Archive of SID

Arak Medical University Journal (AMUJ)
2016; 19(114): 78-87

Original Article

Investigation of Protective Effect of Hydroalcoholic Extract of Ginger on Cytotoxity of Silver Nanoparticles on Hepatic Enzymes، Hemathologic Factors, Blood Oxidative Stress Markers and Hepatic Apaptosis in Balb-c Mice

Seyed Mehdi Shariatzadeh[1], Nasrin Kazemipour[2*], Saeed Nazifi[3]

1.PhD Student of Biochemistry,Department of Basic Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Associate Professor, Department of Basic Sciences, Shiraz university, Shiraz, Iran
3.Professor, Department of Clinical Pathology, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Received: 13 Aug 2016, Accepted: 3 Sep 2016

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:44 +0430 on Tuesday May 30th 2017

Abstract

Background: Silver nanoparticles are capable of inducing toxicity in living organisms. Silver nanoparticles can induce some effect in the liver. Thus silver nanoparticles, due to their wide spread effects, can also affect on hepatic, hematological, and oxidative stress factors. Ginger because of its powerful antioxidantal compounds can influence the toxicity effects of silver nanoparticles in different parts of the body. The aim of this study was to investigate the protective effect of hydroalchoholic extract of ginger on cytotoxic silver nanoparticles on enzymes, hematological parameters, blood oxidative stress markers, and hepatic apoptosis in Balb-c mice.

Materials and Methods: In this study, 48 rats of Balb-c race Syrians were selected and devided into 4 groups, each consisting of 12. They were treated for a period of 35 days; the first group (control) received distilled water, the second group received nano silver, the third group received ginger extract, and the fourth group received both nanosilver and ginger extract at the same time. Bleeding was done to measure hematological factors, liver enzymes, and oxidative stress; then liver tissue was removed for evaluation of apoptosis. Data were compared using SPSS software and one-way ANOVA.

Results: Enzymes AST , ALT , ALP, GGT and LDH as liver factors showed significant differences in the groups of the study. Hematological factors including of WBC , RBC , Hb , HCT , MCV , MCH , Plt , Lymphocyte and Monocyte showed significant differences in all the groups.
Of oxidative stress factors , only GPX showed significant difference between groups, while no significant difference was observed in other oxidative stress parameters in the blood. Changes in apoptosis showed significant differences in all groups of the study.

Conclusion Based on the findings the study, silver nanoparticles with their side effects in different parts of the body can induce changes in various factors and enzymes. Ginger can compensate ,and modify to some extent these side effects. Such effectiveness of ginger can probably be due to its special ingredients.

Keywords: Apoptosis, Ginger extract, Hematological factors, Hepatic enzymes, Oxidative stress, Silver nanoparticles.

*Corresponding Author:
Address: Department of Basic Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran
Email: kazemipour@science.usb.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۹ (شماره پیاپی ۱۱۴)، آذر ۱۳۹۵، ۸۷-۷۸

بررسی اثر حفاظتی عصاره‌ی هیدروالکلی زنجبیل بر سیتوتوکسیتی نانو ذرات نقره بر روی فعالیت آنزیم‌های کبدی، فاکتورهای هماتولوژی، شاخص‌های استرس اکسیداتیو خون و میزان آپوپتوزیس در بافت کبد در موش بالب سی

سید مهدی شریعت زاده [۱]، نسرین کاظمی پور [۲*]، سعید نظیفی [۳]

۱.دانشجوی دکترای بیوشیمی، گروه علوم پایه، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۲. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۳.استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۶/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: نانو ذرات نقره می‌توانند موجب سمیت در موجودات زنده شوند و در کبد به عنوان مرکز سم زدایی بدن اثراتی را القا نمایند. از این رو با توجه به اثرات گسترده‌ای که دارند می‌توانند بر روی فاکتورهای کبدی، هماتولوژی و استرس اکسیداتیو موثر باشند. زنجبیل با توجه به ترکیبات آنتی اکسیدانی که دارد اثرات سمیت نانو نقره را در مناطق مختلف بدن تحت تاثیر قرار می‌دهد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر حفاظتی عصاره‌ی هیدروالکلی زنجبیل بر سیتوتوکسیتی نانو ذرات نقره بر روی فعالیت آنزیم‌ها، فاکتورهای هماتولوژی، شاخص‌های استرس اکسیداتیو خون و آپوپتوز کبد در موش بالب سی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۴ گروه ۱۲ تایی موش بالب سی نژاد سوری به مدت ۳۵ روز تحت تیمار قرارگرفتند. گروه اول(کنترل) آب مقطر، گروه دوم نانونقره، گروه سوم عصاره زنجبیل و گروه چهارم نانونقره و زنجبیل را به صورت همزمان دریافت کردند. برای اندازه‌گیری فاکتورهای هماتولوژی، آنزیم‌های کبدی و استرس اکسیداتیو، خون‌گیری از قلب انجام گرفت و بافت کبد جهت بررسی میزان آپاپتوزیس خارج شد. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و به کمک تحلیل واریانس یک طرفه با هم مقایسه شدند.

یافته‌ها: آنزیم‌های AST، ALT، ALP، GGT و LDH به عنوان فاکتورهای کبدی در گروه‌های مورد مطالعه دارای اختلاف معنی‌داری بودند. فاکتورهای هماتولوژی شامل شاخص‌های WBC، RBC، Hb، HCT، MCV، MCH، Plt، لنفوسیت و مونوسیت دارای اختلاف میانگین معنی‌داری در گروه‌های مختلف آزمایش بودند. از میان فاکتورهای استرس اکسیداتیو تنها شاخص GPX درخون دارای اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه بود و بقیه پارامترهای استرس اکسیداتیو در خون اختلاف معنی‌داری نداشتند. تغییرات میزان آپوپتوزیس درتمامی گروه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

نتیجه گیری: بر اساس مطالعه‌ی حاضر، نانو ذرات نقره با اثرات سوئی که بر مناطق مختلف بدن می‌گذارند می‌توانند تغییراتی را در فاکتورها و آنزیم‌های گوناگون اعمال نمایند. زنجبیل تا حدودی توانسته این اثرات را جبران و تعدیل نماید که این اثر بخشی زنجبیل را احتمالا می‌توان به مواد موثره موجود در آن نسبت داد.

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، عصاره‌ی زنجبیل، فاکتورهای هماتولوژی، آنزیم‌های کبدی، استرس اکسیداتیو، آپوپتوزیس

***نویسنده مسئول:** ایران، شیراز، دانشگاه شیراز، گروه علوم پایه

Email: kazemipour@shirazu.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:44 +0430 on Tuesday May 30th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:44 +0430 on Tuesday May 30th 2017

مقدمه

فلزات به عنوان آلاینده‌هایی مهم و سمی در بخش‌های مختلف زیستی در نظر گرفته می‌شوند. اندازه‌گیری ورودی فلزات ناشی از فعالیت‌های انسانی به محیط زیست، با توجه به ورودی‌های بزرگ فلزات به طبیعت که ناشی از فرسایش سنگ‌ها، گرد و غبارهای ناشی از وزش باد، فعالیت‌های آتشفشانی و آتش سوزی جنگل‌ها می‌باشد امری دشوار است. فناوری نانو، شناخت و کنترل مواد در ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است که سبب بروز خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی غیر معمول می‌شود و کاربردهای جدید و منحصر به فردی را ممکن می‌سازد(۱). بررسی‌های انجام گرفته حاکی از آن است که ۵۶ درصد از سهم نانو ذرات جهان به نانو ذرات نقره اختصاص یافته است(۲). از دیرباز تاکنون نقره به علت خواص ضد باکتریایی خود شهرت یافته است(۳). با این وجود نانو ذرات نقره در مقادیر کنترل نشده اثرات مخربی بر عملکرد میتوکندری دارند. از این رو مقادیر بالاتر از ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن موجود زنده سبب ایجاد رادیکال آزاد می‌شود و آسیب‌های سلولی را به همراه دارد(۴). سمیت ایجاد شده توسط این ذرات به ویژگی و مسیر ورودشان بستگی دارد و باعث القا استرس اکسیداتیو می‌شود که با تجمع در سیتوپلاسم و هسته سلول منجر به تولید رادیکال آزاد می‌گردد. اثرات سمی نانو ذرات بر روی انواع مختلفی از سلول‌ها در چندین مقاله مورد بررسی قرار گرفته است. متاسفانه هیچ توافق جامعی بر روی سمی بودن نانو ذرات نقره وجود ندارد. با این حال بسیاری از این مقالات نشان داده‌اند که بقاء سلول در معرض این نانو ذرات کاهش یافته است. هم‌چنین در این مطالعات آزمایشگاهی کاهش گلوتایتون، انحراف میتوکندری یا تخریب غشای سلولی را گزارش شده است(۵). سمیت چندین نمونه آزمایشگاهی از نانو ذرات نقره توسط حسین و همکاران بر روی کبد موش مورد آزمایش قرار گرفته است(۶). رادیکال‌های آزاد به علت وجود الکترون تک، دائماً در بدن در حال گردش هستند و آسیب‌های فراوانی به ماکرو مولکول‌هایی مانند DNA، پروتئین‌ها، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها وارد می‌سازند(۷). در بدن افراد سالم بین تولید رادیکال‌های آزاد و دفاع آنتی اکسیدانی در برابر آن‌ها، تعادل وجود دارد. تولید کنترل نشده رادیکال‌های آزاد موجب بر هم خوردن این تعادل و در نتیجه تخریب ماکرو مولکول‌های زیستی خواهد شد که بروز بیماری‌های مختلف را در پی دارد(۸). آنتی اکسیدان‌ها با گرفتن الکترون‌های آزاد، اکسید شده و اثر رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند لذا بدن دائما به منابع آنتی اکسیدانی جدید نیاز دارد. مطالعات متعدد گزارش نموده‌اند که آنتی اکسیدان‌ها و ویتامین‌های A، B، C و E در رژیم غذایی می‌توانند سبب حفاظت از DNA اسپرم در مقابل رادیکال‌های آزاد و افزایش ثبات سد خونی- بیضه‌ای شوند(۹). امروزه بیش‌ترین توجه روی آنتی اکسیدان‌های گیاهی و طبیعی است. این آنتی اکسیدان‌ها ترکیباتی پلی فنلی هستند که در تمام قسمت‌های گیاهان مثل پوست، ساقه، برگ، میوه، ریشه، گل، غلاف و دانه یافت می‌شوند. فلاونوئیدها عبارتند از بزرگ‌ترین گروه از ترکیبات پلی فنولیک(۱۰) که به طور طبیعی در بافت‌های گیاهی یافت می‌شوند. این ترکیبات به رنگ مایل به قرمز وجود دارند و احتمالاً اثرات سودمند خوردن میوه و سبزیجات تازه به علت وجود آنتی اکسیدان‌های فلاونوئیدی در آنها است. فلاونوئیدها به ۱۳ زیرگروه تقسیم‌بندی می‌شوند که می‌توان به فلاوون‌ها، فلاوونول‌ها، فلاواوون‌ها، آنتوسیانیدین‌ها و کاتچین‌ها اشاره کرد. ترکیبات موجود در زنجبیل وابسته به شرایط کاشت گیاه و محل جمع آوری متفاوت است(۱۱). ترکیبات فعال ریشه و برگ‌های زنجبیل نظیر زینجرون، جینجردیول، زینجیبرین، جینجرول‌ها، شوگااول(۱۱)، تانن‌ها و فلاونوئیدها دارای خواص آنتی اکسیدانی می‌باشند(۱۲). زنجبیل می‌تواند به طور موثری با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن مقابله کند و این کار را با افزایش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز(SOD) انجام می‌دهد. عصاره زنجبیل می‌تواند از تخلیه آنتی اکسیدان‌ها و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کلیه جلوگیری کند و این اثرات حفاظتی توسط پلی فنل‌ها و فلاونوئیدهای موجود در آن اعمال می‌شود(۱۳). هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات عصاره زنجبیل پس از القای

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:44 +0430 on Tuesday May 30th 2017

سمیت با نانو ذرات نقره و بررسی تغییرات ایجاد شده در کبد، آنزیم‌ها ، فاکتورهای هماتولوژی و استرس اکسیداتیو می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی: این پژوهش یک مطالعه تجربی است که بر روی موش‌های بالب سی نژاد سوری با میانگین وزنی g ۵ ± ۳۵ انجام گرفت. حیوانات مورد مطالعه حداقل به مدت یک هفته در اتاق حیوانات در دمای $25^{\circ}C$ در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شده تا به شرایط محیط عادت نمایند. طی این مدت حیوانات از غذای معمولی و آب کافی بهره مند شدند. تعداد ۴۸ موش انتخاب و به ۴ گروه ۱۲ تایی طبق گروه بندی زیر تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل: موش‌های این گروه هم‌زمان با گروه‌های دیگر ۳۵ روز آب مقطر دریافت نمودند.

۲- گروه یک: موش‌های این گروه به مدت ۳۵ روز عصاره زنجبیل با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به صورت IP دریافت نمودند.

۳- گروه دو: موش‌های این گروه به مدت ۳۵ روز نانو ذرات نقره با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به صورت IP دریافت نمودند.

۴- گروه سه: موش‌های این گروه به مدت ۳۵ روز به طور هم‌زمان زنجبیل و نانو ذرات نقره را با دوزهای ذکر شده در دو گروه ۲ و ۳ دریافت نمودند.

پس از گذشت ۳۵ روز، خون‌گیری از قلب موش انجام شد و پس از سانتریفوژ سرم خون جدا و فاکتورهای هماتولوژی، استرس اکسیداتیو و آنزیم‌های کبدی مورد سنجش قرار گرفت. هم‌چنین، بافت کبد جهت بررسی میزان آپوپتوزیس از بدن موش‌ها خارج گردید.

تهیه عصاره زنجبیل: مقدار ۲ کیلوگرم زنجبیل تازه به قطعات کوچک تبدیل و بلافاصله در الکل ۹۶ درصد قرار داده شدند. زنجبیل موجود در اتانول ۹۶ به مدت ۲۴ ساعت روی همزن قرار گرفت تا عصاره‌ی آن خارج شود. در مرحله بعد با عمل صاف کردن تکه‌های زنجبیل و ناخالصی‌ها جدا شد و عصاره‌ی حاصل که مایع زرد رنگ و شفافی بود جدا گردید. سپس اجازه داده شد تا الکل تبخیر شود ودر انتها ماده‌ی قیر مانند حاصل که عصاره‌ی خالص زنجبیل بود از ظرف جدا و برای توزین و تزریق در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. توزین توسط ترازوی حساس و بر اساس وزن هر موش صورت گرفت. هر موش روزانه غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره را به صورت محلول استریل به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت نمود.

تهیه نانو ذرات نقره: نانو ذرات نقره در این پژوهش از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان مشهد تهیه شد. قطر نانو ذرات نقره ۲۰ و اصالت آن‌ها با اشعه‌ی X و میکروسکوپ‌های الکترونی SEM و TEM توسط شرکت مذکور به اثبات رسید. جهت تهیه محلول برای تزریق داخل صفاقی، بر اساس وزن هر موش برای تهیه غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ابتدا نانو ذرات نقره توزین و سپس به آن آب مقطر استریل اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه ورتکس کردن، درون لوله فالکون عمل سونیکاسیون با دستگاه سونیکاتور مارک HIELSCHER ساخت آلمان به مدت ۱۵ دقیقه انجام گردید و تزریق داخل صفاقی با سرنگ انسولین و بر اساس وزن بدن موش‌ها روزانه انجام شد. لازم به یادآوری است محلول عصاره‌ی زنجبیل و نانو ذرات نقره هر روز به صورت تازه و به اندازه‌ی نیاز تهیه شد.

اندازه‌گیری فاکتورهای هماتولوژی:

خون کامل استخراج شده از قلب درون میکروتیوب‌های حاوی EDTA ریخته شد. فاکتورهای هماتولوژی اندازه‌گیری شده در این پژوهش شامل موارد ذیل می‌باشد: شمارش گلبولرهای قرمز(RBC)، شمارش گلبولرهای سفید(WBC)، اندازه‌گیری میزان هموگلوبین(Hb)، اندازه‌گیری میزان هماتوکریت (HCT)، اندازه‌گیری حجم متوسط گلبول‌های قرمز(MCV)، اندازه‌گیری مقدار متوسط وزنی هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCH)، اندازه گیری مقدار وزنی هموگلوبین در حجم معینی از گلبول قرمز فشرده شده(MCHC)، شمارش پلاکت‌ها(Plt)، شمارش لنفوسیت‌ها و شمارش منوسیت‌ها. سنجش کلیه فاکتورهای هماتولوژی فوق توسط دستگاه

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:44 +0430 on Tuesday May 30th 2017

Sysmex مدل XS-800i صورت گرفت. خون کامل گرفته شده از قلب درون میکروتیوب ریخته شد و با دستگاه میکروسانتریفوژ مارک Lab net مدل 24D ساخت کشور آلمان به مدت ۱۰ دقیقه با دور RPM۱۲۰۰۰ جهت جداسازی سرم سانتریفوژ گردید. سرم از میکرو تیوب خارج و جهت اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی و فاکتورهای استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش آنزیم‌های کبدی: آنزیم‌های ALT،AST، ALP، GGT، LDH به عنوان شاخص‌های کبدی در سرم مورد سنجش قرار گرفتند. برای این منظور از اتوآنالایزر BT4500 ساخت کشور ایتالیا استفاده شد.

سنجش فاکتورهای استرس اکسیداتیو: به منظور اندازه‌گیری پارامترها و آنزیم‌های استرس اکسیداتیو از کیت‌های شرکت رندوکس (RANDOX) ساخت کشور انگلستان استفاده شد. فاکتورهای مالون دی آلدئید(MDA)، ظرفیت تام آنتی اکسیدانی(TAC)، سوپراکسیددسموتاز(SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز(GPX) در سرم خون سنجش شد.

اندازه‌گیری سطح سرمی مالون دی آلدئید(MDA): اساس روش اندازه گیری MDA سرمی بر پایه واکنش با تیوباربیتوریک اسید (TBA)، استخراج با بوتانل نرمال، اندازه‌گیری جذب با روش اسپکتروفتومتری و مقایسه جذب با منحنی استاندارد می‌باشد.

فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز: با استفاده از کیت ارزیابی این آنزیم و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن (راندوکس، انگلیس) اندازه گیری شد.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: با استفاده از کیت ارزیابی فعالیت این آنزیم‌ها و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن (راندوکس، انگلیس) اندازه‌گیری شد. روش کار بر اساس اندازه‌گیری جذب نوری فورمازون می‌باشد.

ظرفیت تام آنتی اکسیدان(TAC): ظرفیت تام آنتی اکسیدان با استفاده از دستورالعمل کیت معرف راندوکس (RANDOX)ساخت انگلستان اندازه‌گیری شد. اساس روش کیت احیای رادیکال کاتیون ABTS توسط ملکول‌های آنتی اکسیدانی می‌باشد.

آزمون تانل(TUNEL): این آزمون جهت بررسی میزان آپوپتوزیس(مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) انجام گردید. قبل از انجام رنگ‌آمیزی تانل بافت‌های کبد در دستگاه Tissue processor SLEE ساخت کشور آلمان به مدت ۱۲ساعت پروسس شدند. سپس درون دستگاه SLEE Hot plate جهت بلوک‌گیری در بسکت‌های مخصوص قرار داده شدند و پس از بلوک‌گیری به مدت یک ساعت بر روی Cold plate SLEE قرار گرفتند تا پارافین جهت انجام برش‌گیری آماده شود. برش بافت‌های کبد موجود در بلوک‌ها به کمک دستگاه میکروتوم دیجیتال مارک SLEE ساخت کشور آلمان با ضخامت ۵ میکرون انجام شد. برش‌ها ابتدا به Tissue float و سپس به روی سطح لام شیشه‌ای منتقل شدند و برای پرافین زدایی در داخل Hot plate قرار داده شدند. جهت انجام تکنیک تانل، کیت تانل (Roch In citu cell death detection kit, Fluorescein,) مورد استفاده قرار گرفت. اساس تشخیص در تست تانل، تشخیص شکستگی در DNA توسط آنزیم(Terminal TDT(deoxynucleotidyltransferase و مارکر dUTP است که در بخش‌های انتهایی نوکلئیک اسیدها، -´3 OH آزاد را نشان‌دار می‌کند. تانل توانایی تشخیص دو دسته سلول‌های اپوپتوتیک با DNA آسیب دیده(تانل مثبت) و سلول‌های غیر اپوپتوتیک با DNA سالم(تانل منفی) را دارد.

روش آنالیز آماری

نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS V18 و به کمک آنالیز واریانس یک طرفه(ANOVA one way) با هم مقایسه شدند. جهت بررسی نتایج سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:44 +0430 on Tuesday May 30th 2017

یافته‌ها

نتایج فاکتورهای هماتولوژی در جدول ۱ آورده شده است.

نتایج فاکتورهای هماتولوژی:

جدول ۱. آمار توصیفی شاخص‌های خون‌شناسی (هماتولوژی)

پارامتر	کنترل (n=12)	نانو نقره (n=12)	نانو نقره –زنجبیل (n=12)	زنجبیل (n=12)	P-value
MCHC (g/dl)	۳۱/۶۶ ± ۰/۹۸	۲۹/۷۲ ± ۰/۵۰	۲۹/۲۵ ± ۰/۳۶	۳۰/۵۳ ± ۰/۷۹	0.095
Plt (10^3/mm^3)	۱۲۹۸/۶۸ ± ۵۹/۹۸	۱۰۹۶/۳۳ ± ۵۶/۲۰	۱۴۹۸/۸۴ ± ۴۰/۸۳	۱۴۳۴/۳۸ ± ۳۸/۰۹	0.001
Lymphocyte (%)	۸۲/۳۰ ± ۱/۵۴	۶۲/۷۸ ± ۴/۱۱	۵۵/۳۰ ± ۴/۴۶	۶۶/۲۵ ± ۳/۷۴	0.001
Monocyte (%)	۸/۶۸ ± ۱/۱۸	۹/۶۴ ± ۰/۶۳	۲۱/۴۱ ± ۳/۶۹	۱۳/۰۰ ± ۲/۷۱	0.015
WBC (10^3/mm^3)	۶/۶۵ ± ۰/۲۴	۹/۰۵ ± ۰/۳۴	۳۱/۶۶ ± ۰/۹۸	۷/۶۸ ± ۰/۳۴	0.001
RBC (10^6/mm^3)	۹/۳۱ ± ۰/۲۵	۷/۵۹ ± ۰/۱۷	۸/۰۹ ± ۰/۳۶	۸/۷۸ ± ۰/۲۲	0.001
Hb (g/dl)	۱۳/۹۵ ± ۰/۱۶	۹/۸۸ ± ۰/۲۸	۱۰/۸۵ ± ۰/۴۹	۱۲/۴۶ ± ۰/۲۷	0.001
HCT (%)	۴۴/۶۳ ± ۱/۲۸	۳۳/۴۱ ± ۱/۰۳	۳۸/۰۰ ± ۱/۸۵	۴۱/۰۳ ± ۱/۰۴	0.001
MCV (fl)	۵۰/۸۰ ± ۰/۸۴	۴۳/۹۶ ± ۰/۹۹	۴۷/۰۶ ± ۱/۲۰	۴۶/۸۵ ± ۱/۰۶	0.001
MCH (pg)	۱۵/۱۸ ± ۰/۵۷	۱۲/۹۸ ± ۰/۱۶	۱۳/۷۳ ± ۰/۲۸	۱۴/۲۳ ± ۰/۲۴	0.001

طبق این نتایج به جز پارامترهای MCHC و Monocyte بقیه پارامترها نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌دار هستند. هم‌چنین نتایج آنالیز آماری روابط معنی‌داری را بین دیگر گروه‌ها به غیر از کنترل مشهود ساخت که عبارتند از: در مورد فاکتور WBC گروه دریافت کننده‌ی همزمان نانو نقره و زنجبیل نسبت به گروه‌های دریافت کننده زنجبیل و گروه دریافت کننده نانو نقره دارای اختلاف معنی‌دار است. در مورد پارامترهای RBC و MCH گروه دریافت کننده نانو نقره با گروه دریافت کننده‌ی زنجبیل دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند. در مورد پارامترهای Hb، HCT، MCV و PLT گروه دریافت کننده‌ی نانو نقره با گروه دریافت کننده‌ی زنجبیل و گروه دریافت کننده‌ی نانو زنجبیل دارای اختلاف معنی‌دار هستند. مقادیر به صورت (Mean ± SE) به همراه سطح معنی‌داری آنها بیان شده است.

نتایج فاکتورهای استرس اکسیداتیو:

مقادیر پارامترهای استرس اکسیداتیو در جدول ۲ بیان شده است. فاکتورهای MDA و TAC بر روی سرم خون و SOD و GPX بر روی خون توتال سنجش شده‌اند.

جدول ۲. آمار توصیفی شاخص‌های استرس اکسیداتیو (خون)

پارامتر	کنترل (n=12)	نانو نقره (n=12)	نانو نقره –زنجبیل (n=12)	زنجبیل (n=12)	P-value
MDA (µmol/l)	۱/۱۰ ± ۰/۰۴	۱/۵۸ ± ۰/۱۵	۱/۶۲ ± ۰/۱۳	۱/۳۲ ± ۰/۱۹	0.06
Blood TAC (mmol/l)	۱/۷۱ ± ۰/۰۹	۱/۹۳ ± ۰/۰۸	۱/۷۰ ± ۰/۱۸	۱/۶۴ ± ۰/۱۰	0.21
Blood SOD (u/gr Hb)	۱۰۸۲/۴۹ ± ۲۰۵/۵۹	۱۱۵۳/۳۲ ± ۱۶۳/۴۶	۸۸۱/۵۷ ± ۱۱۱/۰۷	۹۸۸/۵۰ ± ۲۳۸/۳۳	0.63
Blood GPX (u/gr Hb)	۲۸۸۶/۵ ± ۱۶۱/۹۰	۳۸۸۸/۵۸ ± ۱۵۶/۵۷	۳۴۱۵/۵۵ ± ۱۲۴/۷۰	۳۰۹۳/۸۳ ± ۱۲۷/۵۰	0.001

جدول ۲. پارامترهای استرس اکسیداتیو در گروه‌های مورد مطالعه:

www.SID.ir

Archive of SID

به جز گلوتاتیون پراکسیداز بقیه پارامترها دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نیستند. در مورد GPX بین گروه نانو نقره با گروه‌های دریافت کننده‌ی زنجبیل و گروه دریافت کننده‌ی نانو زنجبیل نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید.

نتایج سنجش آنزیم‌های کبدی:

میزان آنزیم‌های کبدی در جدول ۳ بیان شده است

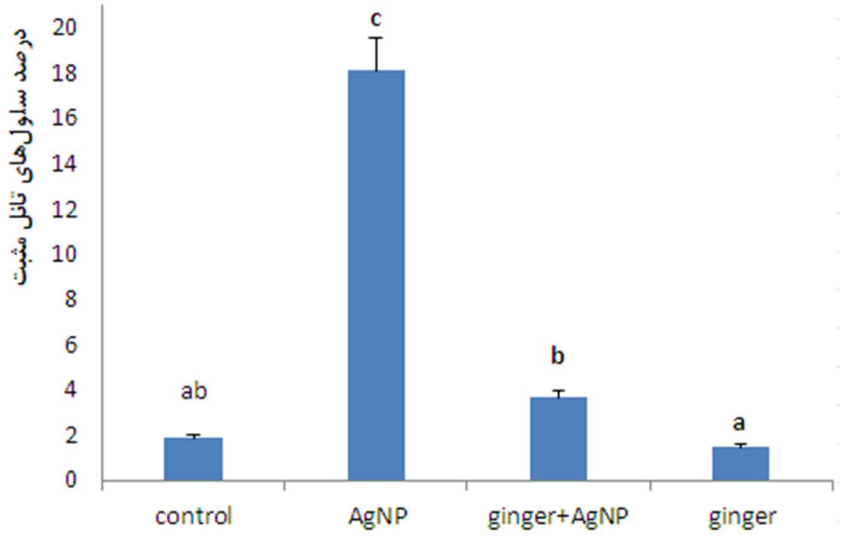
جدول ۳. آمار توصیفی شاخص‌های آنزیم‌های کبدی

پارامتر	کنترل (n=12)	نانو نقره (n=12)	نانو نقره –زنجبیل (n=12)	زنجبیل (n=12)	P-value
AST (u/l)	۸۲/۸۰ ± ۳/۰۰	۴۲۳/۱۰ ± ۳۱/۸۴	۱۱۶/۴۰ ± ۶/۶۱	۹۶/۳۰ ± ۷/۳۳	0.001
ALT (u/l)	۶۲/۵۰ ± ۲/۷۵	۱۵۷/۶۰ ± ۲۶/۷۶	۵۰/۶۰ ± ۷/۱۰	۴۹/۷۰ ± ۲/۰۲	0.001
ALP (u/l)	۲۱۴/۹۰ ± ۱۶/۶۱	۳۰۲/۳۰ ± ۱۹/۴۲	۲۰۸/۶۰ ± ۷/۰۷	۲۴۹/۹۰ ± ۹/۷۸	0.001
GGT (u/l)	۵/۳۵ ± ۰/۴۵	۶/۷۹ ± ۰/۴۴	۵/۴۴ ± ۰/۲۹	۴/۵۲ ± ۰/۴۲	0.004
LDH (u/l)	۵۹۸/۳۰ ± ۲۱/۴۸	۵۰۸۷/۰۰ ± ۵۷۱/۴۰	۱۰۳۸/۹۰ ± ۹۲/۴۱	۹۴۲/۶۰ ± ۳۵/۸۴	0.001

جدول ۳. سطوح آنزیم‌های کبدی: در ۴ گروه مورد مطالعه. هر ۵ آنزیم مورد مطالعه دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل هستند. روابط معنی‌داری رد بین گروه‌های دیگر به این صورت است در مورد پارامترهای ALT، AST، LDH و GGT گروه نانو نقره با گروه‌های دریافت کننده‌ی زنجبیل و هم‌چنین با گروه دریافت کننده‌ی نانو نقره–زنجبیل دارای اختلاف معنی‌دار است. در پارامتر ALKP گروه نانو نقره – زنجبیل با گروه‌های دریافت کننده نانو نقره و دریافت کننده‌ی زنجبیل دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

نتایج آزمون تانل:

نتایج آزمون تانل درنمودار ۱ بیان شده است.



نمودار ۱. مقایسه تعداد سلول‌های هپاتوسیت تانل مثبت در گروه‌های مختلف موش. همان طور که مشاهده می‌شود بیش‌ترین میزان آپاپتوز در گروه دریافت کننده نانو ذرات نقره مشاهده می‌شود. در گروه زنجبیل + نانو نقره احتمالا به علت خاصیت آنتی اکسیدانی زنجبیل این مقدار بسیار کاهش یافته است.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:44 +0430 on Tuesday May 30th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:44 +0430 on Tuesday May 30th 2017

بحث

در این پژوهش مشخص شد زنجبیل بر روی القای سمیت توسط نانو ذرات نقره در پارامترهای مختلف از جمله استرس اکسیداتیو موثر است. ذرات نانو نقره باعث القای استرس اکسیداتیو در بافت‌های بدن می‌شود. آنتی اکسیدان‌های موجود در غذا به عنوان مکمل قدرتمندی برای کاهش استرس اکسیداتیو می‌باشند. شواهدی وجود دارد که رژیم‌های غذایی غنی از آنتی اکسیدان‌ها باعث کاهش استرس اکسیداتیو در بیماری می‌شوند(۱۴). استرس القا شده توسط گونه‌های آزاد اکسیژن(ROS) که در میتوکندری تولید می‌شوند موجب آسیب به لیپیدها، پروتین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند.در این پژوهش به کمک آزمون تانل میزان مرگ سلولی ناشی از سمیت نانو ذرات نقره در بافت کبد بررسی گردید و مشخص شد در بین گروه‌های مورد مطالعه بیش‌ترین میزان آپاپتوز در گروه دریافت کننده نانو نقره و سپس در گروه دریافت کننده نانو نقره و زنجبیل به طور همزمان وجود دارد. آگاروال و همکاران(۲۰۱۳) نشان دادند که سطح بالای ROS سبب شکسته شدن غشای خارجی و داخلی میتوکندری شده و در نتیجه منجر به رها شدن پروتئین سیتوکروم C از میتوکندری و فعال شدن آبشار و وقایع آپاپتوز می‌شود و بنابر این در فرآیند آپاپتوز ROS به عنوان یک میانجی عمل می‌کند(۱۵). در پژوهش حاضر نیز در گروه دریافت کننده نانو ذرات نقره سطح بالایی از آپاپتوز در بافت کبد مشاهده شد. سمیّت وابسته به غلظت نانو ذرات اکسیدآهن به واسطه‌ی افزایش فاکتورهای استرس اکسیداتیو، توسط نقوی و همکاران در سال ۲۰۱۰ با کشت سلولی ماکروفاژهای انسانی و اضافه کردن نانو ذرات به این محیط، مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از غلظت‌های بالاتر نانو ذرات اکسید آهن، منجر به افزایش ROS شد که سبب آسیب و مرگ سلولی گردید. آسیب غشای سلولی ناشی از نانو ذرات اکسید آهن با اندازه‌گیری لاکتات دهیدروژناز(LDH) مورد مطالعه قرار گرفت. لاکتات دهیدروژناز یک آنزیم سیتوزولی است که به دنبال آسیب غشای سلولی در مایعات خارج سلولی ظاهر می‌شود. بر اساس این مطالعه آسیب سلولی ناشی از نانو ذرات اکسید آهن هم وابسته به غلظت و هم وابسته به زمان است. بنابر این استفاده از غلظت پایینی از نانو ذرات اکسید آهن بسیار مهم است تا از آسیب سلولی و مرگ ناشی از استرس اکسیداتیو جلوگیری شود. البته به دلیل کوچک‌تر بودن نانو ذرات اکسید آهن و احتمالاً حذف سریع‌تر آن‌ها از راه ادرار، سمیّت آن‌ها در بافت‌ها متفاوت خواهد بود. نانو ذرات اکسید آهن پس از ۲۴ ساعت می‌توانند استرس اکسیداتیو مرگ سلولی را تحریک کنند. با وجود این که نانو ذرات سریع حذف می‌شوند اما سبب آسیب کبد، کلیه و شش‌ها می‌گردند. اگر چه نانو ذرات اکسید آهن از طریق ادرار حذف می‌شوند ولی می‌توانند در بسیاری از اندام‌ها ایجاد سمیّت کنند(۱۶). مطالعه حاضر روی نانو ذرات نقره صورت گرفت ولی از نظر ایجاد مرگ سلولی و آنزیم لاکتات دهیدروژناز با این پژوهش هم‌خوانی دارد. بعضی از گیاهان دارویی برای درمان اختلالات ورید و نارسایی‌های عروق لنفاوی، پیشگیری و درمان آسیب‌های کبدی ناشی از توکسین‌های متابولیک مصرف می‌شوند. در موارد آسیب‌های مزمن کبدی آنتی اکسیدان‌ها سبب افزایش اعمال پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌شوند.(۱۷) در این مطالعه زنجبیل با خاصیت آنتی اکسیدانی خود در بهبود کبد نقش دارد و با این مطالعه هم‌خوانی دارد. کبد یکی از اندام‌هایی است که در بیماری‌های مختلف می‌تواند دچار آسیب گردد. آنزیم‌های ALT وAST به مقدار فراوان در کبد وجود دارند و با آسیب سلول‌های کبدی میزان این آنزیم‌ها در خون بالا می‌رود. این آنزیم‌ها در ارزیابی اختلالات کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرند. افزایش در فعالیت آنزیم‌های فوق منعکس کننده‌ی آسیب کبدی است. اختلالات التهابی سلولهای کبدی منجر به افزایش حاد در میزان ترانس آمینازها می‌گردد. آزادسازی آنزیم به داخل جریان خون در هنگام آسیب یا مرگ سلولی اتفاق می‌افتد. هر بیماری که سبب افزایش فعالیت متابولیکی کبد گردد، موجب افزایش سطح آنزیم‌های فوق در خون می‌شود. میزان این آنزیم‌ها در خون هم‌چنین به علت آسیب سلول‌های عضلانی و کبد در مبتلایان به دیابت افزایش می‌یابند(۱۸).

www.SID.ir

Archive of SID

در مطالعه‌ی حاضر نیز میزان آنزیم‌های کبدی در موش‌ها افزایش داشتند. مطالعات نشان داده‌اند که قسمت‌های تازه و سبز رنگ درخت گردو و به ویژه برگ‌های آن حاوی آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها و اسید کلروژنیک است(۱۹) که احتمالاً با پاکسازی ROS و جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد از اختلالات ثانویه دیابتی و آسیب‌های بافتی و سلولی جلوگیری می‌کند که در نتیجه‌ی آن سطوح سرمی آنزیم‌های نظیر AST وALP کاهش می‌یابد(۲۰). در مطالعه حاضر نیز زنجبیل سبب کاهش سطوح آنزیم‌های کبدی گردید که احتمالا به خاطر وجود فلاونوئیدها در آن می‌باشد.

اندازه‌گیری تعداد گلبول‌های سفید در غلظت‌های کم نشان دهنده‌ی افزایش گلبول‌های سفید بود که بیان می‌دارد در ابتدا بدن در جهت مقابله با این ذرات ورودی، تولید گلبول‌های سفید را افزایش می‌دهد ولی با تضعیف بدن در غلظت‌های بالا با کاهش تولید گلبول‌های سفید مواجه هستیم. به نظر می‌آید نانو ذره‌ی اکسید مس فرآیندهای مختلفی را در بدن تحت تاثیر قرار می‌دهد(۲۱) غلظت بالای اکسید مس به علت مهار فعالیت سلول، خاصیت آنتی‌بیتوتیک و هم‌چنین تحریک استرس اکسیداتیو در سلول و کاهش اکسید انتهای سلولی و افزایش درگیری سلول‌ها در فرآیندهای ایمنی موجب کاهش تعداد سلول‌های خونی می‌گردد(۲۱). نانو ذرات نقره نیز موید این مقاله‌ها در رابطه با تغییر در تعداد گلبول‌های سفید بودند.

نتیجه گیری

نانو ذرات نقره می‌توانند با اثر سمیت خود بر روی فاکتورهای استرس اکسیداتیو، آنزیم‌های کبدی، فاکتورهای هماتولوژی و میزان مرگ سلولی در کبد تغییراتی را ایجاد نمایند. عصاره‌ی زنجبیل با خاصیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات فلاونوئیدی خود تا حدود زیادی قادر به جبران این اثرات نانو ذرات نقره می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دکترای بیوشیمی می‌باشد. بدین وسیله ازمعاونت‌های پژوهشی دانشکده دامپزشکی شیراز و دانشگاه شیراز و زحمات کلیه عزیزانی که در انجام مراحل مختلف پایان‌نامه با کمک‌های علمی و معنوی خود یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1.Kreyling W.G, Semmler M, Chaudhry Q. "A complementary definition of nanomaterial". Nano Today 2010; 53 : 165-168.

2.Salari H.R, Kalbassi M.R, Johari A. "Effect of water salinity on acute toxicity of colloidal silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae". Iranian Journal of Health and Environment. 2012; 5 (1): 121-132.

3.Ahmadi F, Abolghasemi S, Parhizgar N, Moradpour F."Effect of silver nanoparticles on common bacteria in hospital surfaces". Jundishapur Journal of Microbiology. 2013; 6 (3): 209-214.

4.Rezaeizarchi S, Taghavifoumani M.H, Razavisheshdeh S.A.R, Negahdari M. "The effect of silver nanoparticles on blood cells in male rats". The Scientific Journal of Iranian Blood Transfusion Organization . 2013; 10 (2): 147-153.

5.Bilberg K, Hovgaard M.B, Besenbacher F, Baatrup E. "In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (*Danio rerio*) ". Journal of Toxicology. 2012; 2012 (1):1-9.

6.Hussain S. M, Hess K.L, Gearhart J.M, Geis K.T, Schlager J.J. "In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 2A rat liver cells" .Toxicology in Vitro. 2005; 19(7): 975-983.

7.Halliwell B, Gutteridge JM. "The antioxidants of human extracellular fluids". Archives of Biochemistry and Biophysics. 1990; 280 (1): 1-8.

8.Taghizadeh A, Shirpoor A, Farshid A.A, Saadatian R, Rasmi Y, Saboory E, Ilkhanizadeh B, Allameh A. "The effect of ginger on diabetic nephropathy, plasma antioxidant capacity and lipid peroxidation

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:44 +0430 on Tuesday May 30th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:44 +0430 on Tuesday May 30th 2017

in rats". Food Chemistry. 2007; 101 (1): 148–153.

9.Khaki A, Bayatmakoo R, Nouri M, Khaki AA. "Remedial effect of *Cinnamon zeylanicum* on serum anti-oxidants levels in male diabetic rat". Life Science Journal .2013; 10(4): 103-107.

10. Wu B, Cui H , Peng X, Fang J, Zuo Z, Deng J, Huang J. "Dietary nickel chloride induces oxidative intestinal damage in broilers". International Journal of Environmental Research and Public Health. 2013; 10 (6):2109-2119.

11. Dalia A. H ."Effect of extracts of ginger goots and cinnamon bark on fertility of male diabetic rats". Journal of American Science. 2010; 6(10):940-947.

12. Shanmugam K. R, Mallikarjuna K, Nishanth K, Chen C.Y, Kuo C. H, and Kesireddy S.R. "Ginger feeding protects against renal oxidative damage caused by alcohol consumption in rats". Journal of Renal Nutrition 2011; 21(3): 263–270.

13. Swaroopa Maralla. "Effect of ginger extracts consumption on renal function during ethanol withdrawal induced-stress". International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology. 2013; 2(11): 6412-6418.

14. Paolisso G, Esposito R, Dalessio MA, Barbieri M. "Primary and secondary prevention of atherosclerosis: is there a role for antioxidants? Diabetes & Metabolism. 1999; 25(4):298-306.

15. Agarwal M,Murugan. MS,Sharma A. "Nanoparticles and its toxic Effects: A Review".*International Journal of Current Microbiology* and Applied Sciences.2013; 2 (10): 76-82.

16. Naqvi S, Samim M, Abdin MZ, Jalees Ahmed,F , Maitra AN, Prashant CK, Dinda AK. "Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress". International Journal of Nanomedicine .2010; 5: 983–989.

17. Savickiene N, Dagilyte A, Lukosius A. "Importance of biologically active copmponents and plants in the prevention of complications of diabetes mellitus". Medicina . 2002; 38(10):970-975.

18. Foreston WC, Tedesco FJ, Starnes EC, Shaw CT. "Marked elevation of serum transaminase activity associated with extrahepatic biliary tract disease". Journal of Clinical Gastroenterology. 1985; 7(6): 502 - 505.

19.Solar A, Colaric M, Usenik V, Stampar F. "Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (Juglans regia L.) ". Journal of Plant Science. 2006; 170:453-461.

20.Madani H. " Effect of hydroalcoholic extract of *Juglans regia* leaves activity of AST and ALT enzymes in alloxan – induced diabetic rats". Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009; 15(2): 213- 218.

21.Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, et al. "Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo". Toxicology Letters .2006; 163(2): 109-120.

www.SID.ir