

## **Protective effect of carvacrol on oxidative stress and hepatotoxicity induced by silver nanoparticles in NMRI mice**

**Cheraghi E<sup>1\*</sup>, Shariatzadeh SMA<sup>2</sup>, Mohammadi Z<sup>2</sup>**

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Qom, Qom, I.R. Iran.

2- Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, I.R. Iran.

Received: 2022/12/20 | Accepted: 2023/03/13

### **Abstract:**

**Background:** Carvacrol, as antioxidant, is antimicrobial, anti-cancer and anti-inflammatory effects. Research has shown that silver nanoparticles destroy sensitive tissues of the body, including the liver, through disruption of the membrane structure, oxidative stress, binding to protein or DNA, production of active oxygen, and cell death or apoptosis. This study aimed to investigate the protective effect of carvacrol on reducing the cytotoxic effects of silver nanoparticles on the liver tissue of NMRI mice.

**Materials and Methods:** In this study, 24 adults male NMRI mice with a mean weight of  $35\pm 3$  gr were randomly divided into 5 groups: control, sham (distilled water), silver nanoparticles (size 40 nm) (500 mg/kg/b.w/day), carvacrol (100 mg/kg/b.w/day) and silver nanoparticles+carvacrol. Then they treated orally (gavage) for 45 days. At end treatment, liver tissue was removed for histopathological studies. The total antioxidant capacity (TAC) by FRAP method, levels of malondialdehyde (MDA) by spectrophotometric method, as well as alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) by Elisa kit were measured.

**Results:** In treatment with silver nanoparticles showed a significant decrease in the mean histopathology parameters and total antioxidant capacity, and a significant increase in sinusoid volume, ALT, and AST enzymes and lipid peroxidation (MDA) compared to the control group. The above parameters in the simultaneous treatment group of silver and carvacrol nanoparticles improved to a large extent close to the level of the control group, which was significant.

**Conclusion:** Carvacrol as anti-oxidant reduces the toxicity of silver nanoparticles on liver.

**Keyword:** Carvacrol, Liver, Silver nanoparticles, Mice

### **\*Corresponding Author**

**Email:** e.cheraghi@qom.ac.ir

**Tel:** 0098 912 750 0462

**Fax:** 0098 253 210 3086

Conflict of Interests: *No*

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2023; Vol. 27, No 2, Pages 164-175*

*Please cite this article as:* Cheraghi E, Shariatzadeh SMA, Mohammadi Z. Protective effect of carvacrol on oxidative stress and hepatotoxicity induced by silver nanoparticles in NMRI mice. *Feyz* 2023; 27(2): 164-75.

# اثر حفاظتی کارواکرول بر استرس اکسیداتیو و سمیت کبدی ناشی از نانوذرات نقره در موش NMRI

ابراهیم چراغی<sup>\*۱</sup>، سید محمدعلی شریعت‌زاده<sup>۲</sup>، زینب محمدی<sup>۳</sup>

## خلاصه:

**سابقه و هدف:** کارواکرول به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، دارای اثرات ضد میکروبی، ضد سرطانی و ضد التهابی می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که نانوذرات نقره از طریق اختلال در ساختار غشاء، استرس اکسیداتیو، تولید اکسیژن فعال و مرگ سلولی، باعث تخریب بافت‌های حساس بدن از جمله کبد می‌شوند. هدف از این پژوهش بررسی اثر حفاظتی کارواکرول بر کاهش اثرات سیتوتوکسیکی نانوذرات نقره بر بافت کبد موش‌ها می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** ۲۴ سر موش نر بالغ NMRI با میانگین وزنی  $35 \pm 3$  گرم به‌طور تصادفی به ۵ گروه: کنترل، شام (آب مقطر)، نانوذرات نقره (با سایز ۴۰ نانومتر) (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز)، کارواکرول (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز) و تیمار همزمان نانوذرات نقره و کارواکرول تقسیم و از طریق خوراکی (گاواژ) به مدت ۴۵ روز تیمار شدند. در پایان تیمار، بافت کبد جهت مطالعات هیستوپاتولوژی برداشته شد. میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) با استفاده از روش (FRAP)، سطح مالون‌دی‌آلدنید (MDA) با روش اسپکتروفتومتری و نیز آنزیم‌های آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) با استفاده از کیت الایزا اندازه‌گیری شد. **نتایج:** در تیمار با نانوذرات نقره کاهش معنی‌داری در میانگین پارامترهای هیستوپاتولوژی و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی تام و افزایش معناداری در حجم سینوزوئیدها، آنزیم‌های ALT و AST و پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. پارامترهای فوق در گروه تیمار هم‌زمان نانوذرات نقره و کارواکرول تا حدود زیادی نزدیک به سطح گروه کنترل بهبود یافت که این تغییرات معنی‌دار بود. **نتیجه‌گیری:** کارواکرول به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، سمیت نانوذرات نقره روی بافت کبد را کاهش می‌دهد.

**واژگان کلیدی:** کارواکرول، کبد، نانوذرات نقره، موش سوری

دوماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و هفتم، شماره ۲، خرداد - تیر ۱۴۰۲، صفحات ۱۶۴-۱۷۵

## مقدمه

همچنین کارواکرول اثرات ضد تکثیر در سرطان‌های مختلف از جمله سرطان پروستات، تومور کبدی، سرطان خون، سرطان ریه و سرطان دهانه رحم دارد [۴]. همه اسانس‌های حاوی کارواکرول علاوه بر فعالیت ضد میکروبی به‌عنوان ضد قارچ، ضد ویروسی، و ضد آنگل نیز عمل می‌کنند [۵]. مطالعات نشان داده که کارواکرول مولکول کوچک و چربی‌دوست است که به راحتی می‌تواند از سد خونی- مغزی عبور و اثرات خود را بر بافت هدف اعمال کند [۶]. علاوه بر این، کارواکرول تا حدود زیادی باعث بهبود سطح کاهش‌یافته گلوکوتایون در بافت‌های کبد، کلیه، طحال و همچنین باعث کاهش سطح مالون‌دی‌آلدنید (Malondialdehyde) می‌شود [۷]. مطالعات نشان داده‌اند که ترکیبات گیاهی فنولی مانند تیمول و کارواکرول، اثرات ضد التهابی دارند و می‌توانند سبب بهبود سطح سرمی ایمونوگلوبولین E، کاهش سیتوکین پیش‌التهابی (اینتروکین-۴، TGF- $\beta$  و اینترلوکین-۱۷) و افزایش سیتوکین‌های ضد التهابی گردند [۸]. گزارش شده است که تجویز کارواکرول از آسیب کبدی ناشی از استرس اکسیداتیو توسط تیواستامید [۹]، لیپوپلی‌ساکارید [۱۰، ۱۱] و تتراکلرید کربن [۱۲] در موش جلوگیری می‌کند. فناوری نانو یکی از سریع‌ترین رشته‌های در حال رشد است و کاربرد آن در بخش‌های مختلف صنعت قابل استفاده است. در میان انواع نانوذرات

کارواکرول یک مونوترپنوئید فنلی است که در اسانس‌های پونه کوهی، آویشن، فلفل دلمه‌ای، نعناع، ترنج وحشی و گیاهان دیگر یافت می‌شود [۱]. کارواکرول دارای فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و خواص ضد سرطانی است. مطالعات نشان داده است که کارواکرول می‌تواند رادیکال‌های آزاد را به‌طور مؤثر خنثی کند [۲]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی کارواکرول به دلیل وجود گروه هیدروکسیل آزاد و آبگریز بودن آن است [۳]. کارواکرول هر دو خاصیت باکتریواستاتیک (جلوگیری از رشد باکتری) و باکتری‌سیدال (باکتری کش) را برای بیشتر گونه‌های باکتریایی از جمله سالمونلاتیفی موریوم و اشریشیا کلی دارد.

۱. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران
۲. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران
۳. کارشناس ارشد سلولی تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

## \* نشانی نویسنده مسؤله:

قم، بلوار غدیر، دانشگاه قم، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۹۱۲۸۵۰۰۴۶۳ | دورنویس: ۰۲۵۳۲۱۰۳۰۸۶

پست الکترونیک: e.cheraghi@qom.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۹/۲۹ | تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۱۲/۲۲

## مواد و روش‌ها

### طرح مطالعه و روش تیمار

برای انجام این تحقیق تجربی، ۲۴ سر موش نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی  $35 \pm 2$  گرم از انیستیتوپاستور ایران خریداری و در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط استاندارد (دمای  $21 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و نور محیطی با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) و همچنین دسترسی آزاد به آب و غذا جهت سازگاری با محیط به مدت دو هفته نگهداری شدند. برای شناسایی موش‌ها در داخل هر گروه، به هر کدام به وسیله tagging کد مخصوص داده شد. پروتکل این تحقیق مطابق اصول مورد تأیید کمیته‌های بین‌المللی حمایت از حقوق حیوانات آزمایشگاهی (IR.ARAKMU.REC.1400.062) طراحی شد. تمام تلاش‌ها جهت به حداقل رساندن درد و استرس حیوان نیز به کار گرفته شد. برای تیمار، از نانوذرات نقره با خلوص ۹۹/۹۵ درصد با قطر ۴۰ نانومتر (خریداری شده از شرکت پیشگامان نانو مواد، ایران) استفاده گردید (شکل شماره ۱). همچنین کارواکرول از شرکت سیگما آلدریج با درصد خلوص ۹۸ درصد با فرمول شیمیایی  $C_{10}H_{14}O$  تهیه گردید.

موش‌ها به صورت تصادفی به پنج گروه شش‌تایی به صورت زیر تقسیم شدند:

گروه ۱: کنترل،

گروه ۲: شم (آب مقطر)،

گروه ۳: تیمار با کارواکرول (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز)،

گروه ۴: تیمار با نانوذرات نقره (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز)،

گروه ۵: نانوذرات نقره + کارواکرول (با دوزهای ذکر شده بالا).

تیمار موش‌ها با نانوذرات نقره و کارواکرول، با توجه به نوع و تقسیم‌بندی گروه‌ها به صورت دهانی توسط گاوآژ برای نانوذرات نقره و کارواکرول به مدت ۴۵ روز انجام شد. نحوه گاوآژ به این شکل صورت گرفت که ابتدا نانوذرات نقره به صورت خوراکی به موش‌ها داده و بعد از گذشت ۲ ساعت کارواکرول به صورت خوراکی به آن‌ها داده شد [۲۵]. براساس مطالعات قبلی مرتبط با این تحقیق، دوز مناسب برای تیمار با نانوذرات نقره ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در هر روز [۲۶] و برای کارواکرول، دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن [۲۷] در نظر گرفته شد.

هسیتو تکنیک و رنگ‌آمیزی بافت

پس از پایان دوره تیمار، ابتدا موش‌ها وزن و سپس با ماده بیهوشی کتامین و زایلازین بیهوش و تشریح شدند و کبد آن‌ها جهت

ساخته شده، نانوذرات نقره به دلیل خواص منحصر به فرد خود از جمله خواص ضد میکروبی قوی در برابر باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌های متعدد، از پرکاربردترین نانوذرات به شمار می‌آید [۱۳]. نانوذرات نقره به دلیل فعالیت‌های ضد میکروبی و ضد سرطانی با طیف گسترده و بسیار کارآمد، معروف هستند [۱۴]. این نانوذرات نقش مؤثری در برابر انواع سرطان‌ها هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در داخل بدن از جمله سرطان دهانه رحم، سرطان سینه، سرطان ریه، کارسینوم سلول‌های کبدی، کارسینوم نازوفارنکس و کارسینوم پروستات ایفا می‌کنند [۱۵، ۱۶]. با توجه به محصولات مختلف حاوی نانوذرات نقره مانند پانسمان‌ها، کرم‌ها، حلال‌ها و داربست‌ها، ارزیابی سمیت بالقوه نانوذرات نقره در سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌ها ضروری به نظر می‌رسد [۱۷]. نانوذرات نقره در بافت‌ها و اندام‌های مختلف مانند پوست، تنفس، گردش خون، عصبی، کبد صفراوی، ادراری و سیستم‌های تولید مثل توزیع می‌شوند [۱۸]. نانوذرات نقره رسوب شده ممکن است با القای نکروز سلولی، آپوپتوز یا جهش‌های ژنتیکی برای این بافت‌ها یا اندام‌ها، سمی باشند [۱۹]. بنابراین همراه با این کاربردها، نگرانی‌های مربوط به تأثیرات بیولوژیکی استفاده از نانوذرات نقره در مقیاس بزرگ و خطرات احتمالی برای محیط زیست و سلامتی انسان‌ها، روبه‌افزایش است. لذا نانوذرات نقره نه تنها برای باکتری‌ها و قارچ‌ها بلکه برای تعدادی از گونه‌های جانوری و سلول‌های کشت شده، بسیار سمی هستند [۲۰]. این ذرات با اندازه فوق‌العاده کوچکشان مشکلی برای عبور از سد های فیزیولوژیکی درون بدن ندارند و به طور مؤثری از طریق سیستم عروقی در بدن توزیع می‌شوند [۲۱]. کبد، بزرگ‌ترین اندام احشایی با بافت بسیار تخصصی با عملکردهای متنوعی از جمله متابولیسم کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها، ذخیره آهن و ویتامین‌ها، سم‌زدایی و ... می‌باشد؛ بنابراین به علت متابولیسم منحصر به فرد کبد و ارتباطش با دستگاه گوارش، این اندام معمولاً تحت تأثیر سمیت ناشی از داروها و استرس اکسیداتیو قرار دارد [۲۲]. استرس اکسیداتیو عدم تعادل بین گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و نیتروژن (RNS) و آنتی‌اکسیدان است که منجر به آسیب مولکولی و سلولی می‌شود. تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد، می‌تواند با ماکرومولکول‌های بیولوژیکی (اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین‌ها) واکنش نشان داده و آن‌ها را دناتوره کند [۲۳]. به علت توانایی آنتی‌اکسیدان‌ها برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال، از آنتی‌اکسیدان‌ها برای کاهش استرس اکسیداتیو و آسیب ناشی از آن استفاده می‌شود [۲۴]. لذا هدف این پژوهش، بررسی اثرات حفاظتی و آنتی‌اکسیدانی کارواکرول در کاهش اثرات نامطلوب نانوذرات نقره روی بافت کبد موش‌های بالغ می‌باشد.

برای محاسبه کسر حجمی (Volume density) اجزای کبد، از میکروسکوپ مدل Olympus B×41TE ساخت ژاپن و نرم‌افزار Olysia استفاده گردید. با استفاده از روش نمونه‌گیری تصادفی منظم (Systematic Random Sampling) در هر گروه به‌طور میانگین تعدادی میدان دید از اسلایدهای ۵ میکرونی مورد بررسی قرار گرفت. روش محاسبه کسر حجمی اجزاء کبد به‌این ترتیب بود که پروب از قبل طراحی‌شده بر ترنس پرنسی (Trans parency) به‌طور کاملاً تصادفی و بدون هیچ‌گونه سوگیری روی هر میدان دید، انداخته شد و کسر حجمی هیاتوسیت‌ها، سینوزوئیدها، بافت بینابینی، ورید مرکزی، ساختارهای تریاد پورتال (portal triad) شامل وریدها، سرخرگ‌ها در مراحل زیر محاسبه گردید. کل نقاط برخورد کرده از پروب با کل میدان دید انتخاب‌شده شمارش شد. به همین ترتیب نقاط برخورد کرده با هیاتوسیت‌ها و دیگر اجزای کبد شمارش گردید. در همه میدان‌های دید انتخابی این عمل انجام گرفت. سپس مجموع نقاط برخوردی پروب با کل میدان‌های دید با  $\sum P_{reference}$  و نقاط برخوردی با هر یک از اجزاء در همه میدان‌های دید به‌صورت  $\sum P_{structure}$  بیان شد و دانسیته حجمی (Volume density) مطابق فرمول 
$$V_v = \frac{\sum_{i=1}^n P_{structure}}{\sum_{i=1}^n P_{reference}}$$
 محاسبه گردید [۳۱]. سپس حجم کل مربوط به هر یک از اجزاء، به‌طور غیرمستقیم و به‌وسیله ضرب کردن دانسیته حجمی در حجم کل کبد در هر موش تخمین زده شد.

برای محاسبه تعداد سلول‌های هیاتوسیت، از روش اپتیکال دایسکتور و فریم مخصوص شمارش یا (frame counting unbiased) استفاده شد. به این صورت که با استفاده از میکروسکوپ با ۱۰۰=ob از تمامی اسلایدهای ۲۰ میکرونی به‌طور میانگین تعدادی میدان دید انتخاب و برای شمارش نرم‌افزار Olisia و دستگاه میکروکیتور استفاده شد. از دو ناحیه به نام zoon Guard به ضخامت ۵ میکرون از بالا و پایین برش‌های ۲۰ میکرونی برای شمارش صرف‌نظر شد. سپس تمام هسته سلول‌های هیاتوسیت ر که با فریم موردنظر انتخاب و با خط ممنوعه (forbidden) برخورد نکرده بودند، شمارش شدند. سپس دانسیته عددی  $V_n = 4/3\pi \times \bar{L}_n^3$  هیاتوسیت‌ها محاسبه گردید. بعد از محاسبه دانسیته عددی، عدد حاصل در حجم کل کبد مربوطه ضرب شد تا تخمین تعداد کل هیاتوسیت‌ها به‌دست آید. برای تخمین قطر سلول هیاتوسیت و هسته آن از روش Nucleator و برش‌های ۲۰ میکرونی استفاده شد. با کمک نرم‌افزار Olysia و تنظیم میکروسکوپ Olympus(BX14TE) با ob= ۱۰۰ که به دوربین عکاسی DP12(Olympus) مجهز بود، عکس گرفته شد. برای محاسبه قطر هیاتوسیت و هسته آن، از نرم‌افزار موتیک ۲۰۰۰ Motic images استفاده گردید؛ به این صورت که برای

انجام بررسی‌های کمی از بدن حیوان جدا و وزن غوطه‌ور کبد به روش Immersion اندازه‌گیری شد [۲۸]. بعد از شستشو در نرمال سالین به‌منظور ثبوت، بافت کبد در فیکساتیو NBF به مدت ۷ روز قرار داده شد. بعد از فیکس کبدها از آن‌ها برش IUR گرفته شد. به‌منظور تهیه این برش‌ها از دو ساعت فی ( $\Phi$ ) با تقسیمات مساوی و تا ( $\theta$ ) با تقسیمات نامساوی استفاده شد. روش کار به این صورت بود که ابتدا هر لوب از کبد به‌صورت تصادفی و با چرخش دلخواه بر روی ساعت فی ( $\Phi$ ) قرار گرفت سپس یک عدد تصادفی بین اعداد صفر تا ۹ ساعت فی انتخاب و بافت کبد در راستای عدد انتخاب‌شده، برش خورده شد. نتیجه این برش ایجاد دو قطعه از هر لوب کبد بود که قطعه اول از هر لوب روی ساعت تا ( $\theta$ ) طوری قرار گرفته باشد که سطح برش خورده در طول محور ۰-۰ ساعت تا قرار گیرد. سپس یک عدد تصادفی از بین اعداد ساعت تا انتخاب و این قطعه مجدداً در امتداد عدد انتخابی برش داده شد. ادامه برش‌ها به‌صورت موازی و مساوی با برش اول زده شد و قطعه دوم هر لوب به‌اندازه ۹۰ درجه چرخید تا سطح برش خورده مماس بر محور ۰-۰ ساعت تا ( $\theta$ ) قرار گرفته شود. سپس بار دیگر یک عدد تصادفی انتخاب و برش‌ها به‌موازی عدد انتخاب‌شده تهیه و در داخل سبدهای مخصوص قرار گرفته شد [۲۹]. برش‌ها آماده‌شده، در دستگاه پاساژ قرار داده شد و فرآیند پاساژ بافتی انجام گرفت. بعد از پاساژ بافتی نمونه‌ها با حفظ جهت سطح مقطع و نظم و ترتیب در پارافین، قالب‌گیری شدند. سپس برش‌های ۵ و ۲۰ میکرونی از بلوک‌های پارافینی حاوی بافت کبد توسط دستگاه میکروتوم انجام و روی لام قرار گرفت. پس از آن لام‌ها به روش هماتوکسیلین اتوزین رنگ‌آمیزی شدند.

محاسبه چروکیدگی، دانسیته حجمی اجزای کبد، تعداد و قطر هیاتوسیت‌ها

برای محاسبه چروکیدگی به‌طور میانگین دو یا سه قطعه گرد از برش‌های IUR تهیه و دو قطر عمودبرهم از هرکدام اندازه‌گیری و میانگین شعاع آن‌ها محاسبه و به‌صورت r before ثبت شد. بعد از مراحل پاساژ بافتی، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی، مجدداً دو قطر عمود بر هم هرکدام از اسلایدها بعد از چروکیدگی توسط کولیس ورنیه اندازه‌گیری و میانگین شعاع آن‌ها به‌صورت r after ثبت شد. سپس با استفاده از فرمول 
$$\text{Shrinkage} = \left( \frac{r_{\text{after}}^2}{r_{\text{before}}^2} \right)^{\frac{3}{2}}$$
 میزان چروکیدگی مربوط به کبد هر موش محاسبه شد [۳۰]. با استفاده از فرمول ۱- Shrinkage مقدار عدم چروکیدگی بافت به‌دست آمد که با ضرب آن در حجمی که به روش Immersion به‌دست آمده بود حجم واقعی کبد محاسبه شد.

( $P > 0/05$ ). همچنین از مقایسه میانگین وزن کبد پس از اتمام دوره تیمار در بین گروه‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). (جدول شماره ۱).

تغییرات حجم کل کبد، تعداد و قطر هپاتوسیت‌ها، و حجم اجزای کبدی

میانگین حجم کبد موش‌ها در پایان دوره تیمار در گروه نانوذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی‌داری یافت ( $P < 0/001$ ). میانگین قطر هپاتوسیت و هسته هپاتوسیت در گروه تیمار با نانوذرات نقره نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری داشت ( $P < 0/001$ ) (جدول شماره ۲). تعداد هپاتوسیت‌ها در گروه تیمار شده با نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت ( $P < 0/001$ ) و در گروه تیمار با کارواکرول و هم‌زمان نانوذرات نقره و کارواکرول به‌طور معنی‌دار ( $P < 0/001$ ) و قابل‌توجهی افزایش یافت (جدول ۲). میانگین کل حجم هپاتوسیت‌ها در گروه نانوذرات نقره نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری داشت ( $P < 0/001$ ) و حجم فضای سینوزوئید در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش یافت ( $P < 0/001$ ؛ درحالی‌که در سایر گروه‌ها، نزدیک به گروه کنترل بود). میانگین حجم ورید مرکزی در گروه نانوذرات نقره نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری ( $P < 0/001$ ) داشت (جدول شماره ۳). میانگین حجم در بافت بینابینی، ورید پورتال و شریان در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌ها کاهش معنی‌دار یافت ( $P < 0/001$ ) (جدول شماره ۴).

آنالیز غلظت مالون‌دی‌آلدئید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و آنزیم‌های کبدی

میزان مالون‌دی‌آلدئید سرم خون در بین گروه‌های مختلف موش افزایش معنی‌داری را در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل نشان داد ( $P < 0/001$ ). در گروه هم‌زمان نانوذرات نقره و کارواکرول، میزان MDA در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی‌داری نداشت ( $P > 0/05$ ). میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در بین گروه‌های مختلف موش بدین گونه بود که کاهش معنی‌داری در گروه تیمار با نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل مشاهده شد و در گروه تیمار با نانوذرات نقره و کارواکرول ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام افزایش معنی‌داری نسبت به گروه تیمار با نانوذرات نقره داشت ( $P < 0/001$ ). مقدار آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری یافت ( $P < 0/001$ ) (جدول شماره ۵).

اندازه‌گیری قطر هپاتوسیت از مرکز هسته تا غشای هپاتوسیت و برای قطر هسته، از مرکز هسته تا غشای هسته اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری‌ها در دو جهت مختلف انجام و سپس میانگین آن‌ها لحاظ گردید. حجم به‌وسیله رابطه ( $L_n$ ): اندازه مرکز هسته تا غشای هپاتوسیت یا مرکز هسته تا غشای هسته) محاسبه شد [۳۲].

سنجش مالون‌دی‌آلدئید سرم و فعالیت آنزیم‌های کبدی برای محاسبه سنجش مالون‌دی‌آلدئید سرم (MDA)، از محلول TCA-TBA-HCL شامل ۱۵ گرم بر میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA)، ۳۷۵ گرم بر میلی‌لیتر تیوباریوتیک‌اسید (TBA) و اسیدکلریدریک ۲۵ درصد نرمال استفاده و به‌صورت Fresh تهیه شد و ۳۰۰ میکرولیتر از آن با ۱۵۰ میکرولیتر از نمونه مخلوط گردید و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری  $100^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها توسط آب سرد خنک شده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور  $1000\text{ g}$  سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی جدا شده و جذب آن با اسپکتوفتومتر در  $532\text{ nm}$  نانومتر در برابر بلانک که حاوی تمام ترکیبات به‌جز نمونه بود، خوانده شد. غلظت MDA با استفاده از ضریب خاموشی آن که عبارت است از  $1.05 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$  محاسبه شد و برحسب نانومول بر میلی‌متر ( $\text{nmol/ml}$ ) بیان گردید [۳۳]. برای سنجش فعالیت آنزیم کبدی آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) با استفاده از کیت آنزیمی بیوشیمی شرکت پادکو به کمک دستگاه اسپکتوفتومتر و کاملاً منطبق با دستورالعمل‌های شرکت سازنده انجام گرفت.

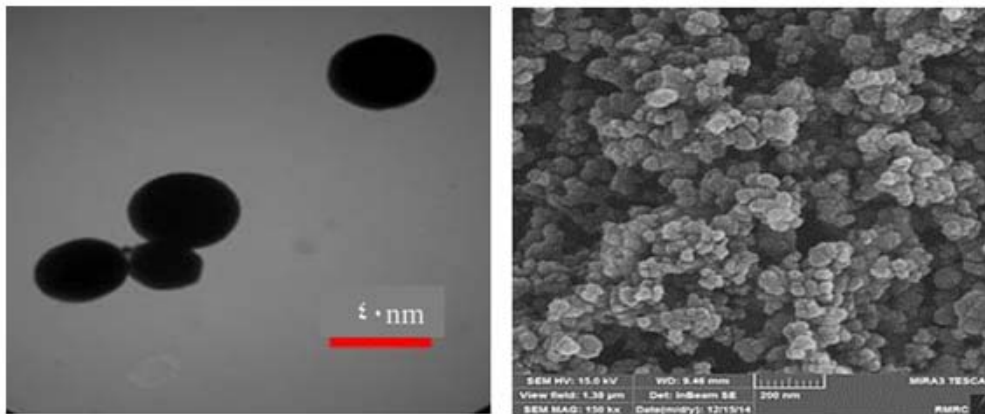
آنالیز آماری

برای تعیین حجم نمونه از خطای نوع اول و دوم و از جدول کوکران (Cochran) استفاده شد. در این مطالعه خطای نوع اول  $0/05$  و خطای نوع دوم ۱۰ درصد در نظر گرفته شد. جهت بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کلموگروف - اسمیرنوف استفاده گردید. داده‌ها به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شدند. داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SPSS مدل ۲۲ و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و تست آماری Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح  $P < 0/05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

تغییرات وزن موش و کبد

در بررسی وزن حیوانات مورد مطالعه، پس از اتمام دوره تیمار در بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نداد

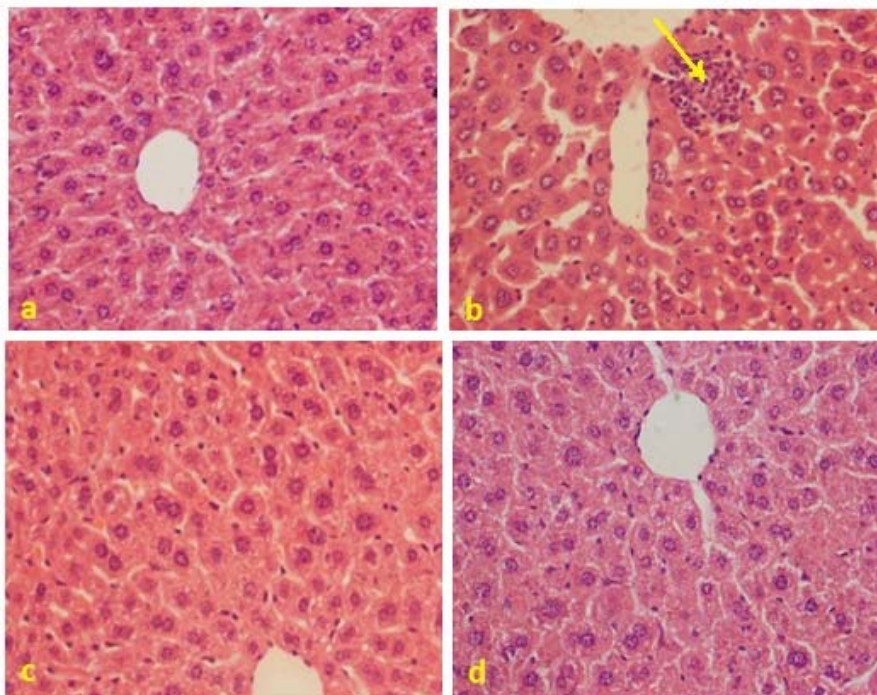


**Details:**

Silver Nano powder (Ag, metal basis)  
 True density: 10.5g/cm<sup>3</sup>  
 APS: 40 nm      SSA: ~15-20 m<sup>2</sup>/g

Morphology: spherical  
 Purity: 99.99%  
 Color: black

شکل شماره ۱- تصویر نانوذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM



شکل شماره ۲- تصاویر میکروسکوپی تهیه شده از بافت کبد موش های نر NMRI در گروه های مختلف پس از ۴۵ روز تیمار با نانوذرات نقره (۵۰۰ mg/kg/day) و کارواکرول (۱۰۰ mg/kg/day). (a) نشان دهنده بافت طبیعی کبد در گروه کنترل. (b) التهاب کبد و تراکم لنفوسیت در گروه دریافت کننده نانوذرات نقره با فلش نشان داده شده. (c) بافت طبیعی در گروه کارواکرول. (d) بهبودی ساختار کبد نزدیک به گروه کنترل در گروه دریافت کننده کارواکرول + نانوذرات نقره. (برش های ۵ میکرونی، رنگ آمیزی H&E بزرگنمایی X ۴۰۰)

جدول شماره ۱- مقایسه‌ی میانگین وزن موش و وزن کبد در گروه‌های مختلف موش نر بالغ پس از ۴۵ روز تیمار با نانوذرات نقره (mg/kg/day) و کارواکول (۵۰۰ mg/kg/day) و کارواکول (۱۰۰ mg/kg/day)

گروه‌ها	میانگین وزن اولیه موش (گرم)	میانگین وزن ثانویه موش (گرم)	میانگین وزن کبد (گرم)
کنترل	۳۵/۹۴±۰/۲۲ <sup>a</sup>	۳۸/۴۳±۰/۷۳ <sup>a</sup>	۵/۶۲±۰/۳۱ <sup>a</sup>
شم	۳۵/۶±۰/۰۷ <sup>a</sup>	۳۸/۶±۱/۱ <sup>a</sup>	۵/۶۳±۰/۳۱ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره	۳۶/۱۳±۰/۵۳ <sup>a</sup>	۳۶/۹۵±۰/۸۸ <sup>a</sup>	۵/۱۶±۰/۱۳ <sup>a</sup>
کارواکول	۳۶/۴۸±۰/۵۴ <sup>a</sup>	۳۸/۴۲±۰/۵۴ <sup>a</sup>	۵/۶۶±۰/۳۰ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره + کارواکول	۳۶/۶±۰/۲۳ <sup>a</sup>	۳۷/۹۱±۱/۴۲ <sup>a</sup>	۵/۴۳±۰/۲۳ <sup>a</sup>

مقادیر به صورت  $\bar{X} \pm SD$  می‌باشند. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند ( $P < 0.05$ , one way ANOVA, Tukey test).

جدول شماره ۲- مقایسه‌ی میانگین حجم کبد ( $mm^3$ )، قطر سلول‌های هیپاتوسیت ( $\mu m^3$ )، قطر هسته هیپاتوسیت ( $\mu m^3$ ) و تعداد سلول‌های هیپاتوسیت ( $10^8$ ) در گروه‌های مختلف موش نر بالغ پس از ۴۵ روز تیمار با نانوذرات نقره (۵۰۰ mg/kg/day) و کارواکول (۱۰۰ mg/kg/day).

گروه‌ها	حجم کبد ( $mm^3$ )	قطر هیپاتوسیت ( $\mu m^3$ )	قطر هسته هیپاتوسیت ( $\mu m^3$ )	تعداد هیپاتوسیت ( $10^8$ )
کنترل	۱۲۶۸/۶۵±۳۰/۸۹ <sup>a</sup>	۵۵۵۲/۸۳±۲۵۹/۱۸ <sup>a</sup>	۴۸۶/۱۹±۷۶/۸ <sup>a</sup>	۳/۵۳±۰/۲۵ <sup>a</sup>
شم	۱۲۴۸/۶۵±۲۵/۱۸ <sup>a</sup>	۵۵۰۲/۸۳±۲۵۱/۱۸ <sup>a</sup>	۴۷۶/۱۹±۷۲/۵ <sup>a</sup>	۳/۳۳±۰/۲۵ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره	۱۱۲۵/۲۶±۵۴/۳۹ <sup>b</sup>	۴۵۱۷/۵۰±۳۴۴/۳۶ <sup>b</sup>	۳۰۲/۶۸±۶۱/۷۸ <sup>b</sup>	۲/۲۳±۰/۱۴ <sup>b</sup>
کارواکول	۱۳۰۶/۶۶±۶۷/۲۴ <sup>a</sup>	۵۴۰۳/۸۳±۳۰۵/۲۴ <sup>a</sup>	۴۴۴/۱۵±۸۵/۶۵ <sup>a</sup>	۳/۴۵±۰/۱۱ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره + کارواکول	۱۲۳۹/۲۴±۳۹/۱۵ <sup>a</sup>	۵۱۷۰/۵۰±۵۲۲/۳۴ <sup>a</sup>	۴۱۸/۵۴±۵۳/۴۷ <sup>a</sup>	۳/۱۸±۰/۱۲ <sup>a</sup>

مقادیر به صورت  $\bar{X} \pm SD$  می‌باشند. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند ( $P < 0.05$ , one way ANOVA, Tukey test).

جدول شماره ۳- میانگین حجم سلول هیپاتوسیت، حجم سینوزوئید و حجم ورید مرکزی برحسب ( $mm^3$ ) در گروه‌های مختلف موش نر بالغ پس از ۴۵ روز تیمار با نانوذرات نقره (۵۰۰ mg/kg/day) و کارواکول (۱۰۰ mg/kg/day).

گروه‌ها	حجم هیپاتوسیت ( $mm^3$ )	حجم سینوزوئید ( $mm^3$ )	حجم ورید مرکزی ( $mm^3$ )
کنترل	۹۳۴/۶۸±۲۱/۴۷ <sup>a</sup>	۶۶/۵۷±۸/۹۹ <sup>a</sup>	۱۶۱/۴۵±۵/۶۸ <sup>a</sup>
شم	۹۲۴/۶۸±۲۷/۴۷ <sup>a</sup>	۶۳/۵۷±۷/۹۷ <sup>a</sup>	۱۶۰/۱۵±۷/۶۸ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره	۸۰۰/۲۷±۳۲/۱۱ <sup>b</sup>	۱۰۴/۹۵±۱۷/۹۲ <sup>b</sup>	۱۲۴/۷۹±۱۲/۴۰ <sup>b</sup>
کارواکول	۹۴۷/۵۰±۳۰/۳۲ <sup>a</sup>	۶۵/۲۸±۶/۱۷ <sup>a</sup>	۱۵۸/۱۳±۶/۸۵ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره + کارواکول	۹۱۱/۴۲±۳۰/۳۳ <sup>a</sup>	۷۹/۶۲±۵/۶۶ <sup>a</sup>	۱۴۷/۹۹±۷/۸۸ <sup>a</sup>

مقادیر به صورت  $\bar{X} \pm SD$  می‌باشند. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند ( $P < 0.05$ , one way ANOVA, Tukey test).

جدول شماره ۴- میانگین حجم ورید پورتال، حجم شریان و حجم بافت بینابینی برحسب ( $mm^3$ ) در گروه‌های مختلف موش نر بالغ پس از ۴۵ روز تیمار با نانوذرات نقره (۵۰۰ mg/kg/day) و کارواکول (۱۰۰ mg/kg/day).

گروه‌ها	حجم ورید پورتال ( $mm^3$ )	حجم شریان ( $mm^3$ )	حجم بافت بینابینی ( $mm^3$ )
کنترل	۶۹/۰۳±۳/۲۱ <sup>a</sup>	۹/۰۵±۰/۲۲ <sup>a</sup>	۱۸/۲۲±۰/۴۴ <sup>a</sup>
شم	۶۵/۰۳±۳/۷۱ <sup>a</sup>	۹/۱۵±۰/۲۷ <sup>a</sup>	۱۸/۱۲±۰/۴۷ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره	۵۷/۵۳±۲/۹۴ <sup>b</sup>	۸/۰۴±۰/۳۷ <sup>b</sup>	۱۶/۰۳±۰/۸۳ <sup>b</sup>
کارواکول	۷۰/۲۹±۷/۳۱ <sup>a</sup>	۹/۳۲±۰/۴۸ <sup>a</sup>	۱۸/۶۶±۰/۹۶ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره + کارواکول	۶۷/۴۶±۵/۳۶ <sup>a</sup>	۸/۸۴±۰/۲۷ <sup>a</sup>	۱۷/۶۷±۰/۵۴ <sup>a</sup>

مقادیر به صورت  $\bar{X} \pm SD$  می‌باشند. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند ( $P < 0.05$ , one way ANOVA, Tukey test).

جدول شماره ۵- مقایسه میانگین غلظت مالوندی آلدئید (MDA)، میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام و مقدار آنزیم‌های کبدی در گروه‌های مختلف موش نر بالغ پس از ۴۵ روز تیمار با نانوذرات نقره (۵۰۰ mg/kg/day) و کارواکترول (۱۰۰ mg/kg/day).

گروه‌ها	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (nmol/ml)	MDA (nmol/ml)
کنترل	۶۸/۱۸±۸/۹۷ <sup>a</sup>	۱۲۰/۱۱±۱۷/۱۸ <sup>a</sup>	۰/۵۵±۰/۰۴ <sup>a</sup>	۲/۱۲±۰/۲۶ <sup>a</sup>
شم	۷۰/۱۸±۹/۴۷ <sup>a</sup>	۱۲۷/۱۱±۱۲/۱۸ <sup>a</sup>	۰/۵۳±۰/۰۲ <sup>a</sup>	۲/۳۲±۰/۳۶ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره	۱۰۸/۹۷±۱۲/۲۴ <sup>b</sup>	۱۸۵/۷۵±۱۰/۳۱ <sup>b</sup>	۰/۳۴±۰/۰۱ <sup>b</sup>	۳/۳۶±۰/۴۶ <sup>b</sup>
کارواکترول	۵۶/۳۳±۷/۸۰ <sup>a</sup>	۱۲۴/۴۱±۹/۱۷ <sup>a</sup>	۰/۵۳±۰/۰۳ <sup>a</sup>	۱/۷۱±۰/۲۰ <sup>a</sup>
نانوذرات نقره + کارواکترول	۶۲/۸۹±۱۴/۲۹ <sup>a</sup>	۱۳۸/۵۲±۱۸/۵۸ <sup>a</sup>	۰/۴۲±۰/۰۲ <sup>a</sup>	۲/۲۰±۰/۳۰ <sup>a</sup>

مقادیر به صورت mean ± SD می‌باشند. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند. (AST: (one way ANOVA, Tukey test, P<0.05) aspartate transaminase; ALT: alanine transaminase

## بحث

تحقیقات مختلف فوق‌الذکر مقدار دوز مصرفی نانوذرات نقره و مدت تیمار، اثری بر وزن حیوان نداشته بلکه فقط بر عملکرد بافت‌های بدن تأثیر می‌گذارد. از سویی دیگر، طبق نتایج این تحقیق مصرف کارواکترول هیچ‌گونه تغییری در وزن بدن و وزن کبد نشان نداد که این مطلب مطابق با نتایج دیگران است [۱۲]. از دیگر نتایج این مطالعه، اتساع سینوزوئیدها، کاهش در میانگین حجم ورید مرکزی و کاهش حجم بافت بینابینی در گروه تیمار با نانوذرات نقره می‌باشد. در مطالعه نجاران و همکاران در سال ۲۰۱۴ بر روی رت‌های تیمار شده با نانوذرات نقره با دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ به مدت ۲۸ روز، التهاب، تجمع دانه‌های چربی، تورم و اتساع در سلول‌های اطراف ورید مرکزی مشاهده شد [۳۸]. در بررسی دیگری که توسط حیدری‌نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۵ روی موش‌های بالسی در گروه تیمار نانوذرات نقره با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۱۴ روز به صورت خوراکی انجام گرفت، التهاب و پرخونی و همچنین افزایش حجم سینوزوئیدها دیده شدند [۳۹]. نتایج هیستوپاتولوژی مطالعه دیگر که توسط لقمان و همکاران در سال ۲۰۱۲ روی بافت کبد جوجه به مدت ۴۲ روز و با تیمار نانوذرات نقره با دوز ۱۲ میلی‌گرم بر لیتر انجام گرفت، نشان‌دهنده تورم سلول‌ها در اطراف ورید مرکزی همچنین نکروز در سلول‌های هپاتوسیت بود [۴۰]. در مطالعه حاضر نیز افزایش حجم سینوزوئیدها و کاهش حجم سلول هپاتوسیت و همچنین کاهش حجم بافت بینابینی دیده شد که مطابق با نتایج مطالعه‌ی لقمان و همکاران می‌باشد. همچنین سلول‌های اطراف ورید مرکزی که مدخل ورودی خون هستند تحت تأثیر سمیت ناشی از نانوذرات نقره، ملتهب شده و اتساع می‌یابند. علاوه بر این، تجمع سلول‌های کوپفر در اطراف ورید مرکزی نیز دیده می‌شود که این عوامل باعث تقلیل حجم لومن داخلی ورید مرکزی می‌گردند. به نظر می‌رسد که کاهش حجم بافت بینابینی در گروه تیمار با نانوذرات نقره نتیجه وجود سلول‌های آماسی و التهاب ایجاد شده توسط ROS در اثر وجود نانوذرات نقره

نتایج مطالعه در گروه تیمار با نانوذرات نقره نشان‌دهنده کاهش معنی‌داری در میانگین حجم کل ورید مرکزی، حجم سلول و هسته هپاتوسیت، حجم ورید پورتال، حجم بافت همبند، تعداد کل سلول‌های هپاتوسیت و همچنین در ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی تام و نیز افزایش معناداری در حجم سینوزوئیدها، آنزیم‌های ALT و AST و پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد. از طرفی، کارواکترول توانست پارامترهای فوق در گروه تیمار هم‌زمان نانوذرات نقره و کارواکترول را تا حدود زیادی نزدیک به سطح گروه کنترل، بهبود بخشد. مطالعات مختلفی نشان داده که نانوذرات نقره در دوزهای بالا با تولید رادیکال‌های آزاد و تجمع آن‌ها باعث واکنش‌های التهابی بدن و تخریب میتوکندری‌ها و کاهش سطح GSH (گلوکوتانیون سولفات دهیدروژناز) و در نتیجه آزاد شدن فاکتورهای آپوپتوز از جمله سیتوکروم C و در نهایت موجب مرگ سلولی می‌شود [۳۴]. در بررسی‌های انجام گرفته در این تحقیق، تیمار موش‌های بالغ نژاد NMRI با نانوذرات نقره با دوز ۵۰۰ mg/kg/day به مدت ۴۵ روز، عدم تغییر وزن موش و وزن کبد را نشان دادند؛ به طوری که وزن نسبی کبد در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل و گروه کارواکترول کاهش داشت اما معنی‌دار نبود. در مطالعه‌ای که توسط Kim و همکاران در سال ۲۰۰۸ در گروه تیمار با نانوذرات نقره با غلظت ۳۰، ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی (گاواژ) انجام گرفت، تغییر قابل توجهی در وزن بدن نسبت به دوزهای نانوذرات نقره در طول آزمایش ۲۸ روزه دیده نشد [۳۵]. همچنین Rashno و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ پس از ۲۸ روز تزریق نانوذرات نقره با غلظت ۵ و ۵۰ mg/kg، تغییر وزن بدن را گزارش نکردند [۳۶]. از طرفی، در تحقیق Yu و همکاران در سال ۲۰۱۴، مصرف دهانی با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از نانوذرات نقره در زمان بارداری، سبب کاهش وزن نسبی و کاهش حجم کبد بدون اختلاف معنی‌دار در نوزادان رت شد [۳۷]. بنابراین، طبق



شد، افزایش MDA سرم خون بود [۴۴]. مطالعات نشان داد که مصرف نانوذرات نقره به ابعاد ۴۰ نانومتر با مقادیر ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر به صورت دهانی به مدت پنج هفته، سبب افزایش میزان MDA سرم خون موش می‌گردد. همچنین مشخص گردید که اثرات فوق وابسته به دوز بوده و با افزایش دوز مصرفی نانوذرات نقره، این اثرات مضر نیز شدت می‌یابد [۴۷]. از طرف دیگر، مطالعه سمرقندی و همکارانش در سال ۲۰۱۶ نشان داد که کارواکرول باعث کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید بافت و افزایش سطح آنتی‌اکسیدانی می‌گردد [۴۸]. امروزه مشخص شده است که مصرف کارواکرول باعث کاهش مرگ سلول‌های کبدی، به دنبال القاء ایسکمی-ریپرفیوژن کبدی با مصرف نانوذرات نقره می‌شود و کاهش مرگ این سلول‌ها مربوط به مهار استرس اکسیداتیو و جلوگیری از تجمع رادیکال‌های آزاد می‌باشد [۴۹]. بنابراین کارواکرول از تشکیل رادیکال‌های آزاد و تشکیل پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری و به‌عنوان یک جاذب رادیکال عمل می‌کند و پراکسیداسیون لیپیدی را در داخل بدن و در شرایط آزمایشگاهی مهار می‌کند. این نتایج هم‌راستا با مطالعات قبلی [۱۰، ۱۲، ۴۸، ۴۹] است. در مطالعه حاضر میزان آنزیم‌های آنالین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارات آمینوترانسفراز (ALT) در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد. آنزیم‌های ALT و AST از مهم‌ترین آنزیم‌های موجود در سلول‌های کبدی هستند که در سیتوپلاسم سلول‌های کبدی چندین مرتبه بیشتر از مایع خارج سلولی بوده و زمانی که به غشای سلول‌های کبدی صدمه‌ای وارد شده و یا در صورت مرگ سلول‌های کبدی میزان آن در پلاسما افزایش می‌یابد که این افزایش نشانه‌ای از درجه وسعت ضایعات کبدی می‌باشد [۱۰]. مطالعه‌ای توسط حیدری‌نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۵ به‌منظور بررسی اثرات سمی نانوذرات نقره بر عملکرد کبد و برخی پارامترهای خونی موش نر و ماده به مدت ۱۴ روز انجام شد. در گروه‌های تیمار، دو دوز مختلف ۲۰ و ۵۰ محلول نانوذرات نقره به صورت خوراکی تجویز شد. تغییرات قابل توجهی در سطح آنزیم‌های کبدی در گروه‌های تیمار و کنترل مشاهده شد، به طوری که در هر دو دوز، سطوح ALT و AST در موش‌های تیمار شده با نانوذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل به‌طور قابل توجهی افزایش یافت [۴۱]. Awashti و همکارانش در سال ۲۰۱۵ گزارش دادند که تیمار با نانوذرات نقره در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی در موش‌های آلبینو سوئسی باعث افزایش آنزیم‌های کبدی و همچنین تغییرات هیستوپاتولوژیکی مانند پرخونی و نکروز در کبد می‌گردد [۵۰]. احتمالاً رادیکال‌های آزاد حاصل از نانوذرات نقره به آسیب به کبد باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشای آن و در نتیجه کاهش سیالیت غشاء و از بین رفتن ساختمان و عملکرد

می‌باشد [۴۱]. مطالعه حاضر کاهش معناداری در قطر هیاتوسیت‌ها، قطر هسته هیاتوسیت‌ها، تعداد هیاتوسیت‌ها و همچنین کاهش حجم کل کبد در گروه تیمار با نانوذرات نقره نسبت به سایر گروه‌های تیماری را نشان داد که حاکی از آسیب‌های بافتی گوناگونی از جمله واکنش و گرانوله شدن سیتوپلاسم برخی سلول‌ها، دژنراسیون برخی از سلول‌های کبدی، آماس سلول‌ها، پرخونی و نکروز می‌باشد. در مطالعه جمع‌فرازه و همکاران در سال ۲۰۱۵ روی موش‌ها، مصرف خوراکی نانوذرات نقره باعث واکنش شدن سیتوپلاسم هیاتوسیت‌ها، دژنراسیون و نکروز برخی سلول‌ها و تجمع کانونی سلول‌های آماسی در کبد همراه با پرخونی می‌شود. این آزمایش نشان داد که استفاده از نانوذرات نقره به صورت خوراکی باعث آسیب بافت کبد موش‌ها می‌شود [۴۲]. طبق مطالعه‌ای که توسط Gopinath و همکارانش در سال ۲۰۰۸ روی نانوذرات نقره انجام شد، مشخص گردید که نانوذرات نقره به راحتی می‌توانند از غشای سلول عبور و باعث پارگی غشاء سلولی و در نتیجه نکروز سلول‌های بدن از جمله سلول‌های کبدی شوند [۴۳]. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۰ به‌منظور بررسی اثرات نانوذرات نقره روی کبد گربه‌ماهی آفریقای (Clarias *garepinus*) با غلظت (۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر) و اندازه (۲۰ و ۴۰ نانومتر) انجام گرفت، تغییرات هیستوپاتولوژی شامل تکثیر سلول‌های کبدی، هسته‌های پیکنوتیک، تجمع ملانوماکروفازها، نکروز کبدی، پارگی دیواره ورید مرکزی و سلول‌های آپوپتوز در کبد گربه‌ماهی آفریقای را نشان داد [۴۴]. آتروفی سلول‌ها می‌تواند دلیلی بر کاهش تعداد هیاتوسیت‌ها در این تحقیق باشد که حجم کبد نیز با کاهش حجم هیاتوسیت‌ها، کاهش یافته است. علاوه بر این در مطالعه حاضر، کاهش حجم کل کبد و همچنین کاهش حجم هیاتوسیت و هسته آن، می‌تواند ناشی از تیمار با غلظت بالایی از نانوذرات نقره در مدت طولانی‌تر در این مطالعه، نسبت به مطالعات گذشته باشد [۴۳]. همچنین در این مطالعه سطح مالون‌دی‌آلدئید در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری یافت. از مهم‌ترین پیامد استرس اکسیداتیو، تخریب اکسیداتیو ماکرومولکول‌های مهمی نظیر پروتئین‌ها، DNA و لیپیدها است. پراکسیداسیون لیپیدها منجر به کاهش سیالیت غشاء و از بین رفتن ساختمان و عملکرد آن می‌شود. مالون‌دی‌آلدئید مدت‌هاست که به علت این‌که با تیوباربتوریک‌اسید به آسانی واکنش می‌دهد، به‌عنوان بیومارکر مناسب برای پراکسیداسیون لیپیدی شناخته شده است [۴۵]. در مطالعه آزمایشگاهی توسط Arora و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد که قرار گرفتن در معرض نانوذرات نقره ۷۰-۲۰ نانومتری، باعث کاهش در GSH و افزایش سطح ROS می‌شود [۴۶]. نتیجه‌ی مطالعه‌ای که توسط Sichani و همکاران روی رت‌های آلبینو به مدت ۳۰ روز با دوز ۵۰۰ ppm نانوذرات نقره انجام

### نتیجه‌گیری

کارواکرول با خواص آنتی‌اکسیدانی با افزایش ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی تام و کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی ALT و AST و نیز کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و سطح مالون‌دی‌آلدنید، توانست سمیت ناشی از نانوذرات نقره روی بافت کبد را کاهش دهد. به نظر می‌رسد که نانوذرات نقره قادر به القاء سمیت استرس اکسیداتیو و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشند که باعث تغییرات ساختاری بافت کبد شده است.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل پایان‌نامه دانشجویی بوده است. بدین‌وسیله از کلبه افراد مربوط به‌خصوص آقای فراهانی و خانم نجمه اسکندری که در انجام این تحقیق ما را یاری دادند، تشکر و قدردانی می‌شود.

### References:

- [1] Alagawany M, El-Hack M, Farag MR, Tiwari R, Dhama K. Biological effects and modes of action of carvacrol in animal and poultry production and health-a review. *Adv Anim Vet Sci* 2015; 3(2): 73-84.
- [2] Melo FHC, Moura BA, de Sousa DP, de Vasconcelos SMM, Macedo DS, Fonteles MMdF, et al. Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. *Fundam Clin Pharmacol* 2011; 25(3): 362-7.
- [3] Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, del Mar Contreras M, et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytother Res* 2018; 32(9): 1675-87.
- [4] Arunasree K. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine* 2010; 17(8-9): 581-8.
- [5] Garcia C, Talarico L, Almeida N, Colombres S, Duschatzky C, Damonte E. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phytother Res* 2003; 17(9): 1073-5.
- [6] Trabace L, Zotti M, Morgese MG, Tucci P, Colaianna M, Schiavone S, et al. Estrous cycle affects the neurochemical and neurobehavioral profile of carvacrol-treated female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 255(2): 169-75.
- [7] Ozer EK, Goktas MT, Toker A, Bariskaner H, Ugurluoglu C, Iskit AB. Effects of carvacrol on survival, mesenteric blood flow, aortic function and multiple organ injury in a murine model of polymicrobial sepsis. *Inflammation* 2017; 40: 1654-63.
- [8] Khazdair MR, Ghorani V, Alavinezhad A, Boskabady MH. Pharmacological effects of Zataria

آن شده و متعاقباً منجر به افزایش غلظت آنزیم‌های کبدی در خون شده است [۳۵]. بنابراین افزایش سطح این آنزیم‌ها دلیلی بر آسیب غشای میتوکندری و غشای هپاتوسیت‌های کبد به‌علت حمله اکسیدانی رادیکال‌های آزاد حاصل از نانوذرات نقره می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نیز تأییدکننده پژوهش‌های گذشته [۴۱، ۵۰] است. امروزه مشخص شده است که مصرف کارواکرول باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی ALT و AST می‌شود [۱۰، ۱۲]. در مطالعه حاضر نیز کارواکرول توانست با کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کاهش سطح مالون‌دی‌آلدنید و نیز کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی ALT و AST، اثرات سمی نانوذرات نقره در بافت کبد را خنثی نماید. این نتایج هم‌راستا با مطالعات قبلی است [۱۰، ۱۲]. عدم امکان بررسی‌های مولکولی اثرات نانوذرات نقره بر بافت کبد و نیز عدم امکان آنالیز مولکولی اثرات کارواکرول و هم‌زمان اثرات هر یک از ترکیبات بر بافت کبد، از محدودیت‌های این پژوهش به‌شمار می‌آید.

- multiflora Boiss L. and its constituents focus on their anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects. *Fundam Clin Pharmacol* 2018; 32(1): 26-50.
- [9] Hussein J, El-Banna M, Mahmoud KF, Morsy S, Latif YA, Medhat D, et al. The therapeutic effect of nano-encapsulated and nano-emulsion forms of carvacrol on experimental liver fibrosis. *Biomed Pharmacother* 2017; 90: 880-7.
- [10] Mortazavi A, Kargar HMP, Beheshti F, Anaeigoudari A, Vaezi G, Hosseini M. The effects of carvacrol on oxidative stress, inflammation, and liver function indicators in a systemic inflammation model induced by lipopolysaccharide in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 2023; 93(2): 111-21.
- [11] Zhao W, Chen L, Zhou H, Deng C, Han Q, Chen Y, et al. Protective effect of carvacrol on liver injury in type 2 diabetic db/db mice. *Mol Med Rep* 2021; 24(5): 1-11.
- [12] Mohseni R, Karimi J, Tavilani H, Khodadadi I, Hashemnia M. Carvacrol ameliorates the progression of liver fibrosis through targeting of Hippo and TGF- $\beta$  signaling pathways in carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced liver fibrosis in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2019; 41(1): 163-71.
- [13] Naganthran A, Verasoundarapandian G, Khalid FE, Masarudin MJ, Zulkharnain A, Nawawi NM, et al. Synthesis, Characterization and Biomedical Application of Silver Nanoparticles. *Materials* 2022; 15(2): 427.
- [14] Xu L, Wang Y-Y, Huang J, Chen C-Y, Wang Z-X, Xie H. Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics* 2020; 10(20): 8996.

- [15] Wang ZX, Chen CY, Wang Y, Li FXZ, Huang J, Luo ZW, et al. Ångstrom-Scale Silver Particles as a Promising Agent for Low-Toxicity Broad-Spectrum Potent Anticancer Therapy. *Adv Funct Mater* 2019; 29(23): 1808556.
- [16] Dziezic A, Kubina R, Bułdak RJ, Skonieczna M, Cholewa K. Silver nanoparticles exhibit the dose-dependent anti-proliferative effect against human squamous carcinoma cells attenuated in the presence of berberine. *Molecules* 2016; 21(3): 365.
- [17] Xu L, Shao A, Zhao Y, Wang Z, Zhang C, Sun Y, et al. Neurotoxicity of silver nanoparticles in rat brain after intragastric exposure. *J Nanosci Nanotechnol* 2015; 15(6): 4215-23.
- [18] Miethling-Graff R, Rumpker R, Richter M, Verano-Braga T, Kjeldsen F, Brewer J, et al. Exposure to silver nanoparticles induces size- and dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicol In Vitro* 2014; 28(7): 1280-9.
- [19] Ong C, Lee Q, Cai Y, Liu X, Ding J, Yung L, et al. Silver nanoparticles disrupt germline stem cell maintenance in the Drosophila testis. *Sci Rep* 2016; 6: 20632.
- [20] Gaiser BK, Hirn S, Kermanizadeh A, Kanase N, Fytianos K, Wenk A, et al. Effects of silver nanoparticles on the liver and hepatocytes in vitro. *Toxicol Sci* 2013; 131(2): 537-47.
- [21] Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt RH. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS nano* 2010; 4(11): 6903-13.
- [22] Wilhelm EA, Jesse CR, Roman SS, Nogueira CW, Savegnago L. Hepatoprotective effect of 3-alkynyl selenophene on acute liver injury induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide. *Exp Mol Pathol* 2009; 87(1): 20-6.
- [23] Wong K-H, Nam H-Y, Lew SY, Naidu M, David P, Kamalden TA, et al. Discovering the Potential of Natural Antioxidants in Age-Related Macular Degeneration: A Review. *Pharmaceuticals* 2022; 15(1): 101.
- [24] Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 2008; 88(4): 1243-76.
- [25] Hsseinigouzdagani M, Geyikoglu F, Çolak S, Türkez H, Bakir TO, Bakir M. The Efficacy of Carvacrol on Renal Damage in Rats with Acute Pancreatitis. *J Essent Oil-Bear Plants* 2014; 17(5): 847-58.
- [26] Shariatzadeh MA, Maleki P. Evaluation of the protective effect of Nigella sativa oil on liver in NMRI male mice following silver nanoparticles toxicity. *J Anim Res* 2020; 33(3): 252-64. [in Persian].
- [27] Bakir M, Geyikoglu F, Colak S, Turkez H, Bakir TO, Hosseinigouzdagani M. The carvacrol ameliorates acute pancreatitis-induced liver injury via antioxidant response. *Cytotechnology* 2016; 68(4): 1131-46.
- [28] Noorafshan A, Esmail-Zadeh B, Bahmanpour S, Poost-Pasand A. Early stereological changes in liver of Sprague-Dawley rats after streptozotocin injection. *Indian J Gastroenterol* 2005; 24(3): 104.
- [29] Moezi L, Arshadi SS, Motazedian T, Seradj SH, Dehghani F. Anti-diabetic effects of amygdalus lycioides spach in streptozocin-induced diabetic rats. *Iran J Pharm Res* 2018; 17(1): 353-64.
- [30] Hoseini L, Roozbeh J, Sagheb M, Karbalay-Doust S, Noorafshan A. Nandrolone decanoate increases the volume but not the length of the proximal and distal convoluted tubules of the mouse kidney. *Micron* 2009; 40(2): 226-30.
- [31] Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(5): 1100-23.
- [32] Mehranjani MS, Noorafshan A, Momeni H, Abnosi M, Mahmoodi M, Anvari M, et al. Stereological study of the effects of vitamin E on testis structure in rats treated with para-nonylphenol. *Asian J Androl* 2009; 11(4): 508-16.
- [33] Mayerhöfer TG, Mutschke H, Popp J. Employing theories far beyond their limits—the case of the (Boguer-) beer-lambert law. *Chem Phys Chem* 2016; 17(13): 1948-55.
- [34] Faedmaleki F, Shirazi FH, Salarian A-A, Ashtiani HA, Rastegar H. Toxicity effect of silver nanoparticles on mice liver primary cell culture and HepG2 cell line. *Iran J Pharm Res* 2014; 13(1): 235-42.
- [35] Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol* 2008; 20(6): 575-83.
- [36] Rashno M, Fatemi Tabatabaei SR, Khaksary Mahabady M, Ghaderi S. Maternal exposure to silver nanoparticles in mice: effects on dams' reproductive performance and pups' neurobehavioral ontogeny. *Anat Sci J* 2014; 11(1): 41-52.
- [37] Yu W-J, Son J-M, Lee J, Kim S-H, Lee I-C, Baek H-S, et al. Effects of silver nanoparticles on pregnant dams and embryo-fetal development in rats. *Nanotoxicology* 2014; 8(sup1): 85-91.
- [38] Najjaran A, Moghaddam NA, Zarchi SR, Mohsenifar J, Rasoolzadeh R. Toxicity effects of nanosilver on liver enzymes, liver and lung tissues. *Int J Biol Biomed Eng* 2014; 1(1): 11-5.
- [39] Heydarnejad MS, Yarmohammadi-Samani P, Mobini Dehkordi M, Shadkhist M, Rahnema S. Histopathological effects of nanosilver (Ag-NPs) in liver after dermal exposure during wound healing. *Nanomed J* 2014; 1(3): 191-7.
- [40] Loghman A, Iraj SH, Naghi DA, Pejman M. Histopathologic and apoptotic effect of nanosilver in liver of broiler chickens. *Afr J Biotechnol* 2012; 11(22): 6207-11.

- [41] Heydrnejad MS, Samani RJ, Aghaeivanda S. Toxic effects of silver nanoparticles on liver and some hematological parameters in male and female mice (*Mus musculus*). *Biol Trace Elem Res* 2015; 165(2): 153-8.
- [42] Jafarzadeh R. A survey of acute histopathological effects of silver nanoparticles on liver, kidney with blood cells during oral administration in male mice (*Mus musculus*). *J Shahrekord Univ Med Sci* 2015; 17(4): 97-107.
- [43] Gopinath P, Gogoi SK, Chattopadhyay A, Ghosh SS. Implications of silver nanoparticle induced cell apoptosis for in vitro gene therapy. *Nanotechnology* 2008; 19(7): 075104.
- [44] Naguib M, Mahmoud UM, Mekkawy IA, Sayed AE-DH. Hepatotoxic effects of silver nanoparticles on *Clarias gariepinus*; Biochemical, histopathological, and histochemical studies. *Toxicol Rep* 2020; 7: 133-41.
- [45] Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014.
- [46] Arora S, Jain J, Rajwade J, Paknikar K. Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies. *Toxicol Lett* 2008; 179(2): 93-100.
- [47] Yavari M, Talebi A, Rezaie Zarchi SRS, SAR. Effects of Different Doses of Silver Nanoparticles on Sperm Parameters, Chromatin Structure and DNA Integrity in Mice. *J Cell Tissue* 2015; 6(2): 177-85. [in Persian]
- [48] Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F, Borji A. Protective effects of carvacrol against oxidative stress induced by chronic stress in rat's brain, liver, and kidney. *Biochem Res Int* 2016; 2016: 2645237.
- [49] Canbek M, Uyanoglu M, Bayramoglu G, Senturk H, Erkasap N, Koken T, et al. Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. *Phytomedicine* 2008; 15(6-7): 447-52.
- [50] Awasthi KK, Verma R, Awasthi A, Awasthi K, Soni I, John P. In vivo genotoxic assessment of silver nanoparticles in liver cells of Swiss albino mice using comet assay. *Adv Mater Lett* 2015; 6(3): 187-93.