ORIGINAL ARTICLE

Effects of Alcoholic Extract of Peganumharmala L. on Malondialdehyde Concentration and Catalaseand Glutathione Peroxidase Activity in Mice Treated with Nanosilver Particles

Samira Karam Sichani[1],
Nooshin Naghsh[2],
Nematallah Razmi[3]

[1] MSc Student of Biochemistry, Islamic Azad University, Fars Science and Research Branch, Shiraz, Iran
[2] Department of Biology, Islamic Azad University, Flavarjan Branch, Isfahan, Iran
[3] Department of Biochemistry, Islamic Azad University, Fars Science and Research Branch, Shiraz, Iran

(Received August 25, 2012; Accepted November 11, 2012)

Abstract

Background and purpose: Nanosilver particles are associated with oxidative stress due to free radical production. Long-term use of antioxidant agents could result in harmful production of free radicals. This study assessed the protective and antioxidant effects of *Peganumharmala L.*onmalemicetreated with nanosilver particles.

Materials and methods: In this study 32 male Albino mice (25-30gr) were divided into four groups; one control group and three intervention groups. The intervention groups included a group receiving 500 ppm nanosilver particles, a group fed 20 mg/kg/day by ethanolic extract of *P.harmala*for 30 days, and a group which was given ethanolic extract of *P.harmala*orally and the same dose of nanosilver particles. Onthreeconsecutive day sat the beginning of the experiment intraperitoneal injections of nanosilver were performed. Post-treatment blood samples were collectedfromthe hearts and the activity of serum catalase (CAT) and glutathioneperoxidase (GPx) I nredblood cell and concentration of serummalondialdehyde (MDA) were determined.

Results: In the mice treated with nanosilver particles the MDA concentration significantly increased, while significant decreases were seen in GPx and CAT activities ($P<0.001$). However, *P.harmala*extract reversed these effects i.e. it increased GPx and CAT activities and decreased the MDA level significantly ($P<0.001$).

Conclusion: The ethanolic extract of *P. harmala*with antioxidant properties is believed to decrease thefreeradicals produced by silvernanoparticles.

***Keywords**:* Nanosilver, *Peganumharmala*, catalase, glutathioneperoxidase, malondialdehyde

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(95): 10-17 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۹۵ آذر سال ۱۳۹۱ (۱۷-۱۰)

تأثیر عصاره‌الکلی اسپند بر غلظت مالون دی آلدئید و فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون پر اکسیداز در موش های تیمار شده با نانو ذرات نقره

سمیرا کرم سیچانی[۱]
نوشین نقش[۲]
نعمت الله رزمی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: نانوذرات نقره با استرس اکسیداتیو به واسطه تولید رادیکال آزاد ارتباط دارد. آنتی اکسیدان‌ها می‌تواند باعث بروز اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد در طولانی مدت گردد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات حفاظتی و آنتی‌اکسیدانی گیاه اسپند (Peganum harmalaL) بر روی موش‌های نر تیمار شده با نانو ذرات نقره می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی موش‌های آزمایشگاهی نر نژاد آلبینو (۲۵-۳۰ گرم) به چهار گروه تقسیم شدند: کنترل، گروه تزریق شده با نانو ذرات نقره ۵۰۰ ppm، گروه دریافت کننده عصاره اتانولی اسپند خوراکی به میزان ۲۰ mg/Kg/day به مدت ۳۰ روز و گروه آخر دریافت کننده نانو ذرات و خورنده عصاره اسپند با دوزهای فوق بوده‌اند. تمامی تزریقات در ۳ روز متوالی و در ابتدای آزمایش به صورت داخل صفاقی انجام شد. پس از دوره تیمار از قلب موش‌ها خون گرفته و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT) سرم و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) گلبول‌های قرمز و غلظت مالون دی آلدئید (MDA) سرم اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: در گروه تیمار شده با نانوذرات نقره افزایش معنی‌داری در غلظت مالون دی آلدئید و کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز صورت گرفت ($p<0/001$). هم‌چنین عصاره اتانولی اسپند اثرات فوق را معکوس نمود، به طوری که غلظت مالون دی آلدئید را کاهش و افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز ایجاد گردید ($p<0/001$).

استنتاج: در واقع می‌توان عصاره اتانولی اسپند، با خاصیت آنتی‌اکسیدانی را به عنوان کاهش دهنده رادیکال‌های آزاد حاصل از نانو ذرات نقره پیشنهاد نمود.

واژه های کلیدی: اسپند (Peganum harmala L)، نانوذرات نقره، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، مالون دی آلدئید

مقدمه

استرس اکسیداتیو در انسان ناشی از عدم تعادل وضعیت آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد(۱). در اغلب موارد استرس اکسیداتیو به صورت تغییر در تعادل پرواکسیدان و آنتی‌اکسیدان به سمت تشکیل پراکسید تعریف می‌شود

مؤلف مسئول: سمیرا کرم سیچانی- فارس: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس E-mail: samirakaramsichani@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، شیراز، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
۳. گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، شیراز، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۱/۶/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۱/۷/۲۲ تاریخ تصویب : ۱۳۹۱/۸/۲۱

که در نهایت منجر به آسیب بافتی می‌گردد(۲). به نظر می‌رسد که گونه‌های فعال واکنش‌گر اکسیژن ROS=Reactive oxygen species در تمامی بافت‌ها از طریق مکانیسم‌های گوناگونی تولید می‌شوند. محققان نانو تکنولوژی با ابعاد وسیعی از کاربردهای نانو ذرات آشنا شده‌اند که ممکن است نقش بسیار زیادی در پزشکی، پیشگیری و درمان بیماری‌ها و تولید دارو داشته باشد. خاصیت میکروب کشی نقره در ابعاد نانو به بیش از ۹۹ درصد افزایش می‌یابد که بر متابولیسم، تنفس و تولید مثل میکرو ارگانیسم‌ها اثر می‌گذارد و تاکنون بیش از ۶۵۰ نوع باکتری شناخته شده را ازبین برده است(۳). نانو ذرات نقره به عنوان یکی از قوی‌ترین مواد ضد باکتری (Antibacterial) و ضد قارچ (Antifungal) معروف هستند، اما این نگرانی وجود دارد که استفاده بیش از اندازه از این ماده خطری بالقوه برای اکوسیستم، حیات بشر و سایر موجودات زنده را در پی داشته باشد(۳). از شایع‌ترین اثرات مواجهه طولانی مدت با نقره ایجاد یک پیگمانتاسیون مشخص غیر قابل برگشت در پوست (Agyria) یا در چشم‌ها (Argyriosis) است(۴). در سلول‌هایی که در معرض نانو ذرات نقره بودند فعالیت میتوکندری، کاهش یافته و عملکرد لاکتات دهیدروژناز، به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد(۵).این کاهش فعالیت نشان دهنده مرگ سلولی می‌باشد. نانو ذرات ممکن است از طریق مسیرهای مختلف وارد بدن شود و باعث ایجاد آسیب‌های مختلف به ارگان‌های متفاوت بدن موجودات زنده می‌شود. Tang و Xi نشان دادند که موش‌هایی که نانو ذرات نقره با سایزهای متفاوت دریافت کرده بودند بعد از ورود به جریان خون، در بافت‌ها مخصوصاً کبد، کلیه، طحال، ریه و مغز انباشته شده بودند. بر اساس این تحقیق ثابت شده است که نانو ذرات نقره سبب تخریب دیواره خونی مغزی شده و تخریب عصبی را به وجود می‌آورد(۶). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر که توسط قربان زاده و همکاران انجام شد، نشان دادند که تزریق نانو ذرات نقره از طریق داخل صفاقی با دو دوز مختلف ۱ppm و ۱۰ دارای اثرات سمی (Toxiceffects) بر روی تخمدان بوده و با فعال کردن مسیرهای کاسپازی ایجاد استرس اکسیداتیو کرده و تخمک‌گذاری را تحت تأثیر قرار داده است(۷). طبق گفته Sriram و همکاران به علت فعال شدن کاسپاز ۳ (Caspase3) در اثر رادیکال آزاد حاصل از نانو ذرات نقره، این رادیکال قادر است مسیر داخلی آپوپتوز را فعال کند(۸). با توجه به کاربردهای مختلف نانو ذرات مخصوصاً نانو ذرات نقره در کشور ما و عدم انجام آزمایش‌های دقیق مبنی بر تاثیرات این نانو ذرات در بدن، در این تحقیق به بررسی تأثیرات عصاره اتانلی اسپند در تغییر خواص نانو ذرات نقره پرداخته شده است. در واقع لیپیدها از مهم‌ترین مولکول‌هایی هستند که مورد تهاجم رادیکال‌های آزاد قرار می‌گیرند. این فرآیند منجر به پراکسیداسیون لیپیدها که در نهایت موجب کاهش حیات و مرگ سلولی می‌شود. در این میان غشای سلول‌ها که غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع (PUFA=Poly Unsaturated Fatty Acid) است بیش‌تر از سایر قسمت‌های سلول به پراکسیداسیون حساس است(۹). پراکسیداسیون لیپیدها منجر به کاهش سیالیت غشاء و از بین رفتن ساختمان و عملکرد آن می‌شود که در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها دخالت دارد. محصول نهایی ناشی از پر اکسیداسیون لیپیدها، مالون دی آلدئید (MDA=Malondialdehyde) می‌باشد. مولکول‌هایی به نام آنتی‌اکسیدان (آنزیمی و غیر آنزیمی) برای حفظ هموستاز اکسیداتیو و مقابله با استرس اکسیداتیو وجود دارند. این مولکول‌ها امکان دارد رادیکال‌های آزاد را خنثی کنند. از جمله مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شامل گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase (GPx))، کاتالاز (Catalase (CAT))، سوپر اکسید دیس موتاز (Superoxide Dismutase (SOD)) است(۱۰). هر آنزیم دارای یک عملکرد ویژه و منحصر به فرد می‌باشد که همگی برای زنده ماندن سلول در شرایط نرمال ضروری

هستند(۱۱). آنیون سوپر اکساید اولین رادیکال آزاد مشتق از اکسیژن است که به وسیله SOD به اکسیژن و پراکسید هیدروژن تبدیل می‌گردد. آنزیم کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز موجب تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شوند(۱۰). تری پپتید گلوتاتیون، تیول غیرپروتئینی اصلی موجودات هوازی و فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی داخل سلولی می‌باشد(۱۲). فلاونوئیدها گروهی از ترکیبات فنولیک با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که دارای خاصیت ضد سرطانی و ضد توموری است. گیاه اسپند (Peganum harmala L) گیاهی حاوی فلاونوئیدها است. گیاه اسپندیکی از گیاهان دارویی می‌باشد.آنتی‌اکسیدان‌های موجود در اسپند ممکن است به مقابله در برابر این رادیکال‌های آزاد پرداخته و سعی در جبران مکانیسم‌های استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) داشته باشند. تعدادی از این آنتی‌اکسیدان‌ها در اسپند شامل فنول‌ها، پلی‌فنول‌ها (فلاونوئیدها) و توکوفرول می‌باشد. گیاه اسپند در طب سنتی دارای اثراتی از قبیل: خواب‌آور، تعریق آور، ضد انگل، قاعده‌آور، سقط‌کننده جنین، ضد سرطان، ضد قارچی، ضد باکتری، محرک سیستم ایمنی و مهار کننده آنزیم مونوآمینو اکسیداز (MAO) می‌باشد(۱۳). با توجه به استفاده گسترده از نانو ذرات نقره در زمینه‌های مختلف در کشور ما و با توجه به اطلاعات بسیار کم اثرات حفاظتی و آنتی‌اکسیدانی اسپند در از بین بردن رادیکال‌های آزاد حاصل از نانو ذرات نقره، در این پژوهش به بررسی تأثیرات اسپند در تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موش‌های نراز نژاد آلبینو پرداخته شد.

مواد و روش ها

این مطالعه به صورت تجربی بر روی ۳۲ سر موش نر از نژاد آلبینو با وزن ۳۰-۲۵ گرم انجام شد. این حیوانات از انستیتو پاستور تهران خریداری شدند و به منظور آماده‌سازی برای آزمایش به مدت یک ماه در اطاق حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان نگهداری شدند. حیوانات در شرایط درجه حرارت مناسب آزمایشگاهی (درجه حرارت ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد) و نور کافی اتاق (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند.

الف- روش تهیه عصاره اتانولی

دانه گیاه اسپند از بیابان‌های اطراف اصفهان جمع‌آوری شد. به منظور شناسایی و تشخیص گونه در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان تأیید گردید. ۲۰۰ گرم از دانه‌های اسپند را شسته و بعد از گذشت ۲۴ ساعت که در محیطی تاریک خشک شد آن‌ها را با استفاده از هاون برقی پودر کردیم. مقدار ۳۲ گرم پودر دانه گیاه اسپند را با اتانول ۱۰۰ درصد توسط دستگاه سوکسیله به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد عصاره گیری کردیم. سپس در دستگاه روتاری حلال خشک شده و پودر جامد به دست آمده را توسط آب مقطر دو بار تقطیر به حجم رسانید و به میزان ۲۰ mg/kg/day به مدت سی روز به موش‌ها خورانده شد.

ب- تقسیم بندی گروه های آزمایشی

در این بررسی ۴ گروه آزمایشی شامل ۸ موش در هر یک از گروه‌ها می‌باشد. گروه ۱ به عنوان گروه کنترل، یک سی‌سی آب مقطر به طریق تزریق داخل صفاقی (interpritonealy) دریافت کردند، به گروه ۲ ۰/۵ سی‌سی در روز نانو ذرات نقره با غلظت ۵۰۰ ppm تزریق داخل صفاقی شد، گروه ۳، ۰/۵ سی‌سی آب مقطر به طریق تزریق داخل صفاقی و دوز ۲۰mg/kg/day عصاره اتانولی دانه گیاه اسپند را به صورت خوراکی دریافت کردند و گروه ۴ یک سی‌سی نانو ذرات نقره ۵۰۰ ppm را به طریق تزریق داخل صفاقی و دوز ۲۰ mg/kg/day به مدت سی روز عصاره اتانولی دانه گیاه اسپند را به صورت خوراکی دریافت کردند. قابل ذکر است که تمام تزریقات در همه ۴ گروه قبل از ۳۰ روز تیمار به‌مدت ۳ روز متوالی تکرارشدند. در

ضمن گروه ۲ و ۴ تا ۳۰ روز قبل از اولین تزریق تحت تیمار با عصاره اتانولی اسپند قرار گرفتند. به گروه کنترل برای حذف اثر ناشی از شوک ۰/۵ سی‌سی آب مقطر تزریق شد. ۳۰ روز بعد از تیمار خون‌گیری انجام شد. در ضمن، خون‌گیری از قلب موش‌ها انجام گرفت. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم CAT سرم از روش Abei بر اساس میزان تجزیه شدن پر اکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰nm استفاده شد(۱۴). فعالیت آنزیم گلوتاتیون پر اکسیداز گلبول‌های قرمز به طور غیر مستقیم و از طریق واکنش جفت شده با آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR) سنجیده شد. احیا گلوتاتیون اکسید حاصل از واکنش گلوتاتیون پر اکسیداز با مصرف NADPH و در حضور GR صورت گرفت. در این واکنش اکسیداسیون NADPH به $NADP^+$ باعث کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ nm می‌گردد که متناسب با فعالیت GPx می‌باشد(۱۵). میزان MDA سرم بر اساس روش Satoh اندازه گیری شد(۱۶).در ضمن نانو ذرات نقره با میانگین قطر ۱۰ نانومتر و کروی شکل از شرکت نانونصب پارس تهیه شده است. شیوه تهیه این نانو ذرات بر اساس احیای نیترات نقره و پوشش دهی آن با سیترات می باشد. با دستگاه (X-Ray Diffraction) X-RD قطر و شکل نانوذرات تأئید شد.

آنالیز آماری

به منظور مقایسه تغییرات میزان آنزیم‌های MDA، CAT سرمی و GPx گلبول قرمز در کل گروه‌های تیمار با یکدیگر بعد از اعمال تیمار، در غلظت‌های ۵۰۰ppm نانوسیلور از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. حد معنی‌دار بودن تفاوت بین نمونه‌ها ۱ درصد و ۵ درصد در نظر گرفته شد. طرح آماری استفاده شده در این تحقیق طرح کاملاً تصادفی است. تعداد تکرار نمونه‌ها ۸ رأس موش نر در نظر گرفته شد. در ضمن، برای سنجش آماری دادها از برنامه نرم افزاری SPSS15 استفاده می‌شود.

یافته‌ها

مقایسه غلظت MDA گروه کنترل با سایر گروه‌های تیمار:

سی روز پس از انجام آزمایش میانگین غلظت مالون دی آلدئید در گروه اول (Control) معادل nmol/ml ۱/۶۳ ± ۲۲/۴۱ بوده که با سایر گروه‌های تیمار مقایسه گردید. میانگین گروه دوم (500 ppm Nanosilver= Ns) نشان داد، میزان غلظت مالون دی‌آلدئید بعد از سی روز معادل nmol/ml ۵/۱۶ ± ۷۷/۱۲ می‌باشد که در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (p=۰/۰۰). میانگین میزان غلظت مالون دی آلدئید بعد از سی روز در گروه سوم (Peganum harmala= Ph) معادل nmol/ml ۵/۳۳ ± ۳۴/۲۵ بوده که در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان داده است. گروه چهارم (500ppm Nanosilver+Peganum harmala=Ns.Ph) میانگین غلظت مالون دی آلدئید معادل nmol/ml ۱/۰۴۱ ± ۴۰/۴۱ می‌باشد که نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داده است. میزان p<۰/۰۰۱ و F=۳۷/۸۵۲ که از طریق تست ANOVA مشخص شد (جدول شماره ۱).

جدول شماره۱: مقایسه غلظت مالون دی آلدئید (MDA) بین گروه کنترل و تیمار

گروه ها	تعداد (N)	میانگین (Mean)	انحراف معیار (SD)	انحراف استاندارد (SE)	سطح معنی داری
گروه۱ (Control)	۸	۲۲/۴۱	۴/۶۲	۱/۶۳	
گروه۲ (500Ns)	۸	۷۷/۱۲	۱۴/۶۱	۵/۱۷	۰/۰۰
گروه۳ (Ph)	۸	۳۴/۲۵	۱۵/۰۷	۵/۳۳	
گروه۴ (Ns.Ph)	۸	۴۰/۴۱	۲/۹۴	۱/۰۴۱	

نتایج به دست آمده از تحلیل Descriptive و ANOVA مالون دی آلدئید: مقایسه غلظت مالون دی آلدئید گروه کنترل و سایر گروه‌های تیمار شده در این جدول p-value معادل (p =۰/۰) است و نشان دهنده معنی‌دار بودن اختلاف می‌باشد. انحراف معیار (SD=Standard deviation) است.

مقایسه فعالیت CAT گروه کنترل با سایر گروه‌های تیمار: سی روز پس از انجام آزمایش میانگین فعالیت کاتالاز در گروه اول (Control) معادل ۸۵/۷۲ ± ۷/۸۰ U/ml بوده که با سایر گروه‌های تیمار مقایسه گردید. میانگین گروه دوم (500 ppm = Ns) نشان داد میزان فعالیت کاتالاز بعد از سی روز معادل ۲/۳۲ ± ۰/۴۹ IU/ml بوده که در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (p=۰/۰۰). میانگین میزان فعالیت کاتالاز بعد از سی روز در گروه سوم (Ph) معادل ۵۶/۷۸ ± ۱۰/۶۳ U/ml گزارش شد که در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داده است. در گروه چهارم (500ppm=Ns.Ph) میانگین فعالیت کاتالاز معادل ۸۶/۷۹ ± ۱۴/۱۴ IU/ml می‌باشد که مشابه گروه کنترل است و تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده است. میزان p<۰/۰۰۱ و F=۱۶/۷۵۷ که از طریق تست ANOVA مشخص شد (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: مقایسه فعالیت کاتالاز (CAT) بین گروه کنترل و تیمار

گروه ها	تعداد (N)	میانگین (Mean)	انحراف معیار (SD)	انحراف استاندارد (SE)	سطح معنی داری
گروه۱ (Control)	۸	۸۵/۷۲	۲۲/۰۷	۷/۸۰	
گروه۲ (500Ns)	۸	۲/۳۲	۱/۴۰	۰/۴۹	۰/۰۰
گروه۳ (Ph)	۸	۵۶/۷۸	۳۰/۰۵	۱۰/۶۳	
گروه۴ (Ns.Ph)	۸	۸۶/۷۹	۳۹/۹۸	۱۴/۱۴	

نتایج به دست آمده از تحلیل Descriptive و ANOVA کاتالاز: مقایسه فعالیت کاتالاز گروه کنترل و سایر گروه‌های تیمار شده در این جدول p-value معادل (p =۰/۰۰۰) است و نشان دهنده معنی‌دار بودن اختلاف به میزان زیاد است. انحراف معیار (SD) است.

مقایسه فعالیت GPx گروه کنترل با سایر گروه‌های تیمار: سی روز پس از انجام آزمایش میانگین فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در گروه اول(Control) معادل ۹/۹۸ ± ۰/۹۰ U/gHb بود که با سایر گروه‌های تیمار مقایسه گردید. میانگین گروه دوم (500ppm Nanosilver= Ns) نشان داد میزان فعالیت GPx بعد از سی روز معادل ۲/۹۳ ± ۰/۶۰ U/gHb می‌باشد که در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (p=۰/۰۰). میانگین فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز بعد از سی روز در گروه سوم (Ph) برابر ۶/۵۹ ± ۱/۶۱ U/gHb گزارش شد که در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داده است. در گروه چهارم (500ppm Ns.Ph) میانگین فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز معادل ۸/۳۶ ± ۰/۵۷ U/gHb بوده که مشابه گروه کنترل است و تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده است. میزان (p<۰/۰۰۱) و F=۸/۸۹۷ که از طریق تست ANOVA مشخص شد (نمودار شماره ۳).

جدول شماره ۳: مقایسه فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز(GPx) بین گروه کنترل وتیمار

گروه ها	تعداد (N)	میانگین (Mean)	انحراف معیار (SD)	انحراف استاندارد (SE)	سطح معنی داری
گروه۱ (Control)	۸	۹/۹۸	۲/۵۶	۰/۹۰	
گروه۲ (500Ns)	۸	۲/۹۳	۱/۷۱	۰/۶۰	۰/۰۰
گروه۳ (Ph)	۸	۶/۵۹	۴/۵۷	۱/۶۱	
گروه۴ (Ns.Ph)	۸	۸/۳۶	۱/۶۱	۰/۵۷	

نتایج به دست آمده از تحلیل Descriptive و ANOVA گلوتاتیون پراکسیداز: مقایسه گلوتاتیون پراکسیداز گروه کنترل و سایر گروه‌های تیمار شده در این جدول p-value معادل(p =۰/۰۰۰) است و نشان دهنده معنی‌دار بودن اختلاف تا حد زیاد است. انحراف معیار (SD) است.

بحث

در بررسی حاضر از مقایسه سایر گروه‌ها با گروه کنترل می‌توان فهمید که گروه دریافت کننده نانو ذرات نقره از طریق تولید رادیکال آزاد سبب پراکسیداسیون لیپیدی و تولید مالون دی آلدئید می‌شود. در واقع نانو ذرات نقره باعث افزایش MDA سرم و کاهش CAT سرم و GPx گلبول‌های قرمز می‌شود. گروه دریافت کننده اسپند در مقایسه با گروه

کنترل مشابه گروه دریافت کننده نانو ذرات نقره است، اما گروه دریافت کننده عصاره اتانولی اسپند در مقابل گروه نانو ذرات نقره باعث کاهش MDA سرم و افزایش CAT سرم و GPx گلبول‌های قرمز گردید. گروه ۴ که ترکیب نانوذرات نقره و عصاره اتانولی اسپند است در مقایسه با گروه تیمار شده توسط نانوذرات نقره سبب کاهش MDA سرم و افزایش CAT سرم و GPx گلبول‌های قرمز شد. از طرفی در هنگام تزریق، سرسرنگ‌ها از جنس نقره می‌باشند و در جراحی‌ها و دندان‌پزشکی امکان آزاد شدن این نانوذرات به فرم تزریقی در خون وجود دارد، لذا اگر قبل ازعمل جراحی بدن ذخایر آنتی اکسیدانی اش توسط عصاره‌های گیاهی خوراکی تامین شود از اثرات مضر این نانو ذرات جلوگیری می‌شود. به همین دلیل در این تحقیق از اسپند به طور خوراکی و نانو ذرات به طور تزریقی استفاده شده است. در مطالعه حاضر به بررسی تأثیرات آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی اسپند به میزان ۲۰ mg/kg/day در مدت سی روز بر روی موش‌های تیمار شده با نانو ذرات نقره پرداخته شده است.

در پژوهشی که توسط Seliem و Moshera بر روی جوجه‌ها انجام شد تأثیر دانه‌های اسپند بر روی استرس گرمایی (heat stressed) مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق تأثیر استرس گرمایی مشابه با تزریق نانو ذرات نقره در مطالعه حاضر می‌باشد. این محققین نشان دادند که اسپند باعث کاهش اثرات اکسایشی گرما شده است. در واقع استرس گرمایی همانند نانو ذرات نقره عمل می‌کند و باعث تولید رادیکال آزاد و افزایش مالون دی آلدئید می‌شوند، اما اسپند برخلاف نانوذرات نقره باعث کاهش مالون دی آلدئید و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود. میزان اسپند استفاده شده برای جوجه‌ها g/kg ۲/۵ بوده است(۱۷). میزان اسپند مورد استفاده برای موش‌های نر mg/kg/day ۲۰ در سی روز می‌باشد.

محققان توانسته‌اند با آزمایش‌های گوناگون ساختار ترکیبی متفاوت بعضی از ذرات را شناسایی کنند. برخی از این مواد دارای قدرت خودسازی و یا تکثیر مجدد هستند و این ویژگی یکی از مهم‌ترین و خطرناک‌ترین خواص مواد نانو به شمار می‌رود. Portney و Ozkan نشان دادند هر چه قطر نانو ذرات نقره کوچک‌تر باشد نفوذ آن به سلول و اثرات مولکولی آن بر مکانیسم‌های داخل سلولی افزایش می‌یابد(۱۸). با توجه به تحقیقات انجام شده و تأثیر بهتر قطر کم نانوذرات نقره بر روی سلول در مطالعه حاضر از میانگین قطر ۱۰ نانومتر و شکل کروی آن استفاده کردیم.

Nagley و Hansen نشان دادند رادیکال‌های آزاد حاصل از مکانیسم کاتالیستی نانو ذرات نقره از طریق فرآیند پراکسیداسیون لیپیدی به اسیدهای چرب اشباع نشده موجود در فسفولیپیدهای غشاء آسیب می‌رساند و موجب پیر شدن سلول یا آپوپتوز می‌شود(۱۹). اخیراً گزارش‌هایی توسط Hussain و همکاران بر روی سمیت نانو ذرات نقره انجام شده که در آن میتوکندری به عنوان هدف اولیه نانو ذرات نقره در سلول‌های کبد موش صحرایی به حساب می‌آید(۵). علاوه بر این گزارش شده که نانو ذرات نقره از طریق تولید ROS و کاهش گلوتاتیون در کبد موش صحرایی عمل می‌کند. در مطالعه حاضر مشابه دو پژوهش قبل با اندازه‌گیری میزان MDA و افزایش آن در گروه ۲ دریافت کننده نانو ذرات نقره در مقایسه با سه گروه دیگر به این نتیجه رسیدیم که نانو ذات نقره باعث ایجاد پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود. هم چنین با اندازه‌گیری CAT و GPx متوجه شدیم که نانو ذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل فاقد فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. از طرفی Sriram و همکاران نشان دادند که رادیکال آزاد حاصل از نانو ذرات نقره، قادرند مسیر داخلی آپوپتوز را فعال کنند(۸). در تحقیقی که توسط نقش و همکاران انجام شد، نشان دادند بعد از ۵ روز پی‌در پی تزریق با نانو ذرات نقره فعالیت آنزیم کبدی ALT و گلبول سفید تغییر یافت به طوری که بیش‌ترین اثر نأنو سیلور بر

گلبول‌های سفید رات‌ها در غلظت ppm ۴۰۰ بعد ۱۲روز از آخرین تزریق بود. هم چنین بیش ترین اثر نانوسیلور بر آنزیم کبدی ALT رات‌ها در غلظت ppm ۵۰ بعد ۳ روز از آخرین تزریق بود(۲۰).

البته نانو ذرات نقره به کار رفته در تحقیق نقش و همکاران به قطر ۴ نانومتری و کروی بوده است، اما در پژوهش حاضر ابتدا تزریق نانو ذرات نقره ppm ۵۰۰ و بعد از سی روز تیمار خون گیری به طور مستقیم از قلب موش‌های سوری انجام شد. ضمناً نانو ذرات نقره به قطر ۱۰ نانومتری و کروی بود. اما در تحقیق حاضر به دلیل پی بردن به این موضوع که نانو ذرات نقره چگونه باعث تغییر در میزان آنزیم‌های کبدی شده به بررسی غلظت مالون دی آلدئید سرم، کاتالاز سرم و گلوتاتیون پر اکسیداز گلبول‌های قرمز پرداخته شد. موش‌های تیمار شده با نانو ذرات 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 ($p<۰/۰۰۱$). در واقع می‌توان از ترکیب این دو پژوهش به این نتیجه رسید که نانو ذرات نقره از طریق تولید رادیکال آزاد باعث تخریب سلول‌های کبدی و افزایش میزان آنزیم ALT در خون می‌شود.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره اتانولی اسپند از طریق افزایش معنی‌دار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش مالون دی آلدئید باعث از بین بردن رادیکال‌های آزاد حاصل از نانو ذرات نقره می‌شود. در واقع از عصاره اتانولی اسپند می‌توان یک نانو ترکیب گیاهی ساخت که باعث کاهش عوارض نانو ذرات نقره می‌شود.

References

1. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for Testing Antioxidant Activity. Analyst 2002; 127(1): 183-198.
2. Baynes JW. Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes. Diabetes 1991; 40(4): 405-412.
3. Geho DH, Jones CD, Petricoin EF, Liotta LA. Nanoparticles: potential biomarker harvesters. Curr Opin Chem Biol 2006; 10(1): 56-61.
4. Seiler HG, Sigel H, Sigel A. Handbook on toxicity of inorganic Compounds. Vol 2. 2nd ed. New York: Dekker; 1988.
5. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicol in Vitro 2005; 19(7): 975-983.
6. Tang J, Xi T. Status of biological evaluation on silver nanoparticles. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi 2008; 25(4): 958-961.
7. Ghorbanzadeh V, Moshtaghian J, Ebadi AG. Influence of Nano-Silver on Graffian Follicles via Intraperitoneal Injection in Rats. Middle-East J Scientific Research 2011; 8(1): 228-230.
8. Sriram MI, Kanth SBM, Kalishwaralal K, Gurunathan S. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. Int J Nanomedicine 2010; 5( ): 753-762.
9. Pryor WA, Stanley JP, Blair E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. Lipids 1976; 11(5): 370-379.
10. Mates JM, Perez-Gomez C, Núñez Decastro I. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin Biochem1999; 32(8): 595-603.
11. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase,

catalase, and Cu/Zn-SOD for cell cervival against oxidative stress. Free Radic Biol Med 1994; 17: 48-235.

12. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. Prog Neurobiol 2000; 62(6): 649-671.
13. Mahmoudian M, Jalilpour H, Salehian P. Toxicity of Peganum harmala: Review and a Case Report. Iranian J Pharmacology and Therapeutics 2002; 1(1): 1-4.
14. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymology 1984; 105: 121-126.
15. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967; 70(1): 158-169.
16. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clin Chim Acta 1978; 90(1): 37-43.
17. Moshera M, Selim E. Effect of harmal seeds on heat stressed chickens. Journal of American Science 2011; 7(12): 606-611.
18. Portney NG, Ozkan M. Nano-oncology: Drug delivery, imaging, and sensing. Anal Bioanal Chem 2006; 384(3): 620-630.
19. Hansen TM, Nagley P. AIF: A multifunctional cog in the life and death machine. Sci STKE 2003; 193(1): pe31.
20. Naghsh N, Noori A, Aqababa H, Amirkhani - dehkordi S. Effect of nanosilver particles on alanin amino transferase (ALT) activity and white blood cells (WBC) level in male wistar rats, in Vivo condition. Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS) 2012; 14(7): 34-37.