



اثر محافظتی ژل رویال بر بافت کبد موش‌های صحرایی ماده بالغ تحت تیمار با نیکوتین

ژیلا خدابنده*^۱، وحید نجاتی^۲، غلامرضا نجفی^۲، علی شالیزار جلالی^۴، فاطمه رحمانی^۲

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
 ۲- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
 ۳- دانشیار، گروه آناتومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
 ۴- استادیار، گروه بافت شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده	مقاله پژوهشی اصیل
<p>مقدمه</p> <p>نیکوتین یک ترکیب آلی نیتروژن دار و ماده موثر موجود در سیگار می‌باشد. این ماده برای دستگاه‌های قلبی-عروقی، تنفسی و بافت‌های مختلف بدن سمی است. در مطالعه حاضر نقش حفاظتی ژل رویال به عنوان آنتی‌اکسیدان بر تغییرات بافتی و آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از نیکوتین مورد بررسی قرار گرفت.</p> <p>مواد و روش‌ها</p> <p>در مطالعه حاضر از ۵۶ سر موش صحرایی ماده بالغ استفاده شد که به ۸ گروه ۷ تایی شامل گروه ۱: شاهد، گروه ۲، ۳ و ۴: به ترتیب دریافت کننده نیکوتین به میزان ۰/۵، ۱ و ۲ mg/kg و ۲ وزن بدن، گروه ۵: دریافت کننده ژل رویال به میزان ۱۰۰ mg/kg و ۱۰۰ وزن بدن، گروه ۶، ۷ و ۸: به ترتیب دریافت کننده نیکوتین به میزان ۰/۵، ۱ و ۲ mg/kg و ۲ وزن بدن به همراه ژل رویال به میزان ۱۰۰ mg/kg و ۱۰۰ وزن بدن. نیکوتین و ژل رویال روزانه به مدت ۴۹ روز به ترتیب به صورت داخل صفاقی و خوراکی در گروه‌های آزمایشی تجویز شدند. پس از اتمام دوره تیمار، نمونه‌های سرمی و بافتی جمع آوری و برای مطالعات سرمی و بافت‌شناسی مورد استفاده قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و توکی در نرم‌افزار SPSS مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند.</p> <p>یافته‌ها</p> <p>ژل رویال تنش اکسیداتیو و سطوح سرمی آسپاراتات آمینو ترانسفراز، آلانین آمینو ترانسفراز و آلکالین فسفاتاز و همچنین آسیب‌های بافت کبدی را در گروه‌های تحت تیمار با نیکوتین بهبود بخشید.</p> <p>نتیجه‌گیری</p> <p>ژل رویال می‌تواند اثر حفاظتی بر بافت کبدی موش‌های صحرایی تحت تیمار با نیکوتین داشته باشد.</p> <p>کلیدواژه‌ها</p> <p>نیکوتین، کبد، ژل رویال، موش صحرایی</p>	<p>تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۷</p> <p>تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۲</p> <p>*نویسنده مسئول: ژیلا خدابنده، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران تلفن: پست الکترونیک: Khodabandeh.Zhila@yahoo.com</p>



مقدمه

نیکوتین یکی از چندین آلكالوئید فعال طبیعی است که بیشتر در گیاهانی مانند تنباکو یافت می‌شود (۱) و هنگام استنشاق در طی سیگار کشیدن به سرعت در سیستم گردش خون جذب می‌شود که بیش از ۸۰٪ آن در کبد متابولیزه می‌شود (۲). نیکوتین دارای اثرات جانبی قابل توجهی در دستگاه گوارش می‌باشد و در تاخیر روند بهبود زخم‌های گوارشی در افراد سیگاری نقش بارزی ایفا می‌کند (۳). نیکوتین همچنین موجب افزایش رها شدن اسیدهای چرب آزاد از کبد و سنتز کبدی لیپوپروتئین‌های بسیار کم چگالی می‌شود (۴). گزارش شده است که مصرف نیکوتین در غلظت مشابه با افرادی که سیگار دریافت می‌کردند موجب آسیب‌های کبدی می‌شود. از سوی دیگر، مشخص شده است که نیکوتین موجب ایجاد تنش اکسیداتیو در محیط آزمایشگاه و محیط بدن می‌شود (۵). افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و سطوح پراکسیداسیون لیپیدی دریافت معده موش‌های صحرایی (۶) و نیز افزایش پراکسیداسیون لیپید در سلول‌های تخمدان همستر چینی که با نیکوتین انکوبه شده بود گزارش شده است (۷).

شواهد متعددی از نقش تنش‌های اکسیداتیو در سمیت‌های ناشی از نیکوتین در اندام‌ها حکایت دارند (۸). دود سیگار باعث افزایش قابل توجه تنش اکسیداتیو در قلب، کبد و ریه موش می‌شود (۹) و مصرف نیکوتین به طور قابل ملاحظه‌ای پراکسیداسیون لیپید در کبد را افزایش می‌دهد (۱۰).

بررسی‌های پیشین نشان داده است که مواد شیمیایی واکنش‌پذیر اسید تیوباربیتوریک و هیدروپراکسید در کبد، ریه و قلب موش‌های صحرایی تحت درمان با نیکوتین

افزایش و فعالیت ^۱CAT، سوپراکسیددیسموتاز و سطح گلوتاتیون کاهش می‌یابد (۱۱). آنتی‌اکسیدانت‌های اندوژن مانند گلوتاتیون، گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز ترکیباتی هستند که به عنوان مهارکننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند. آنتی‌اکسیدانت‌ها با رادیکال‌های آزاد واکنش نشان می‌دهند و تنش‌های اکسیداتیو را مهار نموده و مانع آسیب سلول‌ها می‌شوند (۱۲). در این رابطه اخیراً ژل رویال مورد توجه ویژه قرار گرفته است چرا که گزارشات عنوان کرده‌اند که این ماده یک آنتی‌اکسیدانت بسیار فعال و دارای ظرفیت بالای مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشد. ژل رویال ماده‌ای ژلاتینی است که از غدد زیرحلقی زنبوران عسل کارگر ترشح می‌شود و شامل بسیاری از ترکیبات مهم بافعالیت زیستی مانند اسیدآمینها، پروتئین، قندها، اسیدهای چرب، مواد معدنی و ویتامین‌ها است. نشان داده شده که ژل رویال واجد فعالیت‌های فارماکولوژیک متعدد مانند خواص ضد التهابی، ضد آماسی، ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد (۱۳ و ۱۴). بنابراین، ژل رویال با توجه به دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانتی و اثرات محافظت کبدی در راستای کاهش سمیت‌های کبدی ناشی از نیکوتین در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ۵۶ سر موش صحرایی ماده بالغ با میانگین وزنی 175 ± 3 g از مرکز پرورش حیوانات دانشکده علوم دانشگاه ارومیه به طور تصادفی انتخاب شد. موش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای 22 ± 2 °C با دسترسی آزاد به آب و غذای کافی به مدت یک هفته برای سازش با محیط آزمایشگاه در

¹ Catalase enzyme: CAT



سنجش میزان مالون دی آلدئید^۵ (MDA):

میزان پراکسیداسیون لیپیدها بر اساس تشکیل MDA تعیین می شود. MDA محصول نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب است و با تیوباربیتویک اسید وارد واکنش می شود و تولید مجموعه ای رنگی می نماید. اساس روش، اندازه گیری اسپکتروفوتومتریک رنگ ایجاد شده است. در این مطالعه سطوح پراکسیداسیون لیپیدها با استفاده از روش Cheeseman و Esterbauer اندازه گیری شد. جهت تهیه بافر فسفات، ۱/۵۰۴۰ سدیم دی هیدروژن فسفات به همراه ۲/۱۷۹۰ دی سدیم هیدروژن فسفات با ترازو وزن گردید و در یک بالن ۱۰۰ ریخته شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد. pH محلول، روی ۷/۴ تنظیم گردید. جهت تهیه محلول تری کلریک اسید، ۱۰۰ از ماده در یک بالن ۱۰۰ با آب مقطر به حجم رسانده شد. ۰/۶۷ از ماده تیوباربیتوریک اسید نیز در بالن ۱۰۰ به حجم رسانده شد. نمونه بافت کبد وزن گردید و ۱۰٪ وزن حجم به آن بافر فسفات اضافه گردید و در هاون کوبیده شد. سپس هموزن تهیه شده به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ۱۵۰ μ l از محلول رویی برداشته شد و به لوله آزمایش منتقل گردید سپس ۳۰۰ μ l تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ در دمای $^{\circ}C$ ۴ سانتریفیوژ گردید. سپس ۳۰۰ μ l از محلول رویی به لوله آزمایش منتقل و با ۳۰۰ μ l از تیوباربیتوریک اسید ۰/۶۷٪ در دمای $^{\circ}C$ ۱۰۰ برای ۲۵ دقیقه انکوبه شد. ۵ دقیقه پس از خنک شدن محلول، رنگ صورتی ناشی از MDA با تیوباربیتوریک اسید ظاهر و با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۵ nm ارزیابی گردید. میزان MDA به کمک ضریب

قفس های مخصوص نگهداری و سپس به طور مساوی به ۸ گروه ۷ تایی شامل گروه ۱: شاهد، گروه ۲: دریافت کننده نیکوتین به میزان ۰/۵ mg/kg وزن بدن، گروه ۳: دریافت کننده نیکوتین به میزان ۱ mg/kg وزن بدن، گروه ۴: دریافت کننده نیکوتین به میزان ۲ mg/kg وزن بدن، گروه ۵: دریافت کننده ژل رویال به میزان ۱۰۰ mg/kg وزن بدن، گروه ۶: دریافت کننده نیکوتین به میزان ۰/۵ mg/kg وزن بدن به همراه ژل رویال به میزان ۱۰۰ mg/kg وزن بدن، گروه ۷: دریافت کننده نیکوتین به میزان ۱ mg/kg وزن بدن به همراه ژل رویال به میزان ۱۰۰ mg/kg وزن بدن، گروه ۸: دریافت کننده نیکوتین به میزان ۲ mg/kg وزن بدن به همراه ژل رویال به میزان ۱۰۰ mg/kg وزن بدن تقسیم شدند. تجویز نیکوتین در گروه های آزمایشی به صورت داخل صفاقی و ژل رویال به صورت خوراکی روزانه به مدت ۴۹ روز صورت گرفت. در این تحقیق داروی نیکوتین از شرکت (Sigma-Aldrich, USA) و ژل رویال زنبور عسل نیز از مرکز تحقیقات کشاورزی استان آذربایجان غربی تهیه گردید.

خونگیری و ارزیابی فراسنجه های بیوشیمیایی

همه موش ها بعد از اتمام دوره ۴۹ روزه تیمار، بیهوش و خونگیری از قلب انجام شد. نمونه های خونی سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در ۱۵ دقیقه) شدند و نمونه های سرمی جدا گردید. سطوح سرمی آنزیم های کبدی شامل آسپاراتات آمینوترانسفراز^۱ (AST)، آلانین آمینوترانسفراز^۲ (ALT) و آلکالین فسفاتاز^۳ (ALP) براساس دستورالعمل های کیت های اختصاصی (زیست شیمی، ایران) با روش اسپکتروفوتومتری^۴ اندازه گیری شدند.

¹ Aspartate Aminotransferase

² Alanine Aminotransferase

³ Alkaline Phosphatase

⁴ Spectrophotometry

⁵ Malondialdehyde



به حجم رسانده شد. جهت تهیه معرف FRAP از محلول های زیر استفاده گردید:

محلول ۱) بافر استات ۳۰۰ میلی مولار) که جهت تهیه آن ۰/۹۸۰۹ g استات سدیم و ۱/۳ ml اسید استیک در یک بالن ۱۰۰ ریخته شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد و با pH=۳/۶ تنظیم گردید.

محلول ۲) TPTZ (۱۰ میلی مولار در ۴۰ میلی مولار HCL) به این منظور ۰/۳۱۲g TPTZ و ۳۴ μl HCL در یک بالن ۱۰ ریخته شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد. محلول ۳) FeCl₃ (۰/۰۵۴۰g) در یک بالن ۱۰ ریخته شد و با آب مقطر به حجم رسانده شد.

جهت تهیه معرف FRAP، ۲۵ ml از محلول ۱ با ۲/۵ ml از محلول ۲ و ۲/۵ ml از محلول ۳ (به نسبت ۱:۱:۱) با هم مخلوط گردید. محلول معرف باید به تازگی و در روز آنالیز تهیه گردد. جهت تهیه هموزن بافت، ۱۰٪ وزن حجم بافت به آن KCL اضافه گردید و در هاون کوبیده شد. سپس هموزن تهیه شده با دور ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. از محلول رویی ۱۰۰ μl برداشته شد و به لوله آزمایش منتقل گردید و ۳ ml معرف FRAP به آن اضافه شد و در بن ماری ۳۷ C° به مدت ۱۰-۷ دقیقه انکوبه گردید. جذب کمپلکس آبی رنگ در ۵۹۳ nm توسط اسپکتروفوتومتر خوانده شد. مقادیر برحسب nmol/gr tissue بیان گردید (۱۷).

مطالعه بافت شناسی

نمونه‌های بافتی مناسب از کبد برداشته شد و در محلول بافر فرمالین ۱۰٪ جهت پایدار شدن قرار گرفت. پس از تثبیت، بافت‌ها توسط الکل آبیگری، در گزیلول شفاف سازی و بعد از تهیه قالب‌های پارافینی، مقطعی به قطر ۷-۱۰

جذبی محاسبه و به صورت nmol/gr tissue بیان شد (۱۵).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

فعالیت CAT براساس توانایی آن در تجزیه پراکسید هیدروژن به روش Aebi تعیین گردید. تجزیه پراکسید هیدروژن با کاهش جذب در طیف جذبی ۲۴۰ nm قابل بررسی است. تفاوت در جذب در واحد زمان معادل مقدار فعالیت CAT است. محلول بافر فسفات به روش مذکور تهیه و pH محلول، روی ۶/۸ تنظیم گردید. جهت تهیه محلول پراکسید هیدروژن، ۰/۱۵ ml پراکسید هیدروژن در یک بالن ۱۰۰ با بافر فسفات ریخته شد و در هاون قرار گرفته در محیط یخ کوبیده شد. محلول هموزن بافتی تهیه شد، به مدت ۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعدی ۱۰۰ μl از محلول رویی سانتریفیوژ شده به ۲/۸ ml بافر فسفات اضافه گردید و پس از افزودن ۱۰۰ μl از محلول پراکسید هیدروژن، جذب در طول موج ۲۴۰ nm در زمان های صفر و ۳۰ ثانیه اندازه گیری شد. جهت صفر نمودن دستگاه اسپکتروفوتومتر از بافر فسفات استفاده شد. در پایان مقادیر برحسب U/gr tissue بیان گردید (۱۶).

سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام^۱ (TAC)

TAC توسط تست FRAP^۲ بر اساس روش Benzie and Strain بررسی گردید. ارزیابی FRAP تغییر در جذب ۵۹۳ nm را به واسطه تشکیل ترکیب Fe(II)-Tripyridylrhiazine آبی رنگ از Fe(III) اکسید شده بی رنگ اندازه می‌گیرد. در روز آنالیز بافت‌ها در محلول KCL سرد ۱/۵٪ هموزنیزه گردید. جهت تهیه محلول KCL، ۷/۵ از ماده را در یک بالن ۵۰۰ ریخته شد و با آب مقطر

^۱ Total Antioxidant Capacity

^۲ Ferric Reducing-Antioxidant Power



($P < 0/05$) نسبت به گروه شاهد داشته و در گروه درمان گروه نیکوتین دوز ۰/۵ mg همراه ژل رویال نسبت به گروه نیکوتین ۲ mg و گروه درمان نیکوتین ۱ mg همراه ژل رویال نسبت به گروه‌های نیکوتین ۰/۵ و ۱ mg اختلاف معنی‌داری ($P < 0/05$) نشان دادند، در گروه‌های تیمار با نیکوتین افزایش معنی‌داری ($P < 0/05$) در سطح ALP نسبت به گروه شاهد مشاهده شد و در گروه‌های درمان نیکوتین ۰/۵ و ۱ mg همراه ژل رویال نسبت به گروه‌های نیکوتین ۱ و ۲ mg اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) بود. میزان AST هم در هر سه گروه نیکوتین نسبت به گروه شاهد و در گروه درمان نیکوتین ۰/۵ mg همراه ژل رویال نسبت به هر سه دوز نیکوتین، گروه نیکوتین ۱ mg همراه ژل رویال نسبت به هر سه دوز نیکوتین، گروه نیکوتین ۱ و ۲ mg و گروه نیکوتین ۲ mg همراه ژل رویال نسبت به گروه نیکوتین ۰/۵ mg اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) نشان داد (جدول ۲).

یافته‌های هیستوپاتولوژیکی

در مقاطع عرضی تهیه شده از بافت کبد، در گروه شاهد و گروه ژل رویال ساختار لوپول‌های کبدی و هپاتوسیت‌ها در اطراف ورید مرکزی به صورت طبیعی مشاهده شد (شکل شماره ۱-A و E). در گروه‌های تیمار با نیکوتین ۰/۵ و ۱ mg در بسیاری از نقاط بافتی اتساع بیش از حد سینوزوئیدها حضور داشت و ضایعه بافتی دیگری مشاهده نشد (شکل شماره ۱-B و C)، اما در دوز بالای نیکوتین فضای سینوزوئیدی به مقدار زیادی اتساع یافته و افزایش چربی سلول‌های کبدی و نکروز سلولی مشاهده شد (شکل ۱ ولی در گروه D) در گروه‌های درمان نیکوتین ۰/۵ و ۱ mg همراه با ژل رویال تغییرات بافتی چندانی مشاهده نشد (شکل ۱-F و G) درمان نیکوتین ۲ mg همراه با ژل رویال سلول‌های چربی کاهش چشم‌گیری داشته ولی فضای

۶ میکرون تهیه و بعد از رنگ‌آمیزی پریودیک اسید- شیف (پاس) با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های این مطالعه با استفاده از بسته نرم‌افزاری SPSS مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند. جهت مقایسه بین گروه‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن تست‌های مقایسه‌ای چندگانه توکی مورد استفاده قرار گرفت. مقدار ($P < 0/05$) برای تعیین سطح معنی‌داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی نشان داد که تجویز نیکوتین در هر سه دوز (۰/۵، ۱ و ۲) باعث افزایش MDA شده است به این صورت که میزان افزایش MDA در دوزهای ۱ و ۲ mg نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$) در گروه‌های درمان، نیکوتین ۰/۵ mg به همراه ژل رویال در مقایسه با گروه نیکوتین ۱ و ۲ mg، گروه نیکوتین ۱ mg همراه ژل رویال نسبت به گروه نیکوتین ۲ mg و گروه نیکوتین ۲ mg همراه ژل رویال نسبت به گروه نیکوتین ۰/۵ mg اختلاف معنی‌داری ($P < 0/05$) نشان داد. کاهش آنزیم CAT در هر سه دوز نیکوتین نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بوده ($P < 0/05$) و در گروه‌های درمان، نیکوتین ۰/۵ mg به همراه ژل رویال در مقایسه با گروه نیکوتین ۱ و ۲ mg، گروه نیکوتین ۱ mg همراه ژل رویال نسبت به گروه نیکوتین ۲ mg معنی‌دار ($P < 0/05$) مشاهده شد. TAC تنها در گروه نیکوتین با دوز بالا کاهش معنی‌داری ($P < 0/05$) نشان داد و در گروه درمان دوزهای ۰/۵ و ۱ mg نیکوتین همراه ژل رویال در مقایسه با گروه نیکوتین ۲ mg اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) مشاهده شد (جدول ۱). نتایج فاکتورهای سرم خون نشان داد که میزان ALT در گروه‌های هر سه دوز نیکوتین افزایش معنی‌داری



سینوزوئیدی در بیشتر مناطق متسع دیده می‌شود (شکل) شماره ۱- H).

جدول ۱- تاثیر تیمار ژل رویال بر میزان MDA، TAC و CAT در کبد موش‌های گروه‌های مختلف آزمایشی

گروه‌ها	MDA(nmol/gr)	TAC(nmol/gr)	CAT(U/gr)
شاهد	7/88±1/72	589/40±22/13	31/84±1/33
نیکوتین 0/5 mg	^d 15/47±2/68	^d 482/95±15/17	^{ad} 23/95±1/58
نیکوتین 1 mg	^{ad} 24/14±0/82	410/14±33/80	^a 17/61±1/65
نیکوتین 2 mg	^{abc} 38/35±3/60	^{ab} 280/57±65/52	^{ab} 14/27±1/66
ژل رویال 100mg	^{cd} 6/97±1/86	^{cd} 627/82±3/91	^{bcd} 31/84±1/09
نیکوتین 0/5mg+ژل رویال 100mg	^{cd} 12/35±2/02	^d 560/48±48/36	^{cd} 27/40±0/81
نیکوتین 1mg+ژل رویال 100mg	^{ad} 21/11±0/69	^d 521/88±43/41	^{abd} 21/30±0/72
نیکوتین 2 mg+ژل رویال 100mg	^{ab} 33/59±3/06	^a 356/91±35/56	^{ab} 19/31±1/19

a: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد ($P < 0.05$)

b: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه نیکوتین دوز 0/5 mg ($P < 0.05$)

c: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه نیکوتین دوز 1 mg ($P < 0.05$)

d: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه نیکوتین دوز 2 mg ($P < 0.05$)

جدول ۲- میزان AST، ALT و ALP در کبد سرم موش‌های صحرایی گروه‌های مختلف آزمایشی

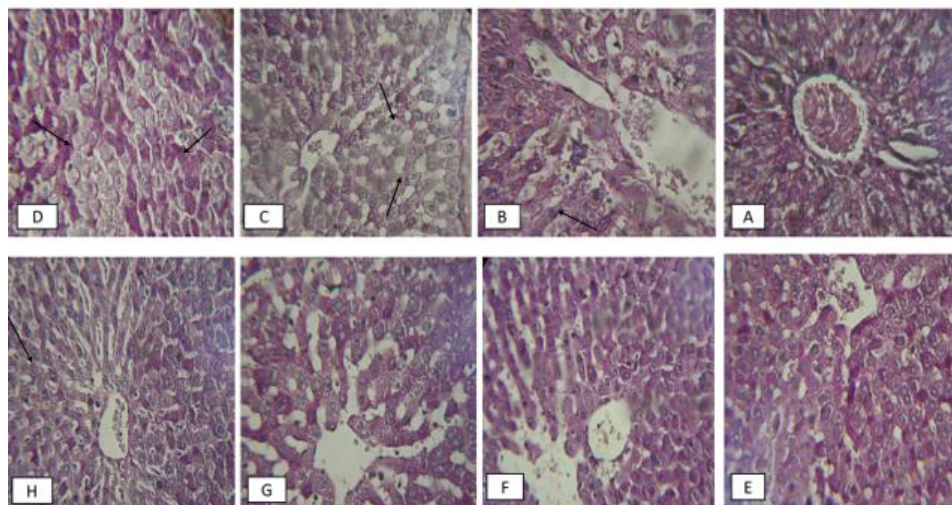
گروه‌ها	AST(U/L)	ALT(U/L)	ALP(U/L)
شاهد	93/36±2/44	29/10±1/38	95/36±2/89
نیکوتین 0/5 mg	^{ad} 119/93±0/74	^a 39/50±0/76	^a 123/83±5/96
نیکوتین 1 mg	^{ad} 122/66±2/02	^a 41/16±1/28	136/60±1/93
نیکوتین 2 mg	^{abc} 137/00±3/05	^a 47/16±2/89	^a 141/50±2/92
ژل رویال 100mg	^{bcd} 93/36±2/58	^{bcd} 27/80±1/63	^{bcd} 93/52±3/17
نیکوتین 0/5 mg+ژل رویال 100 mg	^{abcd} 108/53±1/63	^d 34/65±1/22	^{cd} 110/26±5/03
نیکوتین 1 mg+ژل رویال 100mg	^{acd} 110/10±1/21	^{cd} 32/15±2/11	^{ac} 116/98±3/11
نیکوتین 2 mg+ژل رویال 100mg	^b 131/33±2/40	41/13±1/60	134/76±3/64

a: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد ($P < 0.05$)

b: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه نیکوتین دوز 0/5 mg ($P < 0.05$)

c: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه نیکوتین دوز 1 mg ($P < 0.05$)

d: وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه نیکوتین دوز 2 mg ($P < 0.05$)



شکل ۱- مقطع عرضی کبد،

A: گروه شاهد: ورید مرکزی و هپاتوسیت‌ها دارای ساختار طبیعی می‌باشند.
 B: گروه دریافت کننده نیکوتین به میزان ۰/۵ میلی گرم: اتساع سینوزوئیدها در بسیاری از نقاط بافتی دیده می‌شود.
 C: گروه دریافت کننده نیکوتین به میزان ۱ میلی گرم: اتساع سینوزوئیدی مشهود می‌باشد. D: گروه دریافت کننده نیکوتین به میزان ۲ میلی گرم: اتساع بیش از حد فضای سینوزوئیدها، افزایش چربی سلول‌های کبدی و نکروز سلولی قابل رویت است.
 E: گروه دریافت کننده ژل رویال: ضایعه ای در بافت مشاهده نشد
 F: گروه دریافت کننده نیکوتین میزان ۰/۵ میلی گرم همراه ژل رویال G: گروه دریافت کننده نیکوتین به میزان ۱ میلی گرم همراه ژل رویال: تغییرات چندانی در بافت کبد مشاهده نشد.
 H: دریافت کننده نیکوتین به میزان ۲ میلی گرم همراه ژل رویال: کاهش در نکروز سلولی دیده شد.
 رنگ آمیزی پاس، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر

بحث

در موش‌های صحرایی که در معرض نیکوتین بودند منظور می‌شود (۱۸). مصرف نیکوتین باعث کاهش فعالیت کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون در موش‌های صحرایی می‌شود (۱۱). نقش اصلی آنزیم کاتالاز حذف آنیون سوپراکسید ایجاد شده و تبدیل آن به آب می‌باشد (۱۹).

طبق مطالعات گذشته نیکوتین ماده سمی موجود در گیاه تنباکو و توتون است که به راحتی از گیاه برای استفاده در محصولات جایگزین نیکوتین جدا می‌شود (۲۰). این ماده به متابولیت کوتینین اکسید شده که دارای نیمه عمر طولانی است و می‌تواند نقش مهمی در بیماری‌های عروقی داشته باشد. تجویز مزمن نیکوتین باعث تولید

مطالعه حاضر نشان داد که پراکسیداسیون لیپیدی در گروه‌های دریافت کننده نیکوتین نسبت به گروه شاهد افزایش داشت. پراکسیداسیون لیپید می‌تواند به عنوان یک شاخص برای اندازه‌گیری آسیب‌هایی که در غشای بافت‌ها رخ می‌دهد به عنوان یک نتیجه از تولید رادیکال آزاد استفاده شود. به این ترتیب سطح بالای محصولات پراکسیداسیون لیپید در کبد موش‌های صحرایی تحت درمان با نیکوتین در مطالعه حاضر ممکن است به علت تولید بیش از حد رادیکال آزاد توسط نیکوتین باشد. با در نظر گرفتن ارتباط تنش اکسیداتیو و شرایط پاتولوژیک مختلف، توجه زیادی به اثرات نیکوتین بر تنش اکسیداتیو



روبین را کاهش اما سطح ALP, AST, ALT را افزایش می‌دهد (۲۵). نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان داد که ژل رویال سطح آنزیم‌های کبدی را نسبت به گروه‌های تحت تیمار با نیکوتین کاهش داد که این نتایج در مورد AST قابل توجه‌تر بود. آشکار شده است که ژل رویال باعث بهبود قابل توجه در سطح فراسنجه‌هایی مانند AST، ALT و پروتئین متعاقب القاء آسیب به وسیله تیروکسین می‌گردد (۲۶). در این پژوهش تغییرات هیستوپاتولوژیک چشمگیری در دوزهای ۰/۵ و ۱ mg نیکوتین مشاهده نشد ولی در دوز ۲ mg، ژل رویال آسیب بافتی ناشی از نیکوتین را تا حد زیادی بهبود بخشید. در این راستا، گزارشات قبلی نشان دادند که ژل رویال باعث بهبود قابل توجهی در سطوح AST, ALT، کلاسترول و تری‌گلیسرید نسبت به گروه شاهد در مسمومیت ناشی از فمونیسین (یک مایکوتوکسین تولید شده توسط *Fusarium verticillioides*) در موش‌های صحرایی می‌شود. به دنبال تجویز ۲۰۰ mg فمونیسین و ۱۰۰ یا ۱۵۰ mg ژل رویال در موش‌های صحرایی برای یک دوره سه هفته‌ای، گزارش شد که ژل رویال تغییرات هیستوپاتولوژیک القا شده توسط این ماده در کبد را بهبود بخشید و از این روی بیان شد که ژل رویال ممکن است اثرات محافظت کبدی در مسمومیت با فمونیسین داشته باشد (۲۷).

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های این پژوهش چنین به نظر می‌رسد که نیکوتین به شکل وابسته به دوز در بروز آسیب‌های کبدی در موش‌های صحرایی نقش دارد و ژل رویال با داشتن ترکیبات غنی از فعالیت بیولوژیکی، می‌تواند در مقابل تنش اکسیداتیو ناشی از نیکوتین نقش محافظتی داشته و آثار مخرب ناشی از نیکوتین را در بافت کبد موش‌های صحرایی کاهش دهد. با وجود این، آشکار شدن مکانیسم

رادیکال‌های آزاد در بافت و آسیب‌های اکسیداتیو بافتی می‌شود (۲۱). کبد که محل اصلی متابولیک است به شدت به فرایندهای اکسیداتیو مرتبط با سمیت نیکوتین حساس است. مکانیسم‌های مختلفی که نیکوتین باعث ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود، شناخته شده است. در واقع نیکوتین باعث افزایش تولیدگونه‌های فعال اکسیژن توسط افزایش پاسخ لکوسیتها به C5a فعال و اختلال در زنجیره تنفسی میتوکندری می‌شود (۲۰).

با توجه به جدول ۱ ژل رویال باعث کاهش سطح پراکسیداسیون لیپیدی شده است. همانطور که پیشتر گزارش شده است ژل رویال فعالیت آنتی‌اکسیدانتی بالایی داشته و توانایی مهار رادیکال‌های آزادی مانند آنیون سوپراکساید و هیدروکسی رادیکال را دارد (۲۲). در این بررسی مشاهده شد که نیکوتین موجب افزایش سطح آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی و ایجاد نکروز سلولی و اتساع بیش از حد سینوزوئیدی در کبد گردید. همانطور که مطالعات قبلی نشان داده است نیکوتین باعث آسیب سلول‌های کبدی و وقوع نکروز و تغییرات چربی سلول‌ها می‌شود (۲۰). بررسی برخی آنزیم‌های سرمی به عنوان شاخص تشخیص تخریب سلول‌های کبدی پیشنهاد شده است که از میان آن‌ها AST و ALT مهم‌تر از بقیه می‌باشند. تقریباً در تمام بیماری‌ها و آسیب‌های کبدی، مقادیر سرمی این آنزیم‌ها تا حدودی افزایش می‌یابد. بالاترین مقادیر در شرایطی ایجاد می‌شود که نکروز شدید کبد وجود داشته باشد (۲۳).

ALT عمدتاً در کبد یافت می‌شود ولی AST علاوه بر کبد در بسیاری از بافت‌های دیگر از جمله قلب، عضلات اسکلتی و مغز نیز یافت می‌شود. بنابراین نشانگر اختصاصی برای آسیب کبدی آنزیم ALT است (۲۴). در مطالعه‌ای که روی موش‌ها انجام شده است مشاهده شده که تجویز نیکوتین میزان پروتئین کل، آلبومین و بیلی



دقیق اثرات محافظتی و نیز کارایی درمانی به ویژه در بافت کبد مستلزم مطالعات تجربی گسترده تر می باشد.

References

1. Carvalho CA, Favaro WJ, Padovani CR, Cagnon VH. Morphometric and ultrastructure features of the ventral prostate of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to long term nicotine treatment. *Andrologia* 2006; 38(4):142-51.
2. Miceli F, Minici F, Tropea A, Catino S, Orlando M, Lamanna G, *et al.* Effects of nicotine on human luteal cells in vitro: A possible role on reproductive outcome for smoking women. *Biol Reprod* 2005; 72(3):628-32.
3. Korman MG, Shaw RG, Hansky J, Schmidt GT, Stern AI. Influence of smoking on healing rate of duodenal ulcerin response to cimetidine or high-dose antiacid. *Gastroenterology* 1981; 80(6):1451-3.
4. Mulligan J, Cluette JE, Kew RR, Stack DJ, Hojnacki JL. Cigarette smoking impairs hepatic uptake of high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 112(3):843-50.
5. Yuen ST, Gogo Jr AR, Luck IC, Ho JCI, Loh TT. The effect of nicotine and its interaction with carbon tetrachloride in the rat liver. *Pharmacol Toxicol.* 1995; 77(3):225-30.
6. Wetscher GJ, Bagchi M, Bagchi D, Perdakis G, Hinder PR, Glaser K, *et al.* Free radical production in nicotine treated pancreatic tissue. *Free Radical Biol Med* 1995; 18(5):877-82.
7. Yildiz D, Liu YS, Ercal N, Armstrong DW. Comparison of pure nicotine- and smokeless tobacco extract-induced toxicities and oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 1999; 37(4):434-9.
8. Kovacic P, Cooksy A. Iminium metabolism for nicotine toxicity and addiction: oxidative stress and electron transfer. *Med Hypotheses* 2005; 64(1):104-11.
9. Howard DJ, Briggs LA, Pritsos CA. Oxidative DNA damage in mouse heart, liver, and lung tissue due to acute side-stream tobacco smoke exposure. *Arch Biochem Biophys* 1998; 352(2):293-7.
10. Husain K, Scott BR, Reddy SK, Somani SM. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 25:89-97.
11. Helen A, Krishnakumar K, Vijayammal PL, Augusti KT. A comparative study of antioxidants *s*-allyl cysteine sulfoxide and vitamin E on the damages induced by nicotine in rats. *Pharmacology* 2003; 67(3):113-7.
12. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160(1):1-40.
13. Tokunaga KH, Yoshida C, Suzuki KM, Maruyama H, Futamura Y, Araki Y, *et al.* Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(2):189-92.
14. Shalizer Jalali A, Najafi G, Hosseinchi M, Sedighnia A. Royal jelly alleviates sperm toxicity and improves in vitro fertilization outcome in Stanazolol-treated mice. *Iran J Reprod Med* 2015; 13(1):15-22.
15. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186:407-21.
16. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-6.
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):70-6.
18. Dhoub H, Jallouli M, Draief M, El-Fazaa S, Bouraoui S. The Effect of Nicotine and its Interaction with Ethanol on Biochemical Parameters, Oxidative Damage and Histological Changes in the Rat's Liver. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT)* 2014; 8(1):72-82.
19. Husain K, Scott RB, Reddy KS, Somani SM. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol.* 2001; 25, 2:89-97.
20. El-Sokkary GH, Cuzzocrea S, Reiter RJ. Effect of chronic nicotine administration on the rat lung and liver: Beneficial role of melatonin. *Toxicology* 2007; 239(1-2):60-7.
21. Anandatheerthavarada HK, Williams JF, Wecker L. The chronic administration of nicotine induces cytochrome P-450 in rat brain. *J Neurochem* 1993; 60(5):1941-4.
22. Nagai T, Inoue R. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chemistry* 2004; 84(2):181-6.



23. Foreston WC, Tedesco FJ, Starnes EC, Shaw CT. Marked elevation of serum transaminase activity associated with extrahepatic biliary tract disease. *J Clin Gastroenterol* 1985; 7(6):502-5.
24. Aniya Y, Koyama T, Miyagi C, Miyahira M, Inomata C, Kinoshita S, *et al.* Free radical scavenging and hepatoprotective actions of the medicinal herb, *Crassocephalum crepidioides* from the Okinawa Islands. *Biol Pharm Bull* 2005; 28(1):19-23.
25. Sharif S, Farasat T, Fatima N, Farooq, Naz Sh. Effect of nicotine on hematology, lipid profile and liver enzymes in adult male mice. *Adv Anim Vet Sci* 2014; 2(4):222-5.
26. Uzbekova D, Chugunova L, Makarova V, Ryabkov A, Mirgorodskaya L. Efficacy of royal jelly and lactulose on thyroxin-induced liver in rats. *Journal of Hepatology* 1998; 28:157.
27. El-Nekeety AA, El-Kholy W, Abbas NF, Ebaid A, Amra HA, Abdel-Wahhab MA. Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. *Toxicon* 2007; 50(2):256-69.