

تاثیر نانوامولسیون صمغ زدو- اسانس آویشن شیرازی در مهار رادیکال‌های آزاد خارج سلولی و بیان ژن *NAD(P)H oxidase* در گندم

فاطمه سهرابی^{۱*}، غلامرضا کاووسی^۲

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

^۲دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۰۵

چکیده

تولید گونه‌های فعال اکسیژن به خصوص پراکسید هیدروژن امری اجتناب ناپذیر در متابولیسم هوازی است. از آن‌جا که این ترکیبات در غلظت‌های متفاوت، بر فرآیندهای گوناگونی در سلول موثر هستند و افزایش بیش از حد آن‌ها به تنش‌های اکسیدی منجر می‌شود، کنترل غلظت آن‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش از اسانس آویشن شیرازی با ترکیبات فنولی (تیمول، کارواکرول) فراوان و پلیمر صمغ زدو به منظور کپسوله سازی و تولید نانوامولسیون استفاده گردید. تاثیر نانوامولسیون صمغ زدو- اسانس آویشن شیرازی در مهار رادیکال‌های آزاد ۲،۲-آزینوبیس-(۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید) (ABTS: 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) و پراکسید هیدروژن در خارج از سلول و بیان ژن (NOX: *NAD(P)H oxidase*) با شماره دسترسی AY561153 (بزرگ‌ترین تولید کننده گونه‌های فعال اکسیژن) مورد بررسی قرار گرفت. نانوامولسیون با محتوای فنول ۸۸ میلی گرم در گرم، توانایی بالایی در مهار رادیکال‌های آزاد ABTS و پراکسید هیدروژن از خود نشان داد. از طرفی نانوامولسیون در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر موجب افزایش و در غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر موجب کاهش بیان ژن NOX گردید. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد نانوامولسیون در غلظت‌های متفاوت بر گونه‌های فعال اکسیژن تاثیر داشته و در نتیجه توانایی کنترل تنش‌های اکسیدی را دارا است.

واژه های کلیدی: گونه‌های فعال اکسیژن، آویشن شیرازی، صمغ زدو، ژن *NAD(P)H oxidase*.

این میان گیاهان دارویی مانند آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) از خانواده نعنائیان با داشتن ترکیبات فراوان فنولی مانند تیمول و کارواکرول با خواص ضد میکروبی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی ویژه، بسیار مورد توجه هستند (Kavoosi and Rabiei, 2015). تیمول و کارواکرول مونوترپن‌های فنولی با گروه‌های عملکردی متیل و ایزوپروپیل در موقعیت پارا نسبت به یکدیگر هستند. تفاوت این دو تنها به دلیل اختلاف موقعیت گروه هیدروکسیل در حلقه فنولی است. ترکیبات فنولی از طریق گروه هیدروکسیل آزاد روی حلقه آروماتیک عمل آنتی‌اکسیدانی خود را انجام می‌دهند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود وابسته است (Berger, 2007). با وجود مزایای مختلف، اسانس گیاهان دارویی دارای محدودیت‌هایی از جمله ناپایداری، تبخیر و فرار بودن هستند. تولید نانوامولسیون‌هایی از اسانس گیاهان دارویی و پلیمرهای زیستی مانند صمغ زرد در برطرف ساختن این نواقص بسیار مفید می‌باشد. زرد، صمغی (گروهی از پلی ساکاریدها) است شفاف، به سه رنگ سفید، زرد و قرمز که از درخت بادام‌کوهی (*Amygdalus scoparia*) تراوش می‌شود. این صمغ که به نام‌های صمغ فارسی و شیرازی نیز معروف است جهت کپسوله سازی، امولسیون کنندگی، بهبود و پایداری بافت در صنایع غذایی کاربرد دارد

تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive ROS: oxygen species) امری اجتناب ناپذیر از متابولیسم هوایی است. این ترکیبات توسط میتوکندری، کلروپلاست، پراکسی‌زوم و آنزیم-های NAD (P) H oxidase تولید می‌شوند. در این میان آنزیم‌های خانواده NOX، واقع در غشای سلولی، به دلیل این که بزرگ‌ترین تولیدکنندگان گونه‌های فعال اکسیژن هستند، نقش اساسی را در پاسخ‌های ایمنی گیاه بازی می‌کنند. آن‌ها آنیون سوپراکسید را با انتقال الکترون از NAD (P) H به اکسیژن مولکولی تولید می‌نمایند (Sagi and Fluhr, 2006). گونه‌های فعال در سطح فیزیولوژیکی به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان در بسیاری از فعالیت‌های سلولی عمل می‌کنند اما در غلظت‌های بالا، صدمات جبران ناپذیری را به ماکرومولکول‌های زیستی وارد کرده و تنش اکسیدی و مرگ سلول را موجب می‌شوند (Nawkar et al., 2013). گیاهان حاوی مجموعه‌ای از سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیدازها) و غیرآنزیمی (اسید آسکوربیک، فنول، فلاونوئید و...) هستند (Zagorchev et al., 2013). بنابراین جهت کنترل گونه‌های فعال در حد فیزیولوژیک و مقابله با تنش‌های اکسیدی، تقویت قدرت آنتی‌اکسیدانی سلول از یک سو و کنترل آنزیم‌های تولید کننده گونه‌های فعال اکسیژن از سوی دیگر امری ضروری به نظر می‌رسد. در

سانتی‌گراد، حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. بخش‌های هوایی آویشن شیرازی را از اطراف شهرستان ارسنجان (استان فارس) تهیه، اسانس گیری از برگ‌ها به روش تقطیر آبی با دستگاه کلونجر (Clevenger, Herbal Exir Co., Mashhad, Iran) به مدت ۳ ساعت صورت گرفت. اسانس‌ها با سولفات سدیم بدون آب خشک و در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد در شیشه‌های تیره رنگ که با فویل آلومینیومی پوشیده شده بود، نگهداری شدند. به نانوامولسیون صمغ زدو یک میلی‌لیتر اسانس آویشن، ۱۰۰ میلی‌گرم پلی‌زوربات ۲۰ اضافه و در پایان در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. نانوامولسیون حاصله تحت نام Zedo-ZMO در دمای ۴ درجه نگهداری شد (Asbahani et al., 2015). در این آزمایش هر میلی‌لیتر اسانس معادل یک گرم در نظر گرفته شد. هرچند که اعتقاد بر این است که معیار نمی‌باشد. از آن‌جا که برای تهیه نانوامولسیون صمغ زدو-اسانس آویشن، یک میلی‌لیتر معادل یک گرم اسانس استفاده شد، بنابراین غلظت نهایی نانوامولسیون (استوک) معادل یک درصد یا ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. بنابراین استوک را با آب مقطر رقیق کرده تا غلظت‌های مختلف ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حاصل شوند.

(Persin et al., 2011). در این پژوهش از یک سو محتوای فنول و توانایی مهار رادیکال‌های آزاد ۲،۲-آزینوبیس-(۳-تیل‌بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید (2,2-azinobis-3-ABTS: ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) و پراکسید هیدروژن نانوامولسیون صمغ زدو-اسانس آویشن شیرازی (Zedo-ZMO) در خارج از سلول و از سوی دیگر تاثیر این نانوامولسیون را در غلظت‌های مختلف بر بیان ژن NAD (P) H oxidase (بزرگ‌ترین تولیدکننده گونه‌های فعال اکسیژن) بررسی قرار داده شد.

مواد و روش‌ها

صمغ زدو از درخت بادام کوهی در اطراف شهرستان‌های مرودشت و ارسنجان (استان فارس) جمع‌آوری شد. نمونه‌های حاصل با کمک آسیاب (ناسیونال) پودر شده و از الک ۰/۱ سانتی‌متر عبور داده تا پودر ریز و یکنواختی به دست آید. جهت آماده‌سازی نانوامولسیون صمغ زدو، یک گرم از پودر را در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حل کرده بعد از سونیکه شدن با امواج مافوق صوت (۱۴۰ وات) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، به نانوامولسیون تولیدی ۱۰۰ میلی‌گرم سورفاکتانت پلی‌زوربات ۲۰ (Polysorbate 20, Sigma) اضافه و در پایان در دمای ۴۰ درجه

درصد مهار در برابر غلظت‌های مختلف آنتی اکسیدان محاسبه شد (Re et al., 1999). جهت تعیین فعالیت مهار کنندگی رادیکال پراکسید هیدروژن توسط نانوامولسیون، ۲۰ میکرولیتر نانوامولسیون را با یک میلی‌لیتر از محلول پراکسید هیدروژن (۵۰ میلی‌مولار در ۱۰۰ میلی‌مولار بافر فسفات با pH=۷/۴) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه، سپس جذب نانوامولسیون و محلول پراکسید هیدروژن بدون آنتی‌اکسیدان در طول موج ۲۳۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر خوانده شد. درصد مهار به صورت زیر محاسبه شد:

$$= [(A_{230\text{blank}} - A_{230\text{test}}) / A_{230\text{blank}}] \times 100$$

$A_{230\text{blank}}$ = جذب محلول پراکسید هیدروژن بدون نانوامولسیون، $A_{230\text{test}}$ = جذب محلول حاوی نانوامولسیون و یا استاندارد گالیک اسید است. IC_{50} واکنش نیز محاسبه شد (Kavoosi et al., 2012). بذره‌های گندم رقم سیروان از مرکز تحقیقات کشاورزی استان فارس تهیه، پس از ضد عفونی در اتاقل کشت تحت شرایط ۸/۱۶ روشنایی/تاریکی، دمای روز/شب ۲۴/۲۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد به مدت ۱۴ روز کشت شدند. وقتی طول برگ‌ها به ۱۰ سانتی‌متر رسید، گیاهان به مدت سه روز با ۱۰۰ میلی‌لیتر از غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوامولسیون Zedo-ZMO تیمار و غلظت یک درصد از نانوامولسیون صمغ زدو نیز به عنوان شاهد استفاده شد. پس از گذشت ۲۴

میزان محتوای فنول در نانوامولسیون براساس روش رنگ سنجی فولین-سیوکالتو (Folin-ciocalteu) و استاندارد گالیک اسید انجام شد. ۲۰۰ میکرولیتر از نانوامولسیون یک درصد یا استاندارد گالیک اسید (۵۰۰-۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گالیک اسید در آب مقطر) به یک میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو (۱۰ درصد) افزوده، به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق شیک و سپس ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم (۱۰ درصد) به آن‌ها اضافه و جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر با اسپکتروفوتومتر (Spectrophotometer, UV/Vis 2150) خوانده شد (Marinova et al., 2005).

۲۰ میکرولیتر از نانوامولسیون یا استاندارد گالیک اسید به ۱ میلی‌لیتر از محلول رادیکال ABTS (۷ میلی‌مولار ABTS، ۲/۵۴ میلی‌مولار پرسولفات پتاسیم) به رنگ سبز-آبی افزوده و جذب نانوامولسیون در طول موج ۷۳۴ نانومتر با اسپکتروفوتومتر خوانده شد. درصد مهار ABTS با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$= [(A_{734\text{ABTS}} - A_{734\text{Test}}) / A_{734\text{ABTS}}] \times 100$$

$A_{734\text{ABTS}}$ = جذب محلول ABTS در ۷۳۴ نانومتر، $A_{734\text{Test}}$ = جذب محلول ABTS در حضور نانوامولسیون و یا استاندارد گالیک اسید است. غلظتی از نانوامولسیون که ۵۰٪ رادیکال‌های ABTS را مهار می‌کند ($IC_{50}: 50\%$) (Inhibitory concentration) بر اساس نمودار

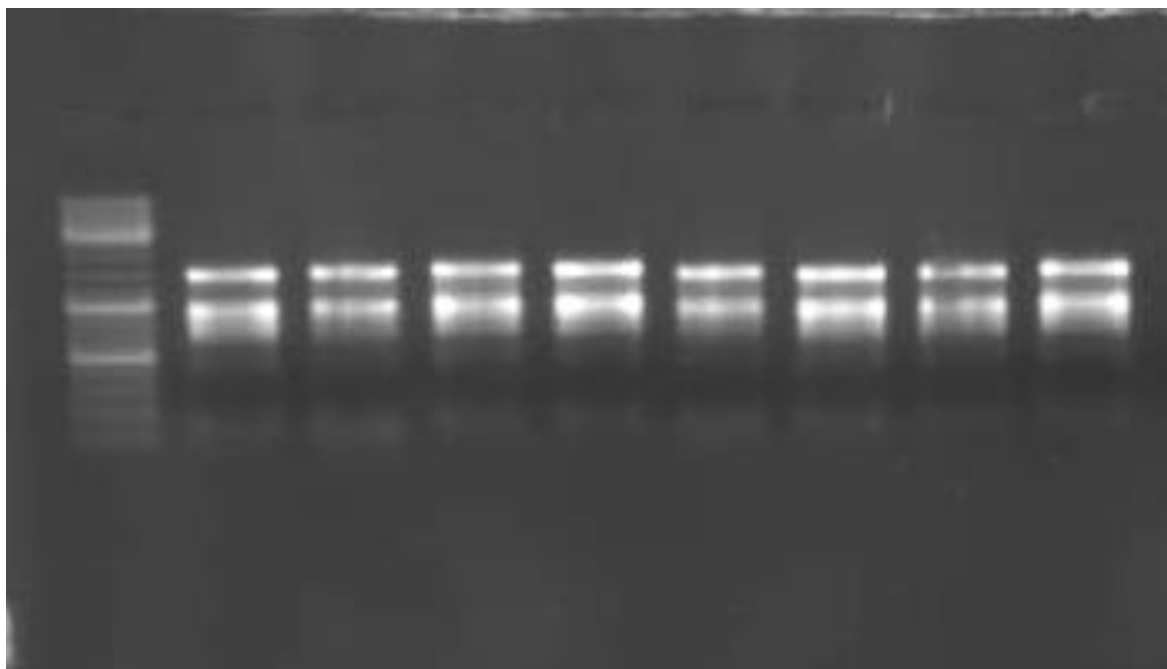
درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) انجام شد. جهت اطمینان از صحت تکثیر محصولات PCR چرخه‌های منحنی ذوب در دمای ۹۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد با اختلاف ۰/۵ درجه سانتی‌گراد در هر چرخه اجرا شد. محصولات تکثیر Real time PCR روی ژل آگارز بارگذاری شد تا وجود باند صحیح تایید شود (شکل ۲). به منظور استاندارد نمودن داده‌ها از ژن کنترل داخلی 18S rRNA استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده در (جدول ۱) توسط نرم افزار AlleleID7 برای ژن هدف NOX و ژن کنترل داخلی 18S rRNA به ترتیب با شماره دسترسی (AY561153، Aj272181) در گندم طراحی شدند (Teoh *et al.*, 2013) و سپس نرخ بیان نسبی ژن NOX در حالت تیمار با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوامولسیون صمغ زدو-اسانس آویشن نسبت به حالت کنترل (غلظت یک درصد از نانوامولسیون صمغ زدو) با استفاده از فرمول $2^{-[\Delta CT_{\text{sample}} - \Delta CT_{\text{control}}]}$ محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001). آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام و میانگین‌ها با استفاده از روش (LSD) در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

سنجش محتوای فنول کل نانوامولسیون نشان می‌دهد که صمغ زدو هیچ ترکیب فنولی

ساعت، برگ‌های گندم جهت استخراج RNA و بررسی بیان ژن NOX برداشت و در نیتروژن مایع در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با استفاده از کیت شرکت دنا زیست، RNA از بافت برگگی استخراج شد. کمیت RNA با استفاده از نانودراپ ND1000 (DE, USA Thermo Fisher Scientec, Wilmington) در طول موج ۲۶۰ نانومتر و کیفیت آن روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد (شکل ۱). جهت حذف DNA ژنومی از آنزیم DAase1 (Thermo Fisher) استفاده و سنتز cDNA (Thermo Fisher) بر اساس دستورالعمل انجام گرفت. بررسی بیان ژن NOX با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Line-SYBR Premix Ex Taq (gene K و کیت TM II (Taraka, Japan) انجام شد. ترکیب واکنش Real time PCR شامل ۵ میکرولیتر cDNA ۵ بار رقیق شده، ۱۰ میکرولیتر 1× QuantiFast SYBER Green PCR Master mix (حاوی SYBER Green، Taq DNA پلیمراز و بافر PCR)، آغازگرهای رفت و برگشت هرکدام ۰/۶ میکرولیتر و آب عاری از نوکلئاز ۳/۸ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر فراهم گردید. واکنش PCR مطابق دستورالعمل کیت شامل مرحله واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۱۵ دقیقه)، به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل واسرشت سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۱۰ ثانیه)، اتصال در ۵۸ درجه سانتی‌گراد (۱۰ ثانیه)، توسعه در ۷۲

نداشته اما اسانس آویشن شیرازی دارای ± 2
۸۸ میلی گرم در گرم مواد پلی فنولی بود.



شکل ۱- بررسی کیفیت RNA روی ژل آگارز ۱٪.

Figure 1- Evaluation of RNA quality on agarose gel 1%.



شکل ۲- بررسی محصول Real time Pcr روی ژل آگارز ۱٪.

Figure 2- Evaluation of Real time Pcr production on agarose gel 1%.

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در واکنش Real time PCR.

Table 1- Primers in Real time PCR reaction.

توالی پرایمر Sequence of Primers	رفت و برگشت Forward/Reverse	شماره دسترسی Accession number	نام ژن Gene name
ACAGATTTGAATTGCATTGGCGA	رفت	AY561153	NOX
GCAGATTTCCCAACATTTGCTGA	برگشت	AY561153	NOX
CGCTCCTACCGATTGAATGG	رفت	Aj272181	18S
CCTTGTTACGACTTCTGCTTCC	برگشت	Aj272181	rRNA

مونوترپن‌های فنولی، تیمول، کارواکرول، فلاونوئیدها، ترکیبات آلکالوئیدی و مهار رادیکال ABTS را نشان می‌دهند (Huang *et al.*, 2010; Karimian *et al.*, 2012).

صمغ زرد هیچ گونه فعالیت آنتی‌اکسیدانی نداشته و توانایی مهار رادیکال پراکسید هیدروژن توسط نانوامولسیون با $IC_{50} = 70$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، امری وابسته به غلظت است (جدول ۳). توانایی مهار پراکسید هیدروژن، توسط ترکیبات مونوترپن فنولی، توسط سایر پژوهش‌ها مورد تایید قرار گرفته است (Katalinic *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2011).

میزان فنول در این نانوامولسیون به دلیل مونوترپن‌های حلقوی نظیر تیمول و کارواکرول است (Lee *et al.*, 2005).

صمغ زرد هیچ گونه فعالیت آنتی‌اکسیدانی نداشته است و توانایی مهار رادیکال ABTS توسط نانوامولسیون با $IC_{50} = 32$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، امری وابسته به غلظت است. اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌ها به کاتیون ABTS موجب کاهش آن به ABTS غیررادیکالی در نتیجه کاهش جذب در 734 نانومتر می‌شود (جدول ۲). کاهش جذب در 734 نانومتر به طور مستقیم مربوط به حضور ترکیبات فنولی در گیاهان دارویی است (Huang *et al.*, 2010). مطالعات فراوانی همبستگی مثبتی میان

جدول ۲- غلظت موثر نانوامولسیون صمغ زدو، صمغ زدو- اسانس آویشن شیرازی در مهار رادیکال- های ABTS.

Table 2- Effective concentration of zedo gum, zedo gum – Zataria multiflora essential (ZMEO) nanoemulsion for inhibition of ABTS radicals.

پارامترهای آنتی اکسیدان Antioxidan parameters	صمغ زدو Zedo gum	صمغ زدو-اسانس آویشن شیرازی Zedo-ZMEO
IC ₅₀ (μg/mL)	-	32 ± 1.5
شاخص آنتی اکسیدانی Antioxidant index	-	31 ± 2.5
معادل گالیک اسید Galic acid equivalent (μg/μg)	-	0.093 ± 0.007

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار با حداقل سه تکرار مستقل بیان شده اند. (IC₅₀)، غلظتی از نانوامولسیون است که ۵۰٪ رادیکال‌های ABTS را مهار می‌کند. شاخص آنتی اکسیدان با تقسیم ۱۰۰۰ به IC₅₀ محاسبه می‌شود. اکی‌والان (معادل) گالیک اسید از طریق تقسیم IC₅₀ مهار رادیکال ABTS مربوط به گالیک اسید بر IC₅₀ مهار رادیکال ABTS مربوط به آنتی اکسیدان‌های آزمایش شده محاسبه می‌شود.

Data represent mean ± standard deviation from at least three sets of independent repeats. (IC₅₀), The concentrations of nanoemulsion that were inhibited 50% ABTS radicals. Antioxidant index was calculated by dividing 1000 to IC₅₀. Galic acids equivalents were calculated by dividing IC₅₀ of galic acid for ABTS'inhibition to IC₅₀ of tested antioxidant for inhibition of ABTS' radical.

آویشن بر بیان ژن NOX در سطح پنج درصد معنی دار بود. بیان ژن NOX در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر روندی افزایشی داشته و در غلظت ۵۰ به حداکثر خود رسیده است. از غلظت ۱۰۰ بیان کاهش یافته تا جایی که در غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ بیان ژن به کمتر از حالت قبل از تیمار رسید.

پراکسید هیدروژن با وجود این که، رادیکال آزاد نیست، توسط واکنش‌های فنتون و هابر-وایز به رادیکال هیدروکسیل (از خطرناک‌ترین رادیکال‌های آزاد) تبدیل می‌شود (Fenton, 1894; Haber and Weiss, 1934). بنابراین مهار پراکسید هیدروژن جهت کنترل تنش اکسیدی امری لازم به نظر می‌رسد. با توجه به (شکل ۳)، اثر غلظت‌های گوناگون نانوامولسیون صمغ زدو- اسانس

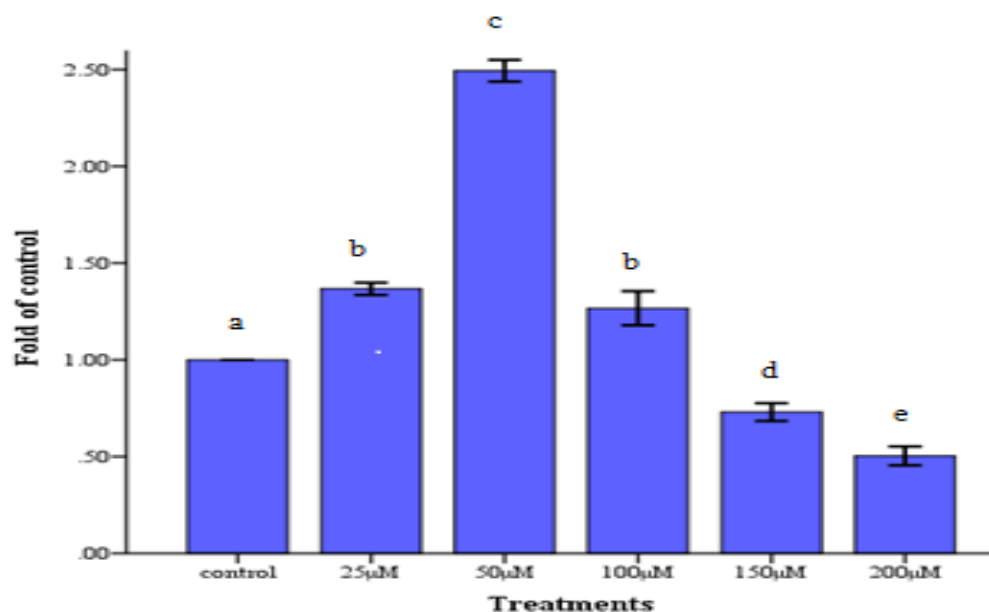
جدول ۳- غلظت موثر نانوامولسیون صمغ زدو، صمغ زدو-اسانس آویشن شیرازی در مهار رادیکال-های پراکسید هیدروژن.

Table 3- Effective concentration of zedo gum, zedo - *Zataria multiflora* essential oil (ZMEO) nanoemulsion for inhibition of hydrogen peroxide radicals.

پارامترهای آنتی اکسیدان	صمغ زدو	صمغ زدو-اسانس آویشن شیرازی
Antioxidan parameters	Zedo	Zedo-ZMEO
IC ₅₀ (μg/mL)	-	70 ± 5
شاخص آنتی اکسیدانی	-	14.5 ± 2.7
Antioxidant index		
معادل گالیک اسید	-	0.114 ± 0.009
Galic acid equivalent (μg/μg)		

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار با حداقل سه تکرار مستقل بیان شده اند. (IC₅₀), غلظتی از نانوامولسیون است که ۵۰٪ رادیکال‌های پراکسید هیدروژن را مهار می‌کند. شاخص آنتی اکسیدان با تقسیم ۱۰۰۰ به IC₅₀ محاسبه می‌شود. اکی‌والان (معادل) گالیک اسید از طریق تقسیم IC₅₀ مهار رادیکال پراکسید هیدروژن مربوط به گالیک اسید بر IC₅₀ مهار رادیکال پراکسید هیدروژن مربوط به آنتی اکسیدان آزمایش شده محاسبه می‌شود.

Data represent mean ± standard deviation from at least three sets of independent repeats. (IC₅₀), The concentrations of nanoemulsion that were inhibited 50% hydrogen peroxide radicals. Antioxidant index was calculated by dividing 1000 to IC₅₀. Galic acids equivalents were calculated by dividing IC₅₀ of galic acid for hydrogen peroxide inhibition to IC₅₀ of tested antioxidant for inhibition of hydrogen peroxide.



شکل ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف (۰، ۲۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) نانوامولسیون صمغ زدو-اسانس آویشن شیرازی بر بیان ژن NOX.

Figure 3- Effect of different concentrations (0, 25, 100, 150 and 200 μg/ml) of zedo - ZMO nanoemulsion on expression of NOX gene.

با توجه به نتایج، تاثیر نانوامولسیون صمغ زدو- اسانس آویشن بر بیان ژن NOX امری وابسته به غلظت است. جهت تعیین چگونگی تاثیر نانوامولسیون صمغ زدو- اسانس آویشن بر ژنهای خانواده NOX در ابتدا باید به چگونگی تنظیم ژنهای این خانواده توجه کرد. بر هم کنش میان ژنهای NOX و مولکولهای پیام رسان، جهت فعال سازی این ژنها به دو روش وابسته به فسفریلاسیون و مستقل از فسفریلاسیون که هر دو با همکاری یکدیگر در تنظیم فعالیت ژن NOX در گیاه موثر هستند صورت می پذیرد (Mersmann et al., 2010). افزایش بیان ژن NOX در غلظت های کم نانوامولسیون صمغ زدو-اسانس آویشن شیرازی را می توان به تیمول (از مهم ترین اجزای تشکیل دهنده اسانس) نسبت داد. تیمول در غلظت های اندک با تاثیر بر افزایش نفوذ پذیری غشای سلولی به یون کلسیم، آزاد سازی کلسیم از فسفولیپاز C و کانال های کلسیم موجب افزایش محتوای کلسیم درون سلولی می شود. کلسیم با فعال سازی پروتئین های کیناز وابسته به کلسیم (calcium-dependent protein) CDPKs و (kinases) CBL و (Calcineurin B-like) و کالمودولین CaM (calmodulin) ژن NOX را به صورت مستقیم فسفریله و فعال می کند و یا با اتصال مستقیم به صورت مستقل از فسفریلاسیون به EF-Hand در انتهای آمین ژن NOX، در افزایش بیان ژن دخیل است

(Mersmann et al., 2010). کاهش بیان ژن در غلظت های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ را می توان به چند دلیل دانست. از طرفی مواد فعال گیاهی مانند تیمول و کارواکرول دارای نقشی دو گانه هستند، به این صورت که این ترکیبات در غلظت های پایین اثرات مفید دارویی و در غلظت های بالاتر اثرات سمی از خود نشان می دهند. آن ها با تخریب غشای سلولی از فعالیت آنزیم NOX جلوگیری می کنند. ترکیبات فنولی گیاهان دارویی در غلظت های بالا اکسید شده و تولید رادیکال های فنوکسیل می کنند. این رادیکال ها مانند سایر گونه های فعال اکسیژن و نیتروژن دارای اثرات سمی هستند (Mersmann et al., 2010). از طرف دیگر پروموتور ژن NOX دارای عناصر پاسخ دهنده به بسیاری از هورمون ها از جمله اتیلن، آبسزیک اسید و سالیسیلیک اسید است. این کاهش بیان می تواند به دلیل تاثیر پراکسید هیدروژن تولیدی و تجمع یافته، بر روی هورمون های گیاهی از جمله آبسزیک اسید، به منظور کاهش بیان آنزیم جلوگیری از تنش اکسیدی و پیامدهای آن صورت پذیرد (Belkadhi et al., 2015).

از آن جا که گونه های فعال اکسیژن به ویژه پراکسید هیدروژن (به دلیل اندازه کوچک و قدرت انتشار بالا) در سلول مانند شمشیری دو لبه در غلظت های پایین مانند مولکول های پیام رسان در فرایندهای رشدی، ایمنی و در غلظت های بالا در آسیب به ماکرو مولکول های

جهت مهار تنش اکسیدی بهره جوییم. با این حال، تعیین غلظت مناسب و موثر نانوامولسیون صمغ زدو-اسانس آویشن جهت کنترل تنش-های اکسیدی، نیازمند بررسی تاثیر این نانوامولسیون بر آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیدازها (آسکوربات پراکسیداز، گلوکاتایون پراکسیداز و...) که در تولید و مهار گونه‌های فعال اکسیژن دخیل هستند می‌باشد.

سلولی موثر هستند، کنترل آنها امری ضروری به نظر می‌رسد. نتایج نشان می‌دهند که نانوامولسیون‌های صمغ زدو-اسانس آویشن شیرازی با ترکیبات مونوترپن حلقوی (تیمول و کارواکرول)، دارای خواص بالقوه جهت مهار رادیکال‌های آزاد (ABTS، پراکسید هیدروژن) هستند، همچنین توانایی تغییر بیان ژن NOX را در غلظت‌های متفاوت دارند. در نتیجه ما می‌توانیم از آن به عنوان آنتی‌اکسیدانی طبیعی

منابع

- Belkadh A, De Haro A, Obregon S, Chaibi W, Djebali W (2015). Positive effects of salicylic acid pretreatment on the composition of flax plastidial membrane lipids under cadmium stress. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 1457-1467 .
- Berger RG (2007). *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Springer Science & Business Media, Berlin, Germany.
- El Asbahani A, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi EA, Casabianca H, El Mousadik A, Hartmann D, Jilale A, Renaud FN, Elaissari A (2015). Essential oils: from extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* 483: 220-243.
- Fenton HJH (1894). LXXIII. -Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions* 65: 899-910 .
- Haber F, Weiss J (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. Lond. A* 147: 332-351.
- Huang CC, Wang HF, Chen CH, Chen YJ, Yih KH (2010). A study of four antioxidant activities and major chemical component analyses of twenty-five commonly used essential oils. *Journal of Cosmetic Science* 62: 393-404 .
- Huang S, Tsai Y, Chen C (2011). Effects of wheat fiber, oat fiber, and inulin on sensory and physico-chemical properties of chinese-style sausages. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 24: 875-880.
- Karimian P, Kavooosi G, Saharkhiz MJ (2012). Antioxidant, nitric oxide scavenging and malondialdehyde scavenging activities of essential oils from different chemotypes of *Zataria multiflora*. *Natural product research* 26: 2144-2147.

- Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94: 550-557 .
- Kavoosi G, Rabiei F (2015). *Zataria multiflora*, chemical and biological diversity in the essential oil. *Journal of Essential Oil Research* 27: 428-436 .
- Kavoosi G, Teixeira da Silva JA, Saharkhiz MJ (2012). Inhibitory effects of *Zataria multiflora* essential oil and its main components on nitric oxide and hydrogen peroxide production in lipopolysaccharide stimulated macrophages. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 64: 1491-1500 .
- Lee SJ, Umamo K, Shibamoto T, Lee KG (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 91: 131 –137.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 40: 255-260 .
- Mersmann S, Bourdais G, Rietz S, Robatzek S (2010). Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiology* 154: 391-400.
- Nawkar GM, Maibam P, Park JH, Sahi VP, Lee SY, Kang CH (2013). UV-induced cell death in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 1608-1628 .
- Persin Z, Stana-Kleinschek K, Foster TJ, Van Dam JE, Boeriu CG, Navard P (2011). Challenges and opportunities in polysaccharides research and technology: The EPNOE views for the next decade in the areas of materials, food and health care. *Carbohydrate Polymers* 84: 22-32 .
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231-1237 .
- Sagi M, Fluhr R (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology* 141: 336-340.
- Teoh KT, Requesens DV, Devaiah SP, Johnson D, Huang X, Howard JA, Hood EE (2013). Transcriptome analysis of embryo maturation in maize. *BMC Plant Biology* 13: 19-24.
- Zagorchev L, Seal CE, Kranner I, Odjakova M (2013). A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 7405-7432.

Effect of zedo gum - *Zataria multiflora* essential oil nanoemulsion in the inhibition of free radical intercellular and expression of the NAD(P)H oxidase gene in wheatSohrabi F.^{1*}, Kavooosi Gh.R.²¹M.Sc. Student, Institute of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.²Associate Professor, Institute of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.**Abstract**

The production of reactive oxygen species, such as hydrogen peroxide is inevitable in aerobic metabolism. Since, these compounds are effective at different concentration in a variety of processes in the cell and their excessive production lead to oxidative stresses, Therefore, their concentration must be controlled. In this study, *Zataria multiflora* essential oil with abundant phenolic compounds (thymol, carvacrol), and zedo gum polymers were used to encapsulate nanoemulsion production. The effect of zedo gum - *Zataria multiflora* essential oil nanoemulsion were investigated in the inhibition of ABTS (2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid), hydrogen peroxide free radicals intercellular and expression of the (NOX:NAD(P)H oxidase) gene with accession number AY561153 (the largest producer of reactive oxygen species). Nanoemulsion with 88 mg/gr phenol content showed a high ability to inhibit the free radical ABTS and hydrogen peroxide. On the other hand, at concentration of 25 and 50 µg/ml increased the expression of NOX and at concentration of 100, 150 and 200 µg/ml decreased it. Our results showed that, different concentration of nanoemulsion have different effect on reactive oxygen species and, therefore, they have the ability to control oxidative stresses.

Keywords: *Reactive oxygen species, Zataria multiflora, zedo gum, NAD(P)H oxidase gene.*

* Corresponding Author: Sohrabi F

Tel: 09179190185

Email: Fatemehsohrabi1819@gmail.com

