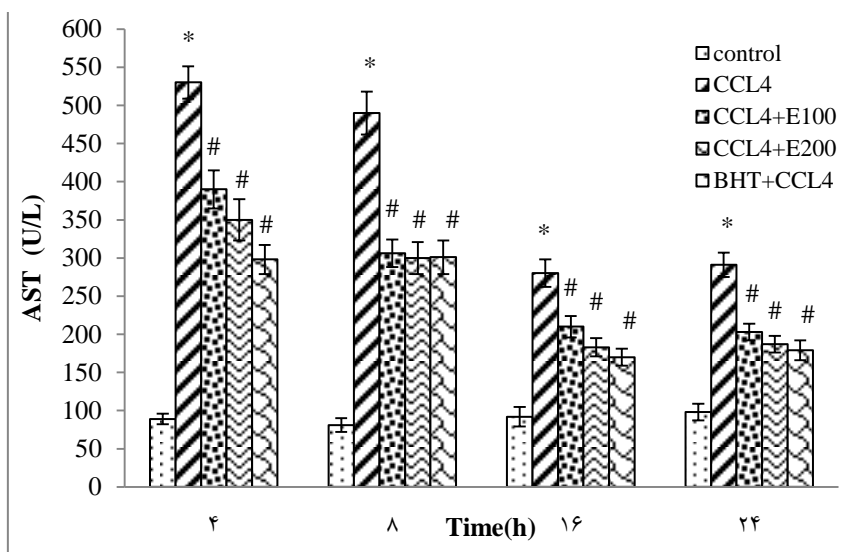
تأثیر اسانس آویشن بر روی فعالیت آنزیم گلوتاتیون S-ترانسفراز (GST) در هموژن بافت کبد رت‌های تحت تیمار با  $CCL_4$  شکل ۸ نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم GST در بافت کبد در اثر تزریق  $CCL_4$  کاهش می‌یابد، به طوری که سطح آن در گروه  $CCL_4$  در زمان ۲۴ ساعت به صورت معنی‌داری کمتر از گروه کنترل است ( $p < 0.05$ ,  $F = 4.26$ ). تیمار رت‌ها با اسانس آویشن و BHT از کاهش فعالیت این آنزیم جلوگیری کرده و سطح آن را در حد گروه کنترل حفظ می‌کند.

تأثیر اسانس آویشن بر روی سطح ALP در پلاسما در رت‌های تحت تیمار با  $CCL_4$  نتایج اندازه‌گیری سطح ALP نشان می‌دهد که تزریق  $CCL_4$  تأثیری در سطح این مارکر در پلاسما نسبت به گروه کنترل ایجاد نمی‌کند ( $p > 0.05$ ) و سطح ALP در گروه‌های تیمار با اسانس آویشن و BHT نیز تفاوت معنی‌داری را با گروه  $CCL_4$  نشان نمی‌دهد ( $p > 0.05$ ) (شکل ۳).

تأثیر اسانس آویشن بر روی سطح بیلی‌روبین در پلاسما در رت‌های تحت تیمار با  $CCL_4$  شکل ۴ نشان می‌دهد که سطح بیلی‌روبین پلاسما در گروه  $CCL_4$  تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان نمی‌دهد ( $p > 0.05$ ) و تیمار رت‌ها با اسانس آویشن نیز تأثیری در سطح بیلی‌روبین پلاسما ایجاد نمی‌کند ( $p > 0.05$ ).

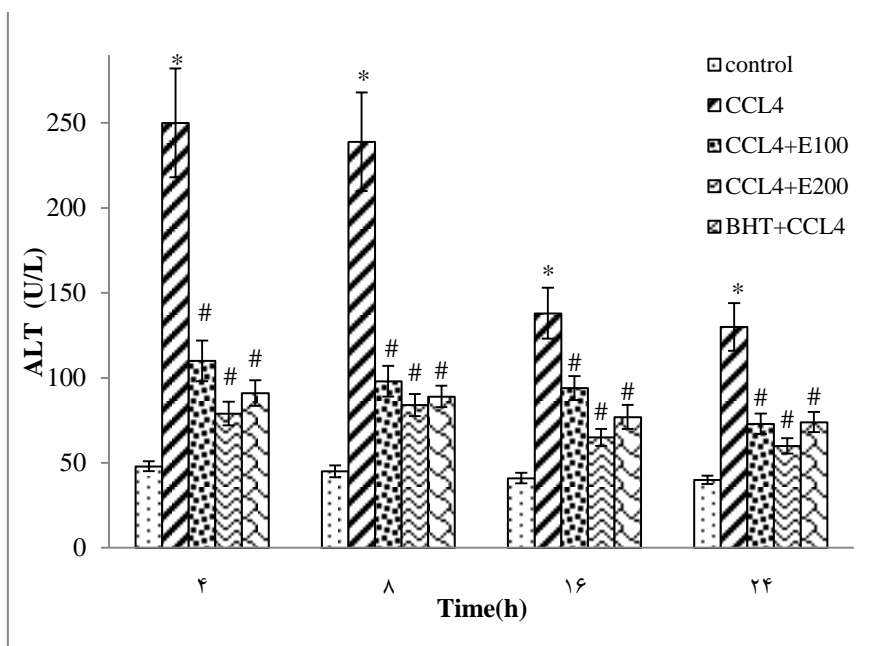
تأثیر اسانس آویشن بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما (FRAP) در رت‌های تحت تیمار با  $CCL_4$  شکل ۵ نشان می‌دهد که تزریق  $CCL_4$  پس از گذشت ۱۶ ساعت منجر به القاء ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما و افزایش معنی‌دار FRAP نسبت به گروه کنترل می‌شود که تا ۲۴ ساعت نیز ادامه دارد ( $p < 0.05$ ,  $F = 4.12$ ). همچنین تیمار رت‌ها با اسانس آویشن و BHT از القاء این پارامتر جلوگیری کرده و سطح آن را در حد گروه کنترل حفظ می‌کند.

تأثیر اسانس آویشن بر روی میزان پراکسیداسیون لیپیدها در هموژن بافت کبد رت‌های تحت تیمار با  $CCL_4$  همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، سطح MDA به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها پس از گذشت



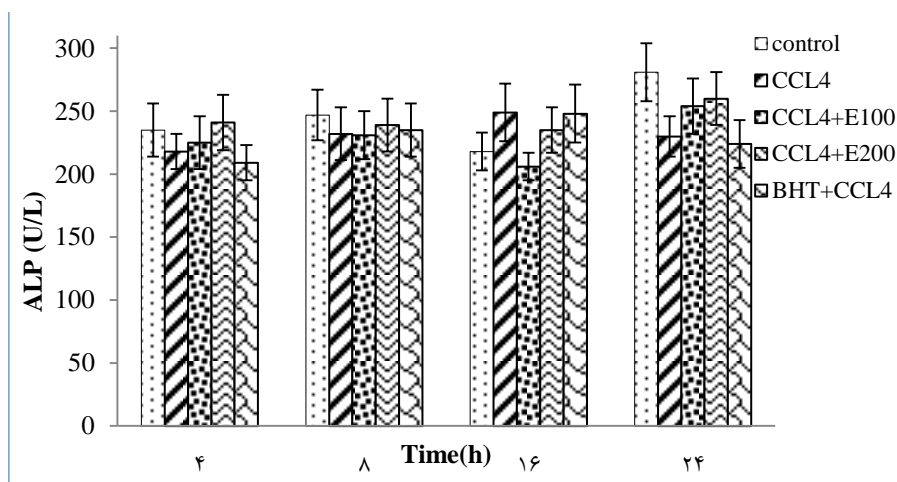
شکل ۱- تأثیر اسانس آویشن بر روی فعالیت آنزیم AST در پلاسما

در گروه کنترل فقط حلال اسانس و CCL<sub>4</sub> تزریق شده است. در گروه بعد، مخلوط CCL<sub>4</sub> و روغن زیتون با دوز ۲ml/kg bw تزریق شده است. در گروه‌های تیمار، علاوه بر CCL<sub>4</sub>، اسانس آویشن در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg bw و همچنین BHT در دوز ۱۰ mg/kg bw تزریق شده است. مقادیر براساس میانگین ۵ نمونه ± انحراف معیار گزارش شد. علامت \*، نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CCL<sub>4</sub> بوده که با گروه کنترل معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ). علامت #، نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CCL<sub>4</sub> معنی‌دار هستند ( $p < 0.05$ ).



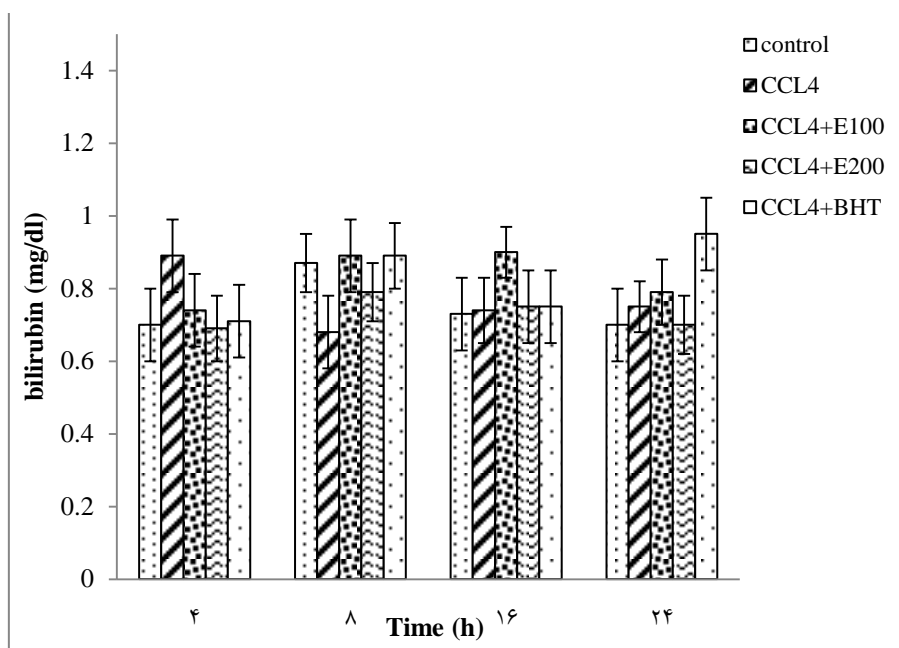
شکل ۲- تأثیر اسانس آویشن بر روی فعالیت آنزیم ALT در پلاسما

حیوانات در گروه کنترل حلال اسانس و CCL<sub>4</sub> دریافت کردند. حیوانات در گروه CCL<sub>4</sub> مخلوط CCL<sub>4</sub> و روغن زیتون با دوز ۲ml/kg bw دریافت کردند. در گروه‌های تیمار، علاوه بر CCL<sub>4</sub>، اسانس آویشن در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg bw و همچنین BHT در دوز ۱۰ mg/kg bw تزریق شده است. مقادیر براساس میانگین ۵ نمونه ± انحراف معیار گزارش شد. علامت \*، نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CCL<sub>4</sub> بوده که با گروه کنترل معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ). علامت #، نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CCL<sub>4</sub> معنی‌دار هستند ( $p < 0.05$ ).



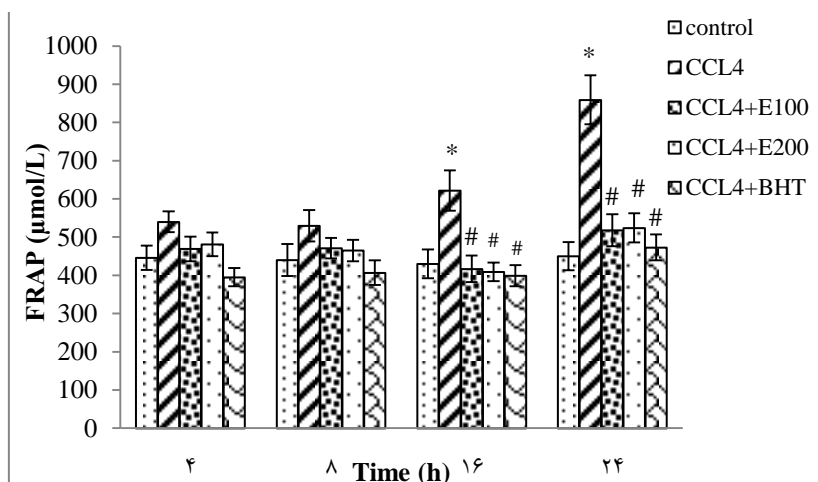
شکل ۳- تأثیر اسانس آویشن بر روی فعالیت آنزیم ALP در پلاسما

به حیوانات در گروه کنترل، DMSO به عنوان حلال اسانس و همچنین روغن زیتون تزریق شد. حیوانات در گروه CCL<sub>4</sub> مخلوط CCL<sub>4</sub> و روغن زیتون با دوز ۱۰ mg/kg دریافت کردند. در گروه‌های تیمار، علاوه بر CCL<sub>4</sub>، اسانس آویشن در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg bw و همچنین BHT در دوز ۱۰ mg/kg bw تزریق شده است. مقادیر براساس میانگین ۵ نمونه ± انحراف معیار گزارش شد.



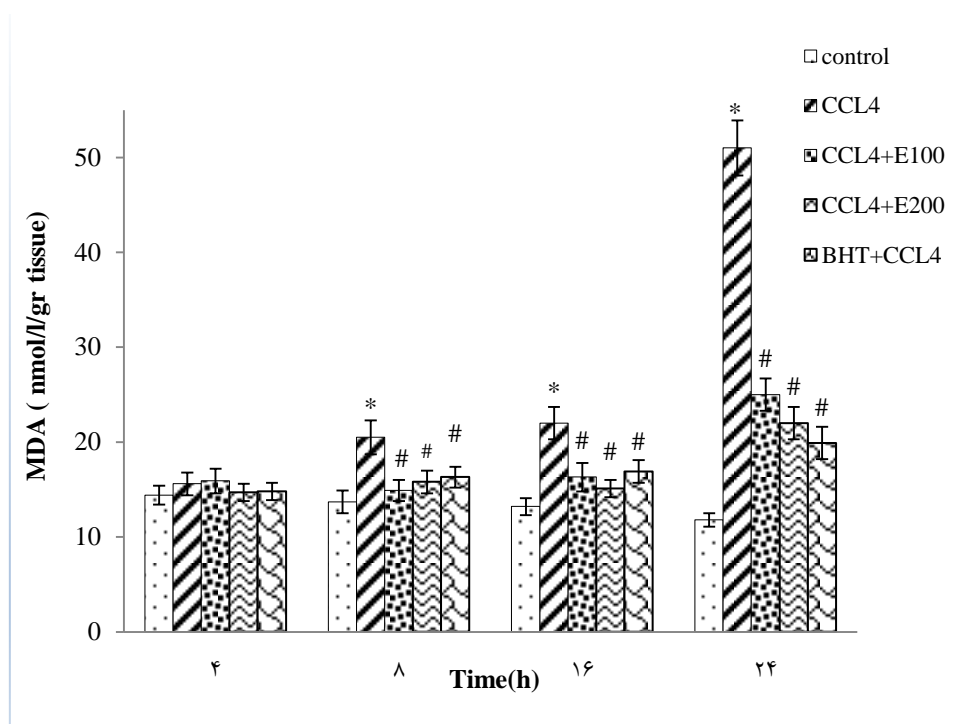
شکل ۴- تأثیر اسانس آویشن بر روی سطح بیلی‌روبین در پلاسما

در گروه کنترل فقط حلال اسانس و CCL<sub>4</sub> تزریق شده است. در گروه بعد، مخلوط CCL<sub>4</sub> و روغن زیتون با دوز ۲ ml/kg bw تزریق شده است. در گروه‌های تیمار، علاوه بر CCL<sub>4</sub>، اسانس آویشن در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg bw و همچنین BHT در دوز ۱۰ mg/kg bw تزریق شده است. نتایج به صورت میانگین ۵ سر رت در هر گروه ± انحراف معیار ارائه شده است.



شکل ۵- تأثیر اسانس آویشن بر روی سطح FRAP در پلاسما

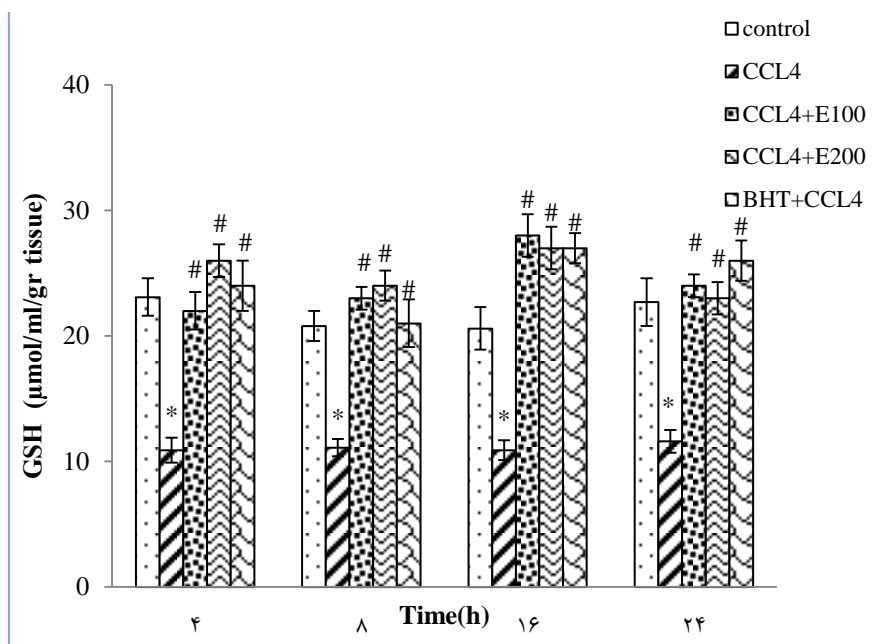
حیوانات در گروه کنترل حلال اسانس و CCL<sub>4</sub> دریافت کردند. حیوانات در گروه CCL<sub>4</sub> مخلوط CCL<sub>4</sub> و روغن زیتون با دوز ۲ ml/kg bw دریافت کردند. در گروه‌های تیمار، علاوه بر CCL<sub>4</sub>، اسانس آویشن در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg bw و همچنین BHT در دوز ۱۰ mg/kg bw تزریق شده است. مقادیر براساس میانگین ۵ نمونه ± انحراف معیار گزارش شد. علامت \*، نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CCL<sub>4</sub> بوده که با گروه کنترل معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ). علامت #، نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CCL<sub>4</sub> معنی‌دار هستند ( $p < 0.05$ ).



شکل ۶- تأثیر اسانس آویشن بر روی سطح MDA در هموژن بافت کبد

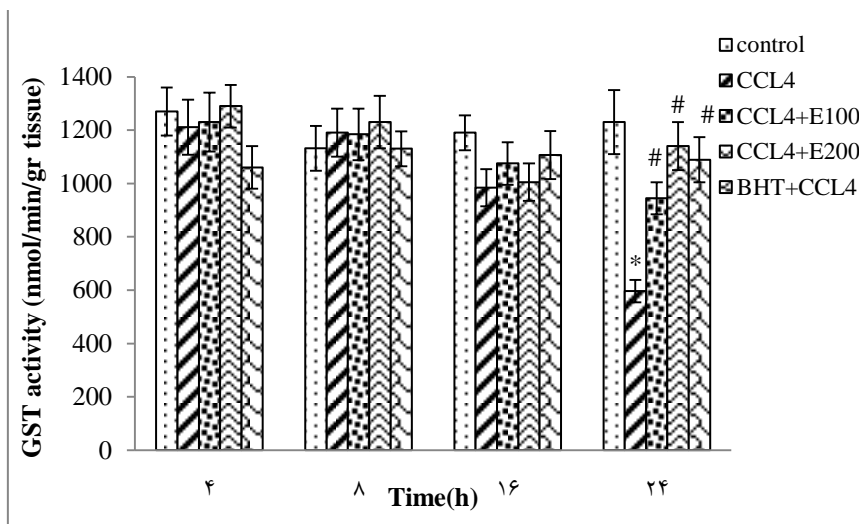
در گروه کنترل فقط حلال اسانس و CCL<sub>4</sub> تزریق شده است. در گروه بعد، مخلوط CCL<sub>4</sub> و روغن زیتون با دوز ۲ ml/kg bw تزریق شده است. در گروه‌های تیمار، علاوه بر CCL<sub>4</sub>، اسانس آویشن در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg bw و همچنین BHT در دوز ۱۰ mg/kg bw تزریق شده است. مقادیر براساس میانگین ۵ نمونه ± انحراف معیار گزارش شد. علامت \*، نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CCL<sub>4</sub> بوده که با گروه کنترل معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ). علامت #، نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CCL<sub>4</sub> معنی‌دار هستند ( $p < 0.05$ ).





شکل ۷- تأثیر اسانس آویشن بر روی سطح GSH در هموژن بافت کبد

به حیوانات در گروه کنترل، DMSO به عنوان حلال اسانس و همچنین روغن زیتون تزریق شد. حیوانات در گروه CCL4 مخلوط CCL4 و روغن زیتون با دوز ۱۰ mg/kg bw دریافت کردند. در گروه‌های تیمار، علاوه بر CCL4، اسانس آویشن در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg bw و همچنین BHT در دوز ۱۰ mg/kg bw تزریق شده است. مقادیر براساس میانگین ۵ نمونه ± انحراف معیار گزارش شد. علامت \*، نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CCL4 بوده که با گروه کنترل معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ). علامت #، نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CCL4 معنی‌دار هستند ( $p < 0.05$ ).



شکل ۸- تأثیر اسانس آویشن بر روی فعالیت آنزیم GST در هموژن بافت کبد

در گروه کنترل فقط حلال اسانس و CCL4 تزریق شده است. در گروه بعد، مخلوط CCL4 و روغن زیتون با دوز ۲ ml/kg bw تزریق شده است. در گروه‌های تیمار، علاوه بر CCL4، اسانس آویشن در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg bw و همچنین BHT در دوز ۱۰ mg/kg bw تزریق شده است. نتایج به صورت میانگین ۵ سر رت در هر گروه ± انحراف معیار ارائه شده است. علامت \*، نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه CCL4 بوده که با گروه کنترل معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ). علامت #، نشان‌دهنده نتیجه حاصل از آنالیز آماری گروه‌های مختلف تیمار بوده که با گروه CCL4 معنی‌دار هستند ( $p < 0.05$ ).

## بحث

گیاهان بسیاری در درمان مسمومیت و بیماری‌های کبدی در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که بسیاری از آنها حاوی ترکیب‌های پلی‌فنلی و فلاونوئیدها می‌باشند. گیاهان دارویی به دلیل سهولت دسترسی، عوارض جانبی کمتر، سمیت اندک و قیمت ارزان به‌عنوان جایگزین‌های شیمیایی همواره مورد توجه بوده‌اند (Janbaz *et al.*, 2002). در این راستا در تحقیق حاضر سعی شده است تا اثرات مفید گیاه آویشن شیرازی در جلوگیری از آسیب‌های کبدی ناشی از  $\text{CCl}_4$  و همچنین تأثیر آن در فاکتورهای دخیل در استرس اکسیداتیو مورد مطالعه قرار گیرد.

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، تزریق  $\text{CCl}_4$  منجر به آسیب سلول‌های کبدی می‌شود، به طوری که سطح مارکرهای آسیب کبدی (ALT و AST) بلافاصله پس از تزریق  $\text{CCl}_4$  افزایش یافته و تا ۲۴ ساعت نیز نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (شکل‌های ۱ و ۲). محققان علت سمیت  $\text{CCl}_4$  را شکسته شدن پیوند بین کربن-کلر دانسته که به دنبال آن رادیکال آزاد تری‌کلرومتیل ایجاد می‌شود. این رادیکال بسیار فعال بوده و به سرعت با ترکیب‌های غشای سلول واکنش می‌دهد و همچنین به اسیدهای چرب غیراشباع متصل شده و یک اتم هیدروژن را از لیپیدهای غشاء جدا می‌کند. بنابراین، یک لیپید رادیکالی و کلروفرم تولید می‌شود. لیپیدهای رادیکالی با مولکول اکسیژن واکنش می‌دهند، در نتیجه فسفولیپیدهای موجود در غشاء و شبکه اندوپلاسمیک تجزیه شده و باعث آزاد شدن آنزیم‌ها می‌شود و در نهایت این واکنش‌ها منجر به مرگ سلول و نکروز سلولی می‌گردد (Ahmad *et al.*, 2002). تغییرات ناشی از تتراکلریدکربن شبیه بیماری‌های کبدی مزمن ناشی از ویروس‌ها می‌باشد. رادیکال‌های آزاد حاصل از  $\text{CCl}_4$  با تخریب غشاء هپاتوسیت افزایش فعالیت آنزیم‌های ذکر شده را سبب شده و همین عامل باعث می‌شود آنزیم‌هایی که در حالت طبیعی درون سیتوزول سلولی قرار دارند وارد جریان خون شوند و افزایش فعالیت این آنزیم‌ها

در پلاسما بیانگر میزان و نوع آسیب‌های کبدی است (Ozbek *et al.*, 2003).

البته میزان فعالیت آنزیم ALP پس از تزریق دوز  $2 \text{ ml/kg bw}$  تتراکلریدکربن در مقایسه با گروه کنترل و گروه دریافت کننده توأم تتراکلریدکربن و آویشن تغییر معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (شکل ۳). ALP یک پروتئین داخل غشایی در مجاری صفراوی می‌باشد. در صورت آسیب یا انسداد مجاری صفراوی، تجمع صفرا منجر به انحلال فسفولیپیدهای غشاء سلول‌های مجاری صفراوی و خروج ALP از این مجاری به جریان خون می‌شود. عدم افزایش سطح ALP در اثر تزریق  $\text{CCl}_4$  در این تحقیق نشان‌دهنده عدم آسیب مجاری صفراوی می‌باشد.  $\text{CCl}_4$  در فاز I متابولیسم سموم طی عمل آنزیم سیتوکروم P450 در کبد به متابولیت فعال خود تبدیل می‌شود. این ترکیب در ادامه در فاز II متابولیسم سموم، در اثر فعالیت آنزیم GST، با گلوکوتایون ترکیب شده و دفع می‌شود و در نتیجه سطح GSH در سلول‌های کبدی کاهش می‌یابد. کاهش GSH منجر به واکنش متابولیت فعال  $\text{CCl}_4$  با ماکرومولکول‌های سلولی و ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب‌های اکسیداتیو به بافت‌ها می‌شود. نتایج حاصل از اندازه‌گیری سطح GSH نشان می‌دهد که میزان GSH پس از تزریق دوز  $2 \text{ ml/kg bw}$  در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد که احتمالاً یکی از دلایل مهم ایجاد آسیب کبدی پس از تزریق  $\text{CCl}_4$  در این تحقیق می‌باشد (شکل ۷). همچنین تیمار حیوانات با اسانس آویشن از کاهش GSH جلوگیری کرده، در نتیجه آسیب‌های کبدی ناشی از  $\text{CCl}_4$  را تا حدودی بهبود می‌بخشد. همچنین در این تحقیق به منظور بررسی نقش آویشن در کاهش آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تتراکلریدکربن در کبد، میزان MDA به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها اندازه‌گیری شد. میزان MDA در بافت کبد حیواناتی که  $\text{CCl}_4$  دریافت کرده‌اند در مقایسه با گروه کنترل منفی به طور معنی‌داری افزایش یافته است

سطح GSH، منجر به افزایش فعالیت آنزیم GST نیز می شود (شکل ۸)؛ بنابراین احتمالاً بخشی از اثرات محافظتی خود را از طریق افزایش دفع متابولیت های فعال  $CCl_4$  از کبد اعمال می کند.

اگرچه مکانیسم های محافظتی درون سلولی به میزان زیادی آسیب های ناشی از ROS را کاهش می دهند، اما به علت فراوانی تولید این رادیکال های آزاد، وجود راه های محافظتی دیگری به ویژه مصرف گیاهان دارویی با خواص آنتی اکسیدانی برای سلامت انسان بسیار مهم می باشد (Ulican *et al.*, 2003). گیاهان فراوانی در درمان مسمویت ها و بیماری های کبدی در طب سنتی کاربرد دارند. براساس مطالعات انجام شده، ۱۱۰ گیاه متعلق به ۵۵ خانواده نظیر خارمریم، قاصدک و شاه تره نقش حفاظت کبدی دارند (Evans, 1996). مطالعات اخیر ما نیز نشان می دهند که اسانس گیاه *Achillea wilhelmsii* و *Hypericum scabrum* قادر به جلوگیری از آسیب های کبدی ناشی از مصرف دوز توکسیک استامینوفن در رت هستند (Dadkhah *et al.*, 2014a, 2014b).

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان می دهد که تزریق  $CCl_4$  منجر به کاهش ذخائر GSH کبد و در نتیجه آسیب اکسیداتیو هپاتوسیت ها و نکروز این سلول ها می گردد. این فرایندها در نهایت به صورت افزایش سطح MDA در بافت کبد و افزایش سطح ترانس آمینازها در پلاسما نمایان می شوند. همچنین تیمار حیوانات با اسانس آویشن با خواص آنتی اکسیدانی بالا منجر به حفظ ذخائر GSH کبد و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها می شود. از طرفی اسانس آویشن یا القاء فعالیت آنزیم GST منجر به افزایش دفع متابولیت فعال  $CCl_4$  و در نتیجه کاهش آسیب های کبدی ناشی از آن می گردد.

### سپاسگزاری

این مقاله با بودجه پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قم انجام شده است. بدین وسیله از مسئولین محترم دانشگاه و کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند، تشکر و قدردانی می گردد.

(شکل ۶) که نشان دهنده پراکسیداسیون و آسیب اکسیداتیو بافت کبد در اثر  $CCL_4$  می باشد. به علاوه تیمار حیوانات با اسانس آویشن از پراکسیداسیون لیپیدها توسط  $CCl_4$  جلوگیری کرده، به طوری که سطح MDA در گروه های تیمار با اسانس آویشن به طور معنی داری کمتر از میزان آن در گروه  $CCl_4$  می باشد. همان طور که قبلاً توضیح داده شد  $CCl_4$  طی متابولیسم در کبد به متابولیت فعال خود تبدیل می شود که از طرفی منجر به تولید رادیکال های آزاد اکسیژن ROS شده و از طرفی با اتصال به GSH منجر به کاهش شدید سطح GSH در هپاتوسیت ها می شود. در نتیجه رادیکال های آزاد در سلول تجمع یافته که منجر به اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع در فسفولیپیدهای غشاء هپاتوسیت ها و افزایش سطح MDA در این بافت می شود. نتایج تحقیقات گذشته ما در مورد آنالیز ترکیب های اسانس آویشن و بررسی خواص آنتی اکسیدانی آن در *in vitro* نشان می دهد که تیمول و کارواکرول بیشترین میزان را در اسانس آویشن تشکیل می دهند و این دو ترکیب باعث خواص آنتی اکسیدانی بسیار زیادی در اسانس می شوند (Fatemi *et al.*, 2012). از این رو می توان نتیجه گیری کرد که تیمار حیوانات با اسانس آویشن، منجر به افزایش توان آنتی اکسیدانی سلول ها و در نتیجه حفظ ذخائر گلوکوتاتیون کبد و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدها در مواجهه با  $CCl_4$  می شود. همچنین نتایج این تحقیق نشان می دهد که فعالیت آنزیم GST در بافت کبد در زمان ۲۴ ساعت پس از تزریق تتراکلریدکربن نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری پیدا می کند. با توجه به نقش آنزیم GST در فاز II متابولیسم مواد سمی و نقش آن در سم زدایی تتراکلریدکربن به نظر می رسد که کاهش قابل ملاحظه فعالیت آنزیم GST پس از تزریق دوز سمی تتراکلریدکربن منجر به کاهش دفع متابولیت فعال  $CCl_4$  از کبد می شود، در نتیجه تجمع بیشتر این ترکیب منجر به پیشرفت فرایند استرس اکسیداتیو و آسیب هپاتوسیت ها می شود. از طرفی، اسانس آویشن، علاوه بر تأثیر روی

- منابع مورد استفاده**
- Janbaz, K.H., Saeed, S. and Gilani, A.H., 2002. Protective effect of rutin on Paracetamol and CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*, 73: 557-563.
  - Muriel, P., Alba, N., Pérez-Alvarez, V.M., Shibayama, M. and Tsutsumi, V.K., 2001. Kupffer cells inhibition prevents hepatic lipid peroxidation and damage induced by carbon tetrachloride. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130(2): 219-226.
  - Ozbek, H., Ozturk, M., Bayarm, I., Ugras, S. and Citoglu, G.S., 2003. Hypoglycemic and hepatoprotective effects of *Foeniculum vulgare* Miller seed fixed oil extract in mice and rats. *Eastern Journal of Medicine*, 8: 35-40.
  - Sedlak, J. and Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total protein with bound and non-protein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25: 192-205.
  - Ulican, O., Greksak, M., Vancova, O., Zlatos, L., Galbavy, S., Bozek, P. and Nakano, M., 2003. Hepatoprotective effect of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats. *Physiology Research*, 52(4): 461-466.
  - Weber, L.W.D., Boll, M. and Stampfl, A., 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*, 33(2):105-136.
  - Wills, E.D., 1969. Lipid peroxide formation in microsomes: general consideration. *Biochemical Journal*, 113: 315-324.
  - Zimmermann, H.J., 1976. Experimental hepatotoxicity: 1-120. In: Harenberg, J., Lesch, R., Mackey, I.R. and Zimmermann, H.J., (Eds.). *Experimental Production of Diseases* (Vol. 16- Part 5). Springer, New York, 378p.
  - Ahmad, B., Alam, T., Varshney, M. and Khan, S.A., 2002. Hepatoprotective of two plants belonging to the Apiaceae and the Euphorbiaceae family. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3): 313-316.
  - Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
  - Dadkhah, A., Fatemi, F., Ababzadeh, S., Roshanaei, K., Alipour, M. and Sadegh Tabrizi, B., 2014a. Potential preventive role of Iranian *Achillea wilhelmsii* C. Koch essential oils in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Botanical Studies*, 55: 37-47.
  - Dadkhah, A., Fatemi, F., Eslami Farsani, M., Roshanaei, K., Alipour, M. and Aligolzadeh, M., 2014b. Hepatoprotective effects of Iranian *Hypericum scabrum* essential oils against oxidative stress induced by acetaminophen in rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(3): 340-348.
  - Eftekhari, F., Raei, F., Yousefzadi, M., Ebrahimi, S.N. and Hadian, J., 2009. Antibacterial activity and essential oil composition of *Satureja spicigera* from Iran. *Zeitschrift für Naturforschung*, 64: 20-24.
  - Evans, W.C., 1996. *Trease and Evans Pharmacognosy*. W.B. Saunders, 612p.
  - Fatemi, F., Asri, Y., Rasooli, I., Alipoor, Sh.D. and Shaterloo, M., 2012. Chemical composition and antioxidant properties of  $\gamma$ -irradiated Iranian *Zataria multiflora* extracts. *Pharmaceutical Biology*, 50(2): 232-238.
  - Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biology and Chemistry*, 249(22): 7130-7139.

## Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oils on prevention of liver injuries in rats treated with carbon tetrachloride

M.H. Abdolmohammadi<sup>1\*</sup>, A. Dadkhah<sup>2</sup> and M. Babaei<sup>3</sup>

1\*- Corresponding author, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran, E-mail: mh.abdolmohammadi@gmail.com

2- Department of Medicine, Faculty of Medicine, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran

3- Department of Chemistry, Faculty of Science, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran

Received: September 2014

Revised: November 2014

Accepted: November 2014

### Abstract

Carbon tetra chloride converts to  $CCL_3O$  by cytochrom P 450 that conjugate with glutathione by GST, leading to GSH depletion and oxidative injuries. Therefore, the compounds with antioxidant activity can prevent oxidative damages induced by  $CCL_4$ . In this study, the rats were divided into five groups treated with  $CCL_4$ , (2ml/kg bw), essential oil (100 and 200 mg/kg bw) and BHT (10mg/kg bw) (ip). In following, the liver and blood were removed after administrations. The activity of GST, reduced glutathione (GSH), and lipid peroxidation (LP) levels were measured in liver homogenate. In addition, total antioxidant activity and the level of hepatic marker (AST, ALT, ALP and bilirubin) were measured in plasma of rats. The results showed that  $CCL_4$  caused GSH depletion and reduction of GST activity in liver, leading to increased liver LP level and transaminase activities (AST and ALT) in plasma. Treatments of rats with essential oil as same as BHT prevent the changes of these parameters. We can conclude that  $CCL_4$  induces hepatic oxidative damages in rats. Treatment of rats with essential oils, probably due to its antioxidant activity, can partly prevent the induction of liver injuries.

**Keyword:** *Zataria multiflora* Boiss., carbon tetrachloride, liver, rat.