

Investigation of the Effect of Linalool on Carbon Tetrachloride-Induced Oxidative Myocardial Injury in Male Rats

Ghasem Taraghy¹,
Shiva Rahimi²,
Masoud Ojarudi³,
Aliakbar Fazaeli⁴,
Zeinab Namjoo⁵,
Lotfollah Rezagholizadeh⁶

¹ MSc Student in Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

² MSc in Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

³ PhD Student in Clinical Biochemistry, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

⁶ Associate Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

(Received April 5, 2025; Accepted May 19, 2025)

Abstract

Background and purpose: Cardiovascular diseases are among the leading causes of mortality worldwide, with myocardial injury often resulting from oxidative stress, drugs, and toxins. Linalool, a natural monoterpene alcohol found in various medicinal plants, has been reported to modulate oxidative stress. This study aimed to investigate the protective effects of linalool against oxidative myocardial damage induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats.

Materials and methods: In this experimental study, 24 male Wistar rats were randomly divided into four groups of six (normal control, linalool control, injury group, and linalool pretreatment group). The first two groups received either physiological saline or linalool (25 mg/kg) for 14 days. The injury group was administered physiological saline for 14 days, followed by a single dose of 1 ml/kg of a 1:1 (v/v) olive oil and CCl₄ mixture on the 14th day. The fourth group received linalool (25 mg/kg) for 14 days, followed by the same CCl₄ mixture on day 14. Forty-eight hours after CCl₄ administration, animals were anesthetized, and cardiac tissues were collected for biochemical and histopathological analyses.

Results: The results showed that CCl₄ significantly decreased the activity of antioxidant enzymes and total antioxidant capacity ($P < 0.001$), and increased malondialdehyde (MDA) levels compared to the control group ($P < 0.001$). Pretreatment with linalool significantly increased the antioxidant indices ($P < 0.001$) and reduced MDA levels relative to the injury group ($P < 0.001$). Furthermore, histopathological examination showed that linalool pretreatment mitigated CCl₄-induced structural alterations in myocardial tissue.

Conclusion: Linalool effectively protects against CCl₄-induced myocardial oxidative damage by reducing lipid peroxidation, enhancing antioxidant capacity, and preserving cardiac tissue structure.

Keywords: Linalool, myocardial injury, carbon tetrachloride, oxidative stress, rats

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (246): 1-11 (Persian).

Corresponding Author: Lotfollah Rezagholizadeh - School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran. (E-mail: Reza34055@gmail.com)

بررسی اثر لینالول (Linalool) بر آسیب اکسیداتیو میوکارد القا شده توسط تترا کلرید کربن در موش صحرایی نر

قاسم ترقی^۱
شیوا رحیمی^۲
مسعود اجارودی^۳
علی اکبر فضائی^۴
زینب نامجو^۵
لطف اله رضاقلی زاده^۶

چکیده

سابقه و هدف: بیماری‌های قلبی و عروقی، یکی از شایع‌ترین علت مرگ و میر در سراسر جهان بوده که یکی از دلایل آن، آسیب میوکارد ناشی از اکسیدان‌ها، داروها و سموم می‌باشد. لینالول یک الکل مونوترپن طبیعی است که در تعدادی از گیاهان دارویی یافت شده و مطالعات نشان داده‌اند، که ممکن است اثر تنظیمی بر استرس اکسیداتیو داشته باشد. این مطالعه با هدف بررسی اثرات محافظتی لینالول بر آسیب اکسیداتیو میوکارد ناشی از تتراکلرید کربن (CCl_4) در موش صحرایی، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۲۴ موش صحرایی نر نژاد ویستار به صورت تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی (کنترل نرمال، کنترل لینالول، گروه آسیب و گروه پیش درمان با لینالول) تقسیم شدند. دو گروه اول به مدت ۱۴ روز به ترتیب سرم فیزیولوژی و لینالول (25 mg/kg) دریافت کردند. گروه آسیب، ۱۴ روز سرم فیزیولوژی و در روز چهاردهم 1 ml/kg مخلوط روغن زیتون و CCl_4 ($1:1 \text{ v/v}$) دریافت نمودند. گروه چهارم به مدت ۱۴ روز لینالول (25 mg/kg) و در روز چهاردهم 1 ml/kg مخلوط روغن زیتون و CCl_4 دریافت کردند. بعد از ۴۸ ساعت، موش‌ها بیهوش شده، بافت قلب برای آنالیزهای بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیک جمع‌آوری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که CCl_4 به طور معنی‌داری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام را کاهش ($P < 0/001$) و میزان مالون دی آلدئید (MDA) را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد ($P < 0/001$). پیش درمان با لینالول شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی را به طور قابل توجهی افزایش ($P < 0/001$)، و سطح MDA را نسبت به گروه آسیب کاهش داد ($P < 0/001$). علاوه بر این، لینالول آسیب تخریبی ناشی از CCl_4 ساختار بافت قلب را در گروه پیش درمان بهبود بخشید.

استنتاج: لینالول با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و حفظ ساختار بافت قلب، به طور موثر در برابر آسیب اکسیداتیو میوکارد ناشی از CCl_4 محافظت می‌کند.

واژه‌های کلیدی: لینالول، آسیب میوکارد، تتراکلرید کربن، استرس اکسیداتیو، موش صحرایی

E-mail: Reza34055@gmail.com

مؤلف مسئول: لطف اله رضایی زاده - اردبیل، انتهای خیابان دانشگاه، بالاتر از فلکه دانشگاه، دانشکده پزشکی و پیراپزشکی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲. کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۳. دانشجوی دکتری تخصصی بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

۴. استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۵. استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۶. دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۴/۱/۲۶ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۲/۲۹

مقدمه

آسیب اکسیداتیو میوکارد عاملی فراگیر در بیماری‌های قلبی عروقی می‌باشد که همچنان عامل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است (۱). بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO) (Health Organization)، بیماری‌های قلبی عروقی سالانه حدود ۱۷٫۹ میلیون مرگ و میر را تشکیل می‌دهند که ۳۲ درصد از کل مرگ و میرهای جهانی را شامل می‌شود (۲). شرایطی مانند بیماری ایسکمیک قلب، نارسایی قلبی و فشار خون بالا به شدت با استرس اکسیداتیو مرتبط هستند و آسیب اکسیداتیو میوکارد را به یکی از عوامل تهدید کننده سلامت عمومی تبدیل می‌کند. شیوع آسیب اکسیداتیو در میوکارد به ویژه در جمعیت‌های سالخورده، افراد مبتلا به دیابت و افراد مبتلا به شرایط التهابی مزمن بالا است، زیرا این گروه‌ها تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) (Reactive oxygen species) بالا و ظرفیت آنتی اکسیدانی کاهش یافته را نشان می‌دهند (۳، ۴). علاوه بر این، عوامل سبک زندگی مانند سیگار کشیدن، رژیم غذایی نامناسب، عدم فعالیت بدنی و حتی سموم استرس اکسیداتیو را تشدید می‌کنند و خطر آسیب میوکارد را افزایش می‌دهند (۵).

تراکلرید کربن (CCl_4) یکی از سموم ایجاد آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو در حیوانات آزمایشگاهی می‌باشد (۶). CCl_4 توسط سیتوکروم P450 برای تولید رادیکال CCl_3 (تری کلرومتیل) متابولیزه می‌شود. این رادیکال به سرعت با اکسیژن مولکولی واکنش داده و رادیکال OOCCL_3 (پراکسی تتراکلرومتیل) را تشکیل می‌دهد که هر دوی آن‌ها عامل اکسیداتیو بسیار قوی هستند. بنابراین استفاده از CCl_4 در مدل‌های حیوانی، درک مهمی در مورد مکانیسم‌های آسیب اکسیداتیو میوکارد و مداخلات درمانی بالقوه برای کاهش چنین آسیب‌هایی ارائه می‌دهد (۷، ۸).

مداخلات درمانی با هدف بهبود آسیب اکسیداتیو در مطالعات پیش بالینی و بالینی امیدوار کننده بوده و آنتی اکسیدان‌هایی مانند ویتامین E، کوآنزیم Q10 و

N-استیل سیستئین مورد بررسی قرار گرفته‌اند. اگر چه کارایی آن‌ها تا حدودی قابل قبول بوده است، با این حال، مطالعات برای یافتن سایر ترکیبات آنتی اکسیدان با اثرات قوی‌تر و موثرتر هم‌چنان ادامه دارد (۹-۱۱).

لینالول، یک الکل مونوترپن می‌باشد که در طبیعت وجود دارد و یک جزء مهمی از اسانس‌های گیاهان معطر مختلف از جمله اسطوخودوس، گشنیز و ریحان است (۱۲). این ماده به دلیل رایحه دلپذیرش شناخته شده و معمولاً در عطرها، لوازم آرایشی و به عنوان طعم دهنده غذا استفاده می‌شود. لینالول علاوه بر خواص معطر، توجه قابل توجهی را در تحقیقات علمی به دلیل فعالیت آنتی اکسیدانی به خود جلب کرده است (۱۳، ۱۴). توانایی آن در از بین بردن رادیکال‌های آزاد، کاهش استرس اکسیداتیو و محافظت در برابر آسیب اکسیداتیو، آن را به یک ترکیب امیدوار کننده برای کاربردهای درمانی، به ویژه در شرایطی که استرس اکسیداتیو موجب آسیب در بافت‌های مختلف می‌شود، تبدیل می‌کند.

بنابراین، با توجه به خواص آنتی اکسیدانی لینالول، هدف از این مطالعه بررسی اثرات محافظتی این ماده در جلوگیری از آسیب اکسیداتیو القا شده توسط CCl_4 در موش صحرایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و کیت‌ها

استات سدیم، سولفات آهن، کلرید آهن، متانول، اتانول، بوتانول، پراکسید هیدروژن، اسید کلریدریک، کلروفریک، اسید تیوباربتوریک، کوماسی بلو، آلبومین سرم گاوی و لینالول از شرکت مرک (Merck) (آلمان) خریداری شد. ماده شیمیایی TPTZ (2,4,6-tripyrindyl-s-triazine)، سدیم مونو هیدروژن فسفات و مونو سدیم دی هیدروژن از شرکت فلوکا (Fluka) (هلند) تهیه شدند. کیت‌های تجاری برای سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتیون پراکسیداز (GPX) از کمپانی Zell bio (آلمان) و ماده کتامین از شرکت آلفاسان (هلند) خریداری شدند.

طراحی مطالعه

در این مطالعه تجربی، تعداد ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن حدود هشت هفته از مرکز تحقیقات و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده داروسازی ارومیه خریداری و جهت تطبیق با شرایط و محیط جدید به مدت دو هفته بدن هیچ مداخله تحقیقاتی در حیوان خانه دانشکده پزشکی در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد با چرخه نور/ تاریکی ۱۲ ساعت و در بستری از پوشال نگهداری شدند تا وزن آن‌ها به ۱۸۰ الی ۲۰۰ گرم برسد. این تحقیق از نظر رعایت موازین اخلاقی، مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اردبیل بوده و دارای کد اخلاق IR.ARUMS.AEC.1403.020 است.

گروه بندی حیوانات

موش‌های صحرایی، به طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی به صورت، گروه کنترل نرمال (NC)، دریافت نیم میلی لیتر بر کیلو گرم سرم فیزیولوژی به مدت ۱۴ روز متوالی + ۱ میلی لیتر بر کیلو گرم، روغن زیتون از طریق تزریق داخل صفاقی (IP) (Intraperitoneal) در روز چهاردهم، گروه کنترل لینالول (Lin)، دریافت ۲۵ میلی گرم بر کیلو گرم لینالول به مدت ۱۴ روز متوالی + ۱ میلی لیتر بر کیلو گرم روغن زیتون به صورت IP در روز چهاردهم، گروه آسیب (CCl₄)، دریافت نیم میلی لیتر سرم فیزیولوژی به مدت ۱۴ روز متوالی + نیم میلی لیتر بر کیلو گرم تتراکلید کربن به صورت IP در روز چهاردهم و گروه پیش درمان (Lin + CCl₄)، دریافت ۲۵ میلی گرم بر کیلو گرم لینالول از طریق داخل صفاقی مدت ۱۴ روز + نیم میلی لیتر بر کیلو گرم، تتراکلید کربن به صورت IP در روز چهاردهم، تقسیم شدند. از روغن زیتون به عنوان حلالی بی خطر و قابل دسترس برای حل کردن تتراکلید کربن استفاده شد (۸). ۴۸ ساعت بعد از تزریق نهایی، رت‌ها با مخلوط ۹۰ میلی گرم کتامین و ۱۰ میلی گرم زایلازین بیهوش شدند. عمق بیهوشی با آزمون فقدان رفلکس پلک زدن و پاسخ به محرک دردناک

(فشاردن پنجه پا) تأیید گردید. سپس خونگیری از بطن چپ قلب انجام گرفت و پس از یوتانازی (توراکوتومی و قطع عروق بزرگ قلبی)، بافت قلب موش‌ها جهت انجام آنالیزهای بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیک برداشته شد. مراحل یوتانازی طبق دستورالعمل (AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition) AVMA 2020 انجام گرفت. حدود ۱۲ ساعت قبل از هر آزمایش مواد غذایی از دسترس حیوانات خارج گردید تا قند خون و دیگر فاکتورهای خونی به سطح پایدار برسند و فقط آب در اختیار حیوانات قرار داشت.

تهیه لیزات بافتی

ابتدا ۲۰۰ میلی گرم از برش‌های بافت قلب در ۲ میلی لیتر محلول بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH = 7.4)، با استفاده از دستگاه هموژنایز (Heidolph Silent Crusher MD-91126) مخلوط شد. سپس سوسپانسیون حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد تا سلول‌های هموژن نشده رسوب کنند. مایع رویی جمع آوری شد و برای اندازه گیری فاکتورهای بیوشیمیایی استفاده گردید (۱۵).

سنجش غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA)

میزان پراکسیداسیون لیپیدی بافت قلب با اندازه گیری MDA طبق روش Uchiyama & Mihara با تغییرات جزئی همان‌طور که در مطالعات مشابه قبلی توضیح داده شده است، انجام شد. در این روش، MDA با تیوباربتوریک اسید (TBA) واکنش داده و کمپلکس رنگی تولید می‌کند که شدت آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده می‌شود و غلظت MDA بر اساس منحنی استاندارد محاسبه گردید (۸، ۱۶).

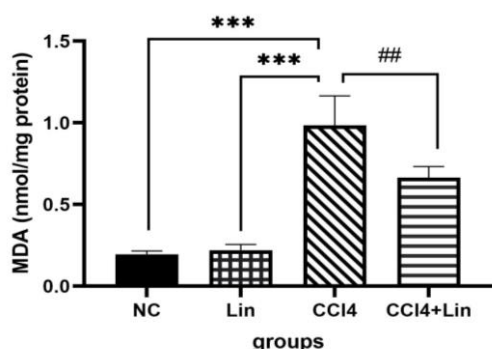
سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (TAC)

تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی تام به روش FRAP که مبتنی بر احیا Fe³⁺ به Fe²⁺ در حضور TPTZ انجام

یافته‌ها

اثر لینالول بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی

مقایسه MDA بافت قلب گروه کنترل نرمال و گروه کنترل لینالول با گروه آسیب دیده توسط CCl_4 نشان دهنده افزایش معنی دار ($P < 0.001$) سطح MDA پس از القای استرس اکسیداتیو بود. با این حال، پیش درمان با لینالول، میزان پراکسیداسیون لیپیدی را به طور قابل توجهی ($P < 0.001$) نسبت به گروه آسیب کاهش داد (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: اثر پیش درمان با لینالول بر روی میزان MDA بافت قلب در گروه‌های مورد مطالعه، اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده‌اند ($n = 6$). ***: نشان دهنده معنادار بودن ($P < 0.001$) گروه کنترل آسیب نسبت به گروه کنترل نرمال و کنترل لینالول، ##: نشان دهنده معنی دار بودن ($P < 0.001$) گروه پیش درمان با لینالول نسبت به گروه آسیب. (NC: گروه کنترل نرمال، Lin: گروه کنترل لینالول، CCl_4 : گروه کنترل آسیب با تراکلرید کربن، CCl_4 +Lin: گروه پیش درمان با لینالول. MDA: مالون دی آلدهید)

اثر لینالول بر میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (TAC)

طبق نتایج مقایسه میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدانی بافت قلبی در گروه آسیب دیده با CCl_4 با کنترل نرمال و کنترل لینالول نشان دهنده کاهش معنی دار ($P < 0.001$) در ظرفیت تام آنتی اکسیدانی پس از القای آسیب است. هم چنین نتایج نشان می دهد که پیش درمان با لینالول توانسته است به طور قابل توجهی ($P < 0.001$) از این کاهش جلوگیری کند (نمودار شماره ۲).

گردید. در این روش، آنتی اکسیدان‌های موجود در نمونه، آهن فریک (Fe^{3+}) را به فروس (Fe^{2+}) احیا کرده و در حضور TPTZ کمپلکس آبی رنگی ایجاد می شود. شدت رنگ ایجاد شده در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه گیری می شود (۱۷).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

طبق روش Aebi و مشابه با مطالعات قبلی انجام گرفت و فعالیت آنزیم کاتالاز سنجیده شد. در این روش نیز، تجزیه هیدروژن پراکسید (H_2O_2) توسط کاتالاز بررسی می شود. کاهش جذب نوری در طول موج ۲۴۰ نانومتر ناشی از احیا H_2O_2 هر ۱۵ ثانیه به مدت ۲ دقیقه ثبت شد و به عنوان میزان فعالیت آنزیم گزارش گردید (۱۸، ۱۹).

سنجش فعالیت آنزیم‌های گلوکوتاتیون پراکسیداز و

سوپراکسید دیسموتاز (SOD و GPx)

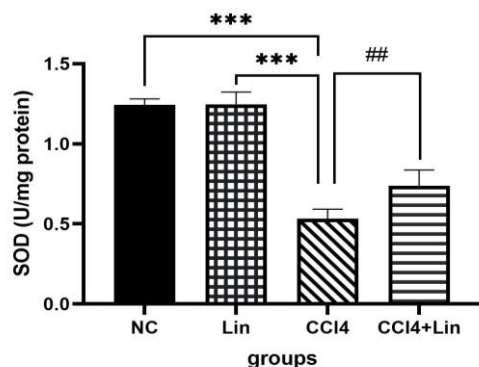
فعالیت آنزیم‌های SOD و GPx با استفاده از کیت شرکت Zellbio و مطابق با دستورالعمل کیت اندازه گیری شد.

مطالعات هیستوپاتولوژیکی

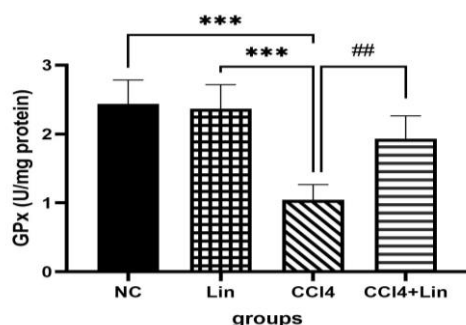
نمونه‌های بافت بطن چپ قلب از حیوانات مورد مطالعه تهیه و برش‌های بافت قلب ۴-۵ میکرومتری به دست آمده از میکروتوم در محلول فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند و در پس از طی مراحل پاساژ بافتی در پارافین قالب گیری شدند. برای تهیه اسلایدها از پردازشگر بافت DS 2080/H استفاده شد. بعد از تهیه مقاطع طولی و عرضی از نمونه‌ها و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E)، تغییرات بافتی گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از میکروسکوپ نوری CX21FS1 Olympus مورد ارزیابی قرار گرفت.

داده‌های اولیه به دست آمده با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism V9.0 آنالیز شدند. برای آنالیز آماری از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند. سطح معنی داری $P < 0.05$ تعیین گردید.

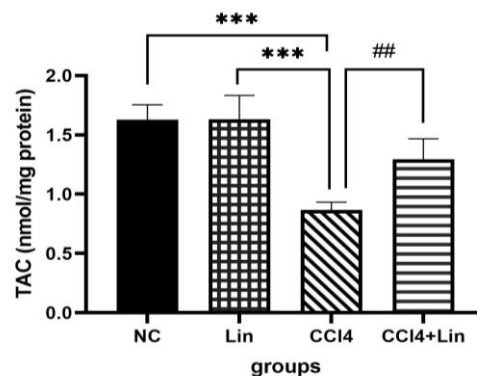
کنترل لینالول، # نشان دهنده معنی دار بودن ($P < 0.05$) گروه پیش درمان با لینالول نسبت به گروه آسیب (NC: گروه کنترل نرمال، Lin: گروه کنترل لینالول، CCl₄: گروه کنترل آسیب با تتراکلرید کربن، CCl₄+Lin: گروه پیش درمان با لینالول. CAT: کاتالاز)



نمودار شماره ۴: اثر پیش درمان با لینالول بر روی میزان فعالیت آنزیم SOD بافت قلب در گروه‌های مورد مطالعه، اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده‌اند ($n = 6$). ***: نشان دهنده معنی دار بودن ($P < 0.001$) گروه کنترل آسیب نسبت به گروه کنترل نرمال و کنترل لینالول، ## نشان دهنده معنی دار بودن ($P < 0.01$) گروه پیش درمان با لینالول نسبت به گروه آسیب. (NC: گروه کنترل نرمال، Lin: گروه کنترل لینالول، CCl₄: گروه کنترل آسیب با تتراکلرید کربن، CCl₄+Lin: گروه پیش درمان با لینالول، سوپراکسید دیسموتاز: SOD)



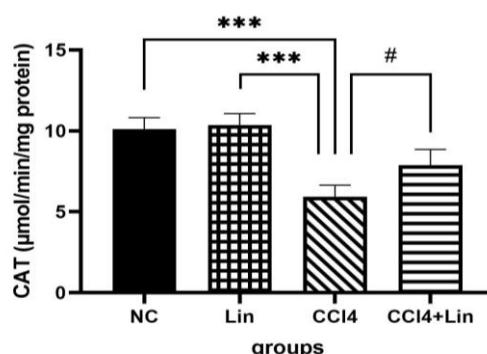
نمودار شماره ۵: اثر پیش درمان با لینالول بر روی میزان فعالیت آنزیم GPx بافت قلب در گروه‌های مورد مطالعه، اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده‌اند ($n = 6$). ***: نشان دهنده معنی دار بودن ($P < 0.001$) گروه کنترل آسیب نسبت به گروه کنترل نرمال و کنترل لینالول، ## نشان دهنده معنی دار بودن ($P < 0.01$) گروه پیش درمان با لینالول نسبت به گروه آسیب. (NC: گروه کنترل نرمال، Lin: گروه کنترل لینالول، CCl₄: گروه کنترل آسیب با تتراکلرید کربن، CCl₄+Lin: گروه پیش درمان با لینالول، گلوکاتایون پراکسیداز: GPx)



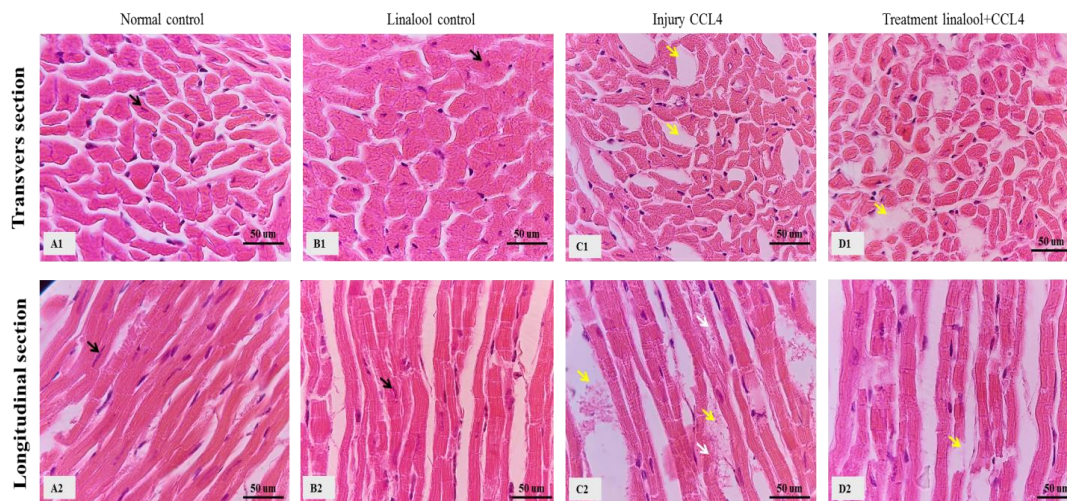
نمودار شماره ۲: اثر پیش درمان با لینالول بر روی میزان TAC بافت قلب در گروه‌های مورد مطالعه، اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده‌اند ($n = 6$). ***: نشان دهنده معنی دار بودن ($P < 0.001$) گروه کنترل آسیب نسبت به گروه کنترل نرمال و کنترل لینالول، ## نشان دهنده معنی دار بودن ($P < 0.01$) گروه پیش درمان با لینالول نسبت به گروه آسیب. (NC: گروه کنترل نرمال، Lin: گروه کنترل لینالول، CCl₄: گروه کنترل آسیب با تتراکلرید کربن، CCl₄+Lin: گروه پیش درمان با لینالول. TAC: ظرفیت آنتی اکسیدانی تام)

اثر لینالول بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (CAT، SOD، و GPx)

تزریق CCl₄ سبب کاهش معنی دار ($P < 0.001$) فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (CAT، SOD، و GPx) بافت قلب نسبت به گروه کنترل نرمال و کنترل لینالول شد. پیش درمان با لینالول توانست به صورت معنی داری ($P < 0.05$) فعالیت این آنزیم‌ها را افزایش دهد (نمودار شماره ۳، نمودار شماره ۴ و نمودار شماره ۵).



نمودار شماره ۳: اثر پیش درمان با لینالول بر روی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بافت قلب در گروه‌های مورد مطالعه، اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده‌اند ($n = 6$). ***: نشان دهنده معنی دار بودن ($P < 0.001$) گروه کنترل آسیب نسبت به گروه کنترل نرمال و کنترل لینالول، # نشان دهنده معنی دار بودن ($P < 0.05$) گروه پیش درمان با لینالول نسبت به گروه آسیب.



تصویر شماره ۱: فتومیکروگراف برش‌های بطن چپ قلب موش صحرایی (رنگ آمیزی H&E)، تصاویر (A2، A1) گروه کنترل نرمال، (B2، B1) گروه کنترل لینالول نشان داد که الیاف میوکارد به طور منظم با خطوط واضح با هسته‌های تاولی بیضی شکل (فلش‌های سیاه) و بدون انحطاط ظاهری مرتب شده‌اند. تصاویر (C2، C1) گروه CCL₄، میوسیت‌های دژنره شده متوسط (پیکان سفید) را با از دست دادن خفیف میوفیبریل‌های سیتوپلاسمی و افزایش سلولی به دلیل نفوذ سلول‌های التهابی شامل نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها با فضای داخل عضلانی ادماتوز مشخص (فضای پیکان زرد) نشان دادند. تصاویر (D2، D1) گروه پیش درمان با لینالول، محافظت قابل توجهی در برابر آسیب میوکارد نشان داد. لینالول نکروز و ادم ناشی از CCL₄ را کاهش می‌دهد. بزرگنمایی همه تصاویر: ۱۰۰۰X (CCL₄: تراکلرید کربن)

نتایج هیستوپاتولوژیکی

یافته‌های هیستوپاتولوژیکی مربوط به گروه‌های مورد آزمایش در تصاویر به‌دست آمده از نمونه‌های بطن چپ قلب در تصویر شماره ۱، ارائه شده است. رنگ آمیزی مقاطع بافتی قلب موش‌های صحرایی گروه‌های کنترل نرمال و کنترل لینالول نشان دهنده وجود آرایش منظمی از فاسیکل‌های سلول‌های کوتاه منشعب با سیتوپلاسم اسیدوفیل و مخطط و هسته مرکزی بازوفیل است؛ ضمن این‌که هیچ‌گونه آشفته‌گی بافتی و یا فضای خالی حاصل از تخریب یا نکروز سلولی در آن رؤیت نمی‌شود. در گروه آسیب با CCL₄ علائم تخریب بافتی همراه با جداشدگی (detachment) سلول‌ها از هم در تصاویر مشهود است، سلول‌ها حجیم (hypertrophy) شده، خطوط عرضی منظمی (striation) در آن‌ها مشاهده نمی‌شود و فضاهای بین سلولی وسیعی (edematous intramuscular space) در بین آن‌ها وجود دارد. از طرفی، وجود هسته‌های فراوان در این فضاهای بین بافتی نشان از ارتشاح (infiltration) سلول‌هایی مثل نوتروفیل و لنفوسیت و ایجاد التهاب است.

بحث

براساس این مطالعه لینالول یک اثر محافظتی در برابر آسیب اکسیداتیو میوکارد ناشی از CCL₄ در موش‌های صحرایی ایجاد می‌کند که نشان دهنده توانایی لینالول برای کاهش استرس اکسیداتیو، افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و حفظ یکپارچگی بافت میوکارد است.

در این مطالعه نشان داده شده که تجویز CCL₄ سبب افزایش قابل توجه MDA در بافت قلب موش‌های آسیب دیده شد. در واقع MDA یک ترکیب آلی بسیار واکنش‌پذیر است که به طور گسترده به عنوان یک نشانگر

زیستی برای استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در سیستم‌های بیولوژیکی شناخته شده است (۲۰). MDA به عنوان یک محصول جانبی از تخریب اکسیداتیو اسیدهای چرب اشباع نشده چندگانه (PUFAs) که مستعد حمله رادیکال‌های آزاد هستند، تولید می‌شود. اندازه‌گیری سطح MDA معمولاً در تحقیقات زیست پزشکی برای ارزیابی میزان آسیب اکسیداتیو در بافت‌ها، سلول‌ها و مایعات بدن استفاده می‌شود (۲۱). بنابراین افزایش MDA نشان داد که تجویز CCl_4 سبب آسیب اکسیداتیو در بافت قلب شده است که این نتایج مشابه با نتایج مطالعات مشابه می‌باشد که در آن‌ها نیز CCl_4 سبب افزایش MDA بافت قلبی در موش‌های آسیب دیده شده بود (۲۲، ۲۳). با این حال، پیش درمان با لینالول به طور قابل توجهی میزان MDA را کاهش داد، که نشان دهنده خواص آنتی‌اکسیدانی قوی آن در کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و محافظت از سلول‌های میوکارد از آسیب اکسیداتیو بوده و با توانایی شناخته شده لینالول، برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد و تثبیت غشاهای سلولی مطابقت دارد. این نتایج با مطالعه ای که در آن لینالول میزان MDA را در کبد موش‌های آسیب دیده با CCl_4 کاهش داد، همسویی دارد (۲۴).

برای بررسی بیش تر تاثیر لینالول در جلوگیری از آسیب اکسیداتیو، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) بافت قلب اندازه‌گیری شد. TAC به توانایی تجمعی همه آنتی‌اکسیدان‌های موجود در یک سیستم بیولوژیکی، برای خنثی کردن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و سایر رادیکال‌های آزاد اشاره دارد (۲۵). آنتی‌اکسیدان‌ها شامل مولکول‌های آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، و گلوکاتایون پراکسیداز و همچنین ترکیبات غیر آنزیمی هستند (۲۶). TAC یک پارامتر حیاتی در ارزیابی مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدانی تام بافت‌ها است و منعکس کننده توانایی آن‌ها برای مقابله با استرس اکسیداتیو می‌باشد که در پاتوژن بیماری‌های متعدد از جمله اختلالات قلبی عروقی نقش دارد (۲۷). TAC به

طور قابل توجهی در گروه آسیب دیده با CCl_4 کاهش یافت که نشان دهنده ناتوانی و کاهش آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زا به دلیل استرس اکسیداتیو است. اندازه‌گیری TAC در بافت‌ها یک ارزیابی جامع از تعادل اکسیداسیون و احیا، که برای حفظ هموستاز سلولی ضروری است را فراهم می‌کند. استرس اکسیداتیو زمانی رخ می‌دهد که تولید ROS از ظرفیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی فراتر رود و منجر به آسیب به لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA شود. بافت‌های با TAC بالا برای کاهش این آسیب مجهزتر هستند و در نتیجه یکپارچگی و عملکرد سلولی را حفظ می‌کنند (۲۰). همان‌طور که در این مطالعه نیز نشان داده شد، پیش درمان با لینالول به طور موثری سبب افزایش TAC شد، که نشان دهنده نقش آن در تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی تام است. این یافته بر پتانسیل لینالول برای مقابله با عدم تعادل بین تولید ROS و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، یک عامل کلیدی در پاتوژن آسیب بافتی مرتبط با استرس اکسیداتیو، تاکید می‌کند.

علاوه بر این، قرار گرفتن در معرض CCl_4 منجر به کاهش قابل توجهی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کلیدی، از جمله کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) شد، که همسو با نتایج مطالعات مشابه است (۳۰-۲۸). این آنزیم‌ها نقش مهمی در خنثی کردن ROS و حفظ هموستاز ردوکس سلولی دارند. پیش درمان با لینالول به طور قابل توجهی فعالیت این آنزیم‌ها را بازسازی کرد، که می‌تواند دلیل دیگری بر اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظتی قلبی در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از سموم باشد. همان‌طور که مطالعات دیگر، این اثر لینالول در جلوگیری از کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ناشی از CCl_4 را تایید کردند (۲۴، ۳۳-۳۱).

بررسی هیستوپاتولوژیک شواهد بیش تری از اثرات محافظتی لینالول ارائه کرد. گروه آسیب دیده با CCl_4 ، اختلال شدید بافت میوکارد، از جمله هیپرتروفی سلولی،

از دست دادن خطوط عرضی منظم، فضاهاى بین سلولى ادماتیک و ارتشاح سلولى التهابی را نشان دادند که نشان دهنده نکروز و التهاب است. علاوه بر این، افزایش بافت همبند بینابینی حاوی ادم بین کاردیومیوسیت‌ها در گروه CCl_4 مشاهده شد. در مطالعات مشابه نیز نتایجی همسو به دست آمده است. به عنوان مثال، در مطالعه‌ای که اثرات محافظتی دکسپانتنول در سمیت قلبی ناشی از CCl_4 بررسی شده بود، نشان داد که این ماده سمی سبب آسیب بافت میوکارد با حضور کاردیومیوسیت‌های به شدت دژنراتیو (خطوط نامشخص و سیتوپلاسم هیپرانوزینوفیلیک) شد (۴). پیش درمان با لینالول سبب حفظ ساختار میوکارد شد، ادم سلولى را کاهش داد و نفوذ سلول‌های التهابی را به حداقل رساند و توانایی آن را در کاهش آسیب بافتی و ارتقای بهبود ساختاری نشان داد و این داده‌ها، مشابه با نتایج مطالعه محققانی بود که به بررسی اثرات محافظتی α -پنین در برابر آسیب قلبی ناشی از CCl_4 پرداخته بودند، آن‌ها در مطالعه‌شان نشان دادند که α -پنین یک مونوترپین طبیعی است که سبب جلوگیری از تغییرات هیستولوژیکی در بافت قلب موش‌های آسیب با CCl_4 می‌شود (۳۴). این یافته‌ها با نتایج بیوشیمیایی سازگار بود و این تصور را تقویت می‌کرد که لینالول استرس اکسیداتیو و پیامدهای پاتولوژیک پایین دست آن را کاهش می‌دهد.

اثرات محافظتی قلبی مشاهده شده لینالول را می‌توان به مکانیسم‌های عملکرد چند وجهی آن، از جمله مهار رادیکال‌های آزاد، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و خواص ضد التهابی نسبت داد. این مکانیسم‌ها در مجموع به حفظ یکپارچگی و عملکرد سلولى در شرایط استرس اکسیداتیو کمک می‌کنند.

در نتیجه، این مطالعه نشان داد که لینالول با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و حفظ ساختار بافت قلب، به طور موثر در برابر آسیب اکسیداتیو میوکارد ناشی از CCl_4 محافظت می‌کند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که لینالول می‌تواند یک عامل درمانی امیدوار کننده برای پیشگیری و درمان اختلالات قلبی عروقی مرتبط با استرس اکسیداتیو باشد. مطالعات بیش تر برای روشن کردن مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی اثرات محافظتی قلبی لینالول و کشف کاربردهای بالقوه بالینی آن ضروری است.

سپاسگزاری

از کارشناسان آزمایشگاه بیوشیمی بالینی و آزمایشگاه مرکزی و نیز از کمیته تحقیقات و فناوری دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل که با حمایت‌های مادی و معنوی خود، در جهت پیشبرد این طرح یاری کرده‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. D'Oria R, Schipani R, Leonardini A, Natalicchio A, Perrini S, Cignarelli A, et al. The role of oxidative stress in cardiac disease: from physiological response to injury factor. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020(1): 5732956. PMID: 32509147.
2. Gaziano TA. Cardiovascular diseases worldwide. *Public Health Approach Cardiovasc Dis Prev Manag* 2022; 1: 8-18. PMID: 16330695.
3. de Lima EP, Moretti Jr RC, Torres Pomini K, Laurindo LF, Sloan KP, Sloan LA, et al. Glycolipid metabolic disorders, metainflammation, oxidative stress, and cardiovascular diseases: unraveling pathways. *Biology* 2024; 13(7): 519. PMID: 39056712.
4. Martinez CS, Zheng A, Xiao Q. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Dysregulation in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: A Fraction of

- the hole. *Antioxidants* 2024; 13(11): 1330. PMID: 39594472.
5. Dikalov SI, Gutor S, Dikalova AE. Pathological mechanisms of cigarette smoking, dietary, and sedentary lifestyle risks in vascular dysfunction: mitochondria as a common target of risk factors. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2023; 475(7): 857-866. PMID: 36995495.
 6. Unsal V, Cicek M, Sabancilar İ. Toxicity of carbon tetrachloride, free radicals and role of antioxidants. *Rev Environ Health* 2021; 36(2): 279-295. PMID: 32970608.
 7. Dini S, Singh S, Fatemi F. The Hepatoprotective Possessions of Specific Iranian Medicinal Plants. *J Food Biochem* 2024; 2024(1): 8783113.
 8. Ojarudi M, Moradi A, Hajihosseini R, Mazani M, Rezagholizadeh L. Hepatoprotective and Antioxidant Activities of Combination of *Cinnamomum zeylanicum* and *Zingiber officinale* in CCl₄-intoxicated Rats. *J Kerman Univ Med Sci* 2020; 27(1): 1-13.
 9. Li C-Y, Lin W-C, Moonmanee T, Chan JP-W, Wang C-K. The protective role of vitamin E against oxidative stress and immunosuppression induced by non-esterified fatty acids in bovine peripheral blood leukocytes. *Animals* 2024; 14(7): 1079. PMID: 38612319.
 10. Li X, Zou J, Lin A, Chi J, Hao H, Chen H, et al. Oxidative stress, endothelial dysfunction, and N-acetylcysteine in type 2 diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 2024; 40(16-18): 968-989. PMID: 38497734.
 11. Shah FA, Bukhari SMS, Emal E, Shah M. Effects of integrative administration of acetyl-L-carnitine, arginine, and Co-Q10 in mitigating oxidative stress in over-weight/obese PCOS women. *J Appl Pharm Sci* 2025.
 12. An Q, Ren J-N, Li X, Fan G, Qu S-S, Song Y, et al. Recent updates on bioactive properties of linalool. *Food Funct* 2021; 12(21): 10370-10389.
 13. Mączka W, Duda-Madej A, Grabarczyk M, Wińska K. Natural compounds in the battle against microorganisms—Linalool. *Molecules* 2022; 27(20): 6928. PMID: 36296521.
 14. dos Santos ÉR, Maia JGS, Fontes-Júnior EA, do Socorro Ferraz Maia C. Linalool as a therapeutic and medicinal tool in depression treatment: a review. *Curr Neuropharmacol* 2022; 20(6): 1073-1092. PMID: 34544345.
 15. Aidoo DB, Konja D, Henneh IT, Ekor M. Protective effect of bergapten against human erythrocyte hemolysis and protein denaturation in vitro. *Int J Inflamm* 2021; 2021(1): 1279359. PMID: 34970434.
 16. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978; 86(1): 271-278. PMID: 655387.
 17. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239(1): 70-76.
 18. Aebi H. [13] Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126. PMID: 6727660.
 19. Rezagholizadeh L, Ojarudi M, Moradi A, Salimnejad R, Khonakdar-Tarsi A, Matin S, et al. Protective effects of *Cinnamomum zeylanicum* and *Zingiber officinale* extract against CCl₄-induced acute kidney injury in rats. *Physiol Pharmacol* 2022; 26(2): 158-167. PMID: 30551486.
 20. Demirci-Çekiç S, Özkan G, Avan AN, Uzunboy S, Çapanoğlu E, Apak R. Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense. *J Pharm Biomed Anal* 2022; 209: 114477. PMID: 34920302.

21. Bahrami M, Sobhi P, Mahdizadeh F, Rahimi S, Khodaei L, Ojarudi M, et al. Examining Effects of Metformin and Coenzyme Q10 on Doxorubicin- Induced Oxidative Hepatotoxicity in Rats. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2024; 34(233): 1-14.
22. Hamed H, Gargouri M, Bellassoued K, Ghannoudi Z, Elfeki A, Gargouri A. Cardiopreventive effects of camel milk against carbon tetrachloride induced oxidative stress, biochemical and histological alterations in mice. *Arch Physiol Biochem* 2018; 124(3): 253-260. PMID: 29108440.
23. Yildiz A, Demiralp T, Vardi N, Otlı G, Taslidere E, Cirik H, et al. Protective effects of dexpanthenol in carbon tetrachloride-induced myocardial toxicity in rats. *Tissue Cell* 2022; 77. PMID: 35653907.
24. Mazani M, Rezagholizadeh L, Shamsi S, Mahdavi S, Ojarudi M, Salimnejad R, et al. Protection of CCl₄-induced hepatic and renal damage by linalool. *Drug Chem Toxicol* 2022; 45(3): 963-971. PMID: 32657163.
25. Miliaraki M, Briassoulis P, Ilia S, Michalakakou K, Karakonstantakis T, Polonifi A, et al. Oxidant/antioxidant status is impaired in sepsis and is related to anti-apoptotic, inflammatory, and innate immunity alterations. *Antioxidants* 2022; 11(2): 231. PMID: 35204114.
26. Irato P, Santovito G. Enzymatic and Non-Enzymatic Molecules with Antioxidant Function. *Antioxidants* 2021; 10(4): 579. PMID: 33918542.
27. Vona R, Gambardella L, Cittadini C, Straface E, Pietraforte D. Biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome and associated diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019(1): 8267234. PMID: 31191805.
28. Mazani M, Mahmoodzadeh Y, Rezagholizadeh L. The protective effects of Tanacetum parthenium extract on CCl₄-induced myocardium injury in rats. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci* 2018; 23(2): 70-80.
29. Mitra SK, Venkataranganna MV, Sundaram R, Gopumadhavan S. Antioxidant activity of AO-8, a herbal formulation in vitro and in vivo experimental models. *Phytother Res* 1999; 13(4): 300-303. PMID: 10404535.
30. Naik SR, Thakare VN, Patil SR. Protective effect of curcumin on experimentally induced inflammation, hepatotoxicity and cardiotoxicity in rats: Evidence of its antioxidant property. *Exp Toxicol Pathol* 2011; 63(5): 419-431. PMID: 20363603.
31. Altınok-Yipel F, Tekeli İO, Özsoy ŞY, Güvenç M, Kaya A, Yipel M. Hepatoprotective activity of linalool in rats against liver injury induced by carbon tetrachloride. *Int J Vitam Nutr Res* 2019. PMID: 30932786.
32. Hsouna AB, Sadaka C, Beyrouthy ME, Hfaiedh M, Dhifi W, Brini F, et al. Immunomodulatory effect of Linalool (Lin) against CCl₄-induced hepatotoxicity and oxidative damage in rats. *Biotechnol Appl Biochem* 2023; 70(1): 469-477. PMID: 35748559.
33. Szymonik-Lesiuk S, Czechowska G, Stryjecka-Zimmer M, Słomka M, Mądro A, Celiński K, et al. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J Hepato-Biliary-Pancreat Surg* 2003; 10(4): 309-315. PMID: 14598152.
34. Alqudah A, Qnais E, Gammoh O, Bseiso Y, Wedyan M. Protective effects of α -Pinene against carbon tetrachloride-induced cardiac injury in Wistar rats: modulation of antioxidant and inflammatory responses. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2024. PMID: 39298016.