

Investigation of the effect of essential oil from *Citrus aurantium* L. flowers on liver health parameters in a laboratory animal model

Hamed A^{1*}, Jamshidzadeh A², Dana M³, Pasdaran A⁴, Heidari R²

1- Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, I.R. Iran.

2- Pharmaceutical Sciences Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, I.R. Iran.

3- Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, I.R. Iran.

4- Medicinal Plant Processing Research Centre, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, I.R. Iran.

Received: 2019/07/14 | Accepted: 2020/02/16

Abstract:

Background: In Persian food culture, *Citrus aurantium* L. (bitter orange) flowers and essential oil are consumed as jams or plant distillate in high doses. Some concerns were mentioned in Persian traditional literature about their effects on the liver. This study aimed to investigate the effect of the essential oil from *C. aurantium* L. flowers on liver health parameters in a laboratory animal model.

Materials and Methods: The essential oil was extracted by Clevenger-type apparatus and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. Six groups of rats ($n=5$) received intraperitoneal or oral essential oil with the doses of (0.5, 1 or 2 g/kg) for 3 days. The two control groups received olive oil (the vehicle). Forty-eight hours after the last administration, serum and liver samples were prepared and alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) and glutathione (GSH) were determined. The liver histopathological changes was investigated.

Results: The main ingredients of the essential oils were linalyl acetate, terpinene-4-ol, linalool and phenethyl alcohol. The intraperitoneal administration of essential oil at doses higher than (1 g/kg) caused a significant increase in AST, ALT and LDH levels. Inflammation of the liver tissue was observed at oral and intraperitoneal doses higher than (1 g/kg).

Conclusion: The changes in AST, ALT and LDH levels showed that at high doses of the essential oil had a mild liver toxicity and the histopathologic data confirmed this. These complication were probably due to direct and non-oxidant toxicity and it was not due to the oxidative stress.

Keywords: Essential oil, Bitter orange blossom, Liver toxicity, Gas chromatography–mass spectrometry

***Corresponding Author:**

Email: azadeh.hamedi@gmail.com

Tel: 0098 713 242 4127

Fax: 0098 713 242 4256

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2020; Vol. 24, No 1, Pages 38-47

بررسی اثر اسانس بهارنارنج (*Citrus aurantium* L.) بر شاخص‌های سلامت کبدی در مدل حیوان آزمایشگاهی

آزاده حامدی^{۱*}، اکرم جمشیدزاده^۲، مهسا دانا^۳، اردلان پاسداران^۴، رضا حیدری^۲

خلاصه:

سابقه و هدف: در فرهنگ غذایی ایرانی، گل‌ها و اسانس بهارنارنج در قالب مریا و عرق‌جات در مقادیر بالا مصرف می‌شود. در طب سنتی ایرانی در مورد اثرات عرق بهارنارنج روی کبد نگرانی‌های ذکر شده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر اسانس بهارنارنج بر شاخص‌های سلامت کبدی در مدل حیوانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: اسانس بهارنارنج با کلونجر استخراج و توسط کروماتوگرافی گازی - جرمی آنالیز شد. سپس با دوزهای (g/kg) ۲ و ۱، (0/۵) به مدت سه روز به صورت تک‌دوز از طریق داخل‌صفاقی یا خوارکی برای شش گروه پنج تایی موش صحرایی تجویز شد. برای دو گروه کترل (1) روغن زیتون (حامل اسانس) تجویز شد. ۴ ساعت بعد از آخرین تجویز، نمونه‌گیری خون و بافت کبد جهت تعیین آلانین امینو ترانسفراز (ALT)، اسپارتات دهیدروژنаз (AST)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) و گلوتاتین (GSH) انجام شد و مطالعات هیستوپاتولوژیک صورت گرفت.

نتایج: ترکیبات اصلی اسانس، لیتالیل استات، ترپین-۴-ال، لیتالول و فنتیل الكل بود. تجویز صفاتی اسانس در دوزهای بالاتر از (g/kg) ۱) موجب افزایش معنی‌دار ALT و LDH شد. این اسانس در غلظت‌های بالاتر از (g/kg) ۱) در تجویز خوارکی و داخل‌صفاقی باعث التهاب بافت کبدی شد.

نتیجه‌گیری: تغییرات آنزیم‌های ALT و LDH و داده‌های هیستوپاتولوژی نشان داد که این اسانس در دوزهای بالا، دارای سمیت خفیف کبدی می‌باشد. این عارض ناشی از استرس اکسیداتیو نبوده، احتمالاً از طریق سمیت مستقیم و غیراکسیداتیو ایجاد می‌شود.

واژگان کلیدی: اسانس، بهارنارنج، سمیت کبدی، کروماتوگرافی گازی - جرمی
دو ماهنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۹، صفحات ۴۷-۳۸

قسمت مورد استفاده درخت نارنج، گل (شکوفه)، پوست میوه و آب نارنج می‌باشد که همگی دارای خواص غذایی و دارویی هستند. بهارنارنج شامل شکوفه‌های درخت نارنج است. از این شکوفها اسانس یا روغن فرار بهارنارنج تهیه می‌شود که به نام روغن نرولی (Neroli oil) معروف است و در صنایع غذایی، آرایشی - بهداشتی و دارویی کاربرد دارد. به علاوه اسانس بهارنارنج به صورت سنتی به عنوان مسکن و نیز جهت رفع مشکلات عصبی و بدخوابی مورد استفاده قرار می‌گیرد و در فرآوردهای ترکیبی آرام‌بخش به عنوان یکی از اجزای جانبی به کار می‌رود [۲]. از شکوفه‌های بهارنارنج پس از طی مراحل شیرین‌سازی جهت تهیه انواع مریا و مارمالاد استفاده می‌شود. به علاوه شکوفه‌های بهارنارنج به عنوان چاشنی و معطر کننده چای، بستنی و سایر شیرینی‌جات کاربرد دارد و عرق تهیه شده از بهارنارنج به عنوان نوشیدنی خوارکی و دارویی به مصرف می‌رسد. در طب سنتی ایران از آن به عنوان نشاط‌آور، مقوی مغز و ریه و دستگاه گوارش یاد شده است [۳-۵]. عرق بهارنارنج که در متون طب سنتی ایران تحت عنوان ماء‌القداح نامیده می‌شود، به عنوان عرقی ملطف و محلل معرفی شده است که می‌تواند جهت برخی انواع سردد (صداع بارد)، رفع ضعف مغز، رفع نزله‌ها، درد سینه،

مقدمه

فرآورده‌های مختلف حاصل از اندام‌های گیاهان جنس مركبات (Citrus) از دیرباز در فرهنگ غذایی و طب سنتی ایران کاربرد غذایی و دارویی داشته‌اند. اندام‌های مختلف گونه‌های این جنس حاوی ترکیبات فعالی مثل کومارین‌ها، فلاونوئیدها و مونوترپن‌ها می‌باشند [۱]. یکی از گونه‌های مركبات، نارنج با نام علمی Rutaceae از خانواده Citrus aurantium L. می‌باشد که از جمله گیاهان پر مصرف و بومی مناطق گرم و نیم گرم ایران از جمله استان‌های گیلان، مازندران و فارس است که با نام عمومی sour orange یا bitter orange شناخته می‌شود.

۱. دانشیار، گروه فارماکوگنوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۲. استاد، گروه سمشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۳. دانشجو، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۴. استادیار، مرکز تحقیقات فرآوری گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

***لشانی نویسنده مسئول:**

دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات فرآوری گیاهان دارویی، شیراز، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۶۳۰۸۲۲۷ - ۰۷۱۳۲۴۲۴۲۵۶

پست الکترونیک: azadeh.hamedi@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۱/۲۷ تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۲۳

عضلات قلب و بافت کبدی یافت و به هنگام آسیب بافتی درون خون آزاد می‌شود. این ویژگی لاکاتات دهیدروژناز، آن را به یک شاخص مهم برای شناسایی آسیب‌ها و بیماری‌های شایع در بدن تبدیل می‌کند. آسپارتات آمینو ترانسفراز و آلانین آمینو ترانسفراز، آنزیم‌های داخل سلولی منتقل کننده گروه آمین هستند که در مقادیر بالابی در سلول‌های کبدی یافت می‌شوند و به دنبال آسیب یا مرگ سلول‌های کبدی، این آنزیم‌ها داخل خون آزاد می‌شوند که در سرم قابل اندازه‌گیری هستند [۲۱]. آلانین آمینو ترانسفراز، مسؤول انتقال گروه آمین آلانین به ۲-اکسوجلوتارات و تولید گلوتامات و پپروات می‌باشد. درنهایت پپروات در واکنش با H^+ ، $NADH + NAD^+$ تولید NAD^+ می‌کند. تغییر در نسبت $NADH/NAD^+$ ارتباط مستقیمی با میزان فعالیت ALT دارد. GSH ترکیبی تیولی و غیرپروتئینی است که برای سمزدایی واسطه‌های فعلی و طبیعت نوکلوفیلی گروه سولفیدریل سیستئین در نظر گرفته شده، می‌تواند به الکتروفیل‌های بسیاری متصل شود و از آلکیلاسیون اجزای مهم GSH در سلول جلوگیری کند. GSH به عنوان کوفاکتور برای پراکسیداز و GSH ترانسفراز به کار می‌رود. سمزدایی هیدروپراکسیدهای اسیدهای چرب و هیدروژن پراکسید توسط این آنزیم‌ها صورت می‌گیرد که از GSH به عنوان کوفاکتور استفاده می‌کند [۲۲]. گونه‌های واکنش پذیر تیوباریتوريک اسید (TBARS) در اثر لیپید پرانسیداسیون ایجاد می‌شوند. از آنجایی که گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن (ROS) دارای نیمه‌عمر کوتاه هستند، اندازه‌گیری آن‌ها به طور مستقیم دشوار است. در عوض، می‌توان محصولات آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو مانند TBARS را اندازه‌گیری نمود [۲۳].

مواد و روش‌ها

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از شرکت مرک (آلمان) یا شرکت سیگما الدریچ (امریکا) تهیه شده‌اند.

استخراج اسانس بهارنارنج

ابتدا ۳ کیلوگرم شکوفه‌های بهارنارنج تازه از درختان نارنج شهرستان فیروزآباد در فصل بهار ۱۳۹۷ تهیه شد. شناسایی جنس و گونه گیاه توسط یک متخصص فارماکوکنوزی انجام شد و نمونه هرباریومی آن در هرباریوم مرکز تحقیقات فرآوری گیاهان دارویی به شماره ۹۸-۲ MPPRCM ثبت شد. شکوفه‌های بهارنارنج به مدت ۱۰ روز در دمای اتاق و دور از نور خورشید خشک شد. سپس گیاه خشک شده، آسیاب و با استفاده از کلرونجر اسانس آن استخراج شد. اسانس، داخل ظرف شیشه‌ای ریخته شد و تا روز آزمایش در یخچال و دور از نور نگهداری شد. درصد

تپش قلب، قولنج، تقویت اشتها، اسهال، نفخ، مشکلات قاعدگی و سنگ کلیه مفید باشد. به علاوه در برخی متون ذکر شده که مصرف آن در موارد اسپاسم بهویژه درد ناحیه شکم کودکان، ضعف اعصاب، بی‌خوابی‌های با منشأ عصبی، ضعف جریان گردش خون و ضعف نیروی جنسی می‌تواند مفید باشد [۳-۵]. در کتاب مخزن‌الادویه عرق بهارنارنج به عنوان مقوی معده ولی مضر کبد معروف شده است [۳]. آتالیز مواد تشکیل‌دهنده انسانس فرار گل‌ها و یا برگ‌های جوان این گیاه حاکی از وجود لیبانول، لیبانیل استات و لیمونن بوده است. به علاوه درصد قابل توجهی ترکیبات فلاونوئیدی در بهارنارنج شناسایی شده است [۶]. در مطالعات علمی ترکیبات فلاونوئیدی بهارنارنج اثر تقویت‌کننده‌ای را روی قدرت انقباضی قلب نشان داده‌اند [۹]. به علاوه برخی مطالعات اثرات ضدسوسنی، ضدترموبوز، ضدایسکمی، آنتی‌اکسیدانی، گشادکننده عروق و ضدالتهابی را نیز از فلاونوئیدهای گیاه بهارنارنج گزارش نموده‌اند. مهم‌ترین فلاونوئیدهای بهارنارنج شامل هسپریدین، نارینجین و نتوهسپریدین است که جزء دسته فلاونون می‌باشند. همچنین از دسته فلاونهای آن می‌توان به دئوسپن و آپی‌جنین اشاره نمود [۱۰-۱۴]. ترکیب لینانول موجود در بهارنارنج باعث کاهش بروز حمله‌های صرعی در مدل آزمایشگاهی موش‌سوری شده است [۱۵]. مقالات متعددی به اثرات آرامی‌بخش، ضداضطراب و ضدصرع اسانس بهارنارنج اشاره نموده‌اند [۱۷، ۱۶]. از عوارض مصرف بیش از حد فرآورده‌های حاصل از میوه نارنج می‌توان به آریتمی قلبی و تاکی کاردی اشاره نمود [۱۸-۲۰]. از طرفی علیرغم مصرف گسترده اسانس بهارنارنج به عنوان ماده غذایی و دارویی و نیز وجود مواد بیولوژیک مختلف در آن، عوارض احتمالی آن تاکنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. در برخی کتب طب سنتی نیز هشدارهایی مبنی بر عوارض سمیت کبدی بعد از استفاده از عرق بهارنارنج داده شده است اما تاکنون مطالعه علمی جهت بررسی اثرات مصرف اسانس و عرق بهارنارنج بر شاخص‌های سلامت کبدی یا سمیت آن گزارش نشده است. بنابراین هدف از انجام این مطالعه، بررسی سمیت کبدی غلظت‌های مختلف اسانس بهارنارنج در تجویز داخل صفاتی و خوراکی در مدل آزمایشگاهی موش صحرایی می‌باشد. جهت تعیین شاخص‌های سلامت کبدی به طور معمول، آزمون‌هایی جهت تعیین آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST)، لاکاتات دهیدروژناز (LDH)، گلوتاتین (GSH) و گونه‌های واکنش پذیر تیوباریتوريک اسید (TBARS) انجام می‌شود. لاکاتات دهیدروژناز آنزیمی است از گروه اکسیدوردوکتازها که به طور وسیعی تقریباً در تمام سلول‌های زنده، از جمله گلبول قرمز،

لوله‌ی آزمایش منتقل شد تا از لیز گلوبول‌ها جلوگیری شود. خون گرفته شده در دمای اتفاق لخته شده، سپس سرم با سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها (دور ۱۰۰۰، ۲۵ دقیقه) به دست آمد. سرم به دست آمده در دمای ۲۰- درجه برای انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد. پس از خون‌گیری، کل کبد جدا و به درون یک ظرف حاوی سدیم کلرید ۹/۰ درصد انتقال داده شد. بخشی از بافت کبد برای اندازه‌گیری میزان گلوتاتیون (GSH) و لیپید پراکسیداسیون پس از شستشو با نرمال سالین جدا شد و سپس بقیه بافت کبد در فرمالین قرار داده شد و برای بررسی اثرات هیستوپاتولوژیک مورد استفاده قرار گرفت.

روش اندازه‌گیری لیپید پراکسیداسیون در بافت پس از جداسازی، کبد (۵۰۰ میلی‌گرم) همراه با محلول خنک‌شده پتاویم کلرید ۱۵/۱ درصد، هموژئینه شد و محلول هموژن حاوی ۱۰ درصد بافت کبدی به دست آمد. سپس به ۵/۰ میلی‌لیتر از این محلول هموژن، ۳ میلی‌لیتر محلول فسفویک اسید (۱ درصد) و ۱ میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید (۶/۰ درصد) اضافه و در دمای ۱۰۰ درجه و به مدت ۴۵ دقیقه، حرارت داده شد. سپس به محلول خنک‌شده، به میزان ۴ میلی‌لیتر ان-بوتanol اضافه و خوب هم زده شد. بعد از سانتریفیوژ کردن، میزان جذب فاز ان-بوتanol در ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد و جهت تهیه منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلف از ۳-۳،۱،۱-تترا اتوکسی پروپان در متانول ساخته شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از تیوباربیتوریک اسید به آن اضافه و پس از آن تیوب‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و جذب آن‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان لیپید پراکسیداسیون در بافت نمونه‌ها با توجه به منحنی استاندارد محاسبه گردید [۲۵].

اندازه‌گیری میزان گلوتاتیون (GSH)

جهت اندازه‌گیری میزان GSH در بافت، مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از بافت کبد موش در ۸ میلی‌لیتر محلول خنک‌شده‌ی EDTA (۰/۲۰ مولار)، هموژنه شد، سپس ۵ میلی‌لیتر از محلول با ۴ میلی‌لیتر آب و ۱ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۵۰ درصد (W/V)، محلول شد. محلول به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه و ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی با بافر تریس ۴/۰ مولار و ۵-دی تیوبیس (۲-نیترو بنزویک اسید ۱/۰ مولار) محلول و جذب آن در ۴۱۲ نانومتر خوانده شد [۲۶]. جهت تهیه منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلفی از GSH در بافر تریس آماده و به هر کدام از تیوب‌ها ۰/۱ میلی‌لیتر DTNB اضافه و جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد [۲۶].

استخراج اسانس از بهار نارنج ۹۳/۱ درصد وزنی - وزنی بود.

آنالیز اسانس

جهت آنالیز اسانس از دستگاه کروماتوگرافی گازی-جرمی مدل 6890 HEWELTT-PACKARD مجهز به ستون مویینه ۵ HP استفاده شد. برنامه دمایی دستگاه به این ترتیب بود که دمای آن ابتدا روی ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه تنظیم شد، سپس با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد در دقیقه دما تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و پس از آن با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه تا ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد افزوده شد و ۱۰ دقیقه در این دما قرار گرفت. هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. شناسایی ترکیبات موجود در اسانس بهار نارنج، با استفاده از الگوی شکست جرمی، زمان بازداری، شاخص کواتس و در مقایسه با کتابخانه Willey انجام گرفت [۲۴].

حیوانات آزمایشگاهی و شرایط نگهداری

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و روی حیوان آزمایشگاهی رت انجام شده است. تعداد ۴۰ موش رت نر از نژاد اسپراغ دالی (با وزن حدود ۱۸۰-۲۵۰ گرم) به صورت گروههای ۵ تایی (تعداد ۸ گروه) در قفسه‌های استاندارد بر روی بستر خرده چوب نگهداری شدند و در تمام مدت آزمایش، موش‌ها در دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشناهی قرار داشتند. وزن موش‌ها در گروههای مختلف همگن بود و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت. درجه حرارت محیط 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد بود. کلیه کدهای اخلاقی جهت کار با حیوان آزمایشگاهی رعایت شد. این طرح با کد IR.SUMS.REC.1398.177 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز مصوب شده است.

ارزیابی آسیب کبدی اسانس بهار نارنج در مدل حیوانی

اسانس به دست آمده از شکوفه‌های بهار نارنج در دوزهای (۲ g/kg و ۱/۰۵) به مدت سه روز و یکبار در روز به روشن داخل صفاقی به موش‌ها تزریق شد. همچنین به سه گروه از موش‌ها به روشن مشابهی اسانس بهار نارنج به صورت خوراکی (گواژ) و به مدت سه روز تجویز شد. جهت تهیه غلظت‌های مختلف اسانس (۲ g/kg و ۱/۰۵)، از پایه روغن زیتون استفاده شد. در نهایت برای دو گروه کترل نیز مقدار (۱ g/kg) به صورت داخل صفاقی یا خوراکی روغن زیتون تجویز شد. ۴۸ ساعت بعد از آخرین تجویز دارو نمونه‌گیری انجام شد. برای بیهوش کردن موش‌ها داروی تیوپتال با دوز (۶۰ mg/kg) از طریق داخل صفاقی به موش‌ها تزریق شد و بعد از بیهوشی کامل، جراحی صورت گرفت. از آنورت شکمی به میزان ۵ میلی‌لیتر خون گرفته و با دقت به

گروه‌های دیگر مورد استفاده قرار گرفت که نتایج به شرح زیر می‌باشد.

اثر اسانس بهارنارنج بر لاكتات دهیدروژنانز (LDH) همان‌گونه که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود، تجویز داخل صفاتی اسانس بهارنارنج تنها در دوز بالا (۲ g/kg) باعث افزایش میزان LDH شد ($P \leq 0.01$). اما در دوزهای پایین‌تر اگرچه تا حدودی باعث افزایش میزان LDH گردید، اما این اثر از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P \leq 0.05$). همچنین مصرف خوراکی این اسانس در دوزهای داده‌شده تغییر معنی‌داری در این شاخص ایجاد نکرد.

اثر اسانس بهارنارنج بر ALT و AST همان‌گونه که در شکل شماره ۲ مشاهده می‌شود، تجویز داخل صفاتی اسانس بهارنارنج تنها در دوز بالا (۲ g/kg) باعث افزایش میزان ALT (۰.۰۵ $P \leq 0.01$) شد. اما در دوزهای پایین‌تر اگرچه تا حدودی باعث افزایش میزان AST گردید، اما این اثر از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P \leq 0.05$). همچنین مصرف خوراکی این اسانس در دوزهای داده‌شده تغییر معنی‌داری در این شاخص ایجاد ننمود (داده‌ها نشان داده نشده است).

اثر اسانس بهارنارنج بر TBARs و GSH همان‌گونه که در شکل شماره ۳ مشاهده می‌شود، تجویز داخل صفاتی اسانس بهارنارنج در تمام دوزها باعث افزایش میزان شاخص TBARs گردید. اگرچه این میزان افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P \leq 0.05$). این اسانس تغییر معنی‌داری بر میزان GSH ایجاد ننمود. همچنین مصرف خوراکی این اسانس در هیچ‌یک از دوزهای داده‌شده تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت (داده‌ها نشان داده نشده است).

بررسی پاتولوژی آسیب کبدی ناشی از اسانس بهارنارنج پس از ارسال نمونه‌های کبد به آزمایشگاه پاتولوژی، نمونه‌ها از نظر واکنش‌های التهابی، نکروز، خونریزی، احتقان بافتی و دژنراسیون (تباهی یا تغییر آسیب‌شناختی پس‌روندۀ در سلول یا بافت) مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج حاکی از این بود که اسانس بهارنارنج هم با مصرف خوراکی و هم در مصرف داخل صفاتی در غلظت‌های بالاتر از (۱ g/kg) باعث ایجاد التهاب در بافت کبدی می‌شود. همچنین در دوز بالا (۲ g/kg) احتقان بافتی مشاهده شد. پدیده دژنرسانس آبکی در همه موارد تجویز مشاهده گردید که در تجویز خوراکی شدت آن کمتر بود (شکل شماره ۴).

اندازه‌گیری مارکرهای بیوشیمیابی سرم

میزان مارکرهای بیوشیمیابی سرم (AST، ALT و LDH) به وسیله‌ی کیت تجاری شرکت پارس آزمون (ایران) و دستگاه اتوآنالایزر اندازه‌گیری شد.

آزمایشات هیستوپاتولوژیک

نمونه‌ها پس از جدا شدن و شستشو توسط سدیم کلرید (۰/۹ درصد)، در ظرف حاوی فرمالین (۱۰ درصد) فیکس شدند. پس از مراحل آماده‌سازی و تهیی بلوک‌های پارافینی، مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون تهیی و به روش هماتوکسیلین-ائوزین & (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. اسلایدها پس از لامل گذاری مورد مطالعه میکرو‌سکوپی قرار گرفتند. جهت بررسی عوارض ناشی از سمیت کبدی داروهای مورد مطالعه، موارد نکروز سلول‌های کبد، نکروز در ناحیه مرکز لوبولی، خونریزی، به هم خوردن ساختمان طبیعی سینوزوئید و ارتشاج فوکال سلول‌های التهابی مورد بررسی قرار گرفتند و درجه‌بندی شدند [۲۷].

محاسبات آماری

داده‌های مربوط به TBARs، LDH، ALT و GSH توسط آزمون Multivariate analysis of variance (MANOVA) مورد بررسی قرار گرفتند. سایر داده‌ها به وسیله آنالیز واریانس (ANOVA) یک‌طرفه و سپس تست مقایسه چندگانه Tukey تجزیه و تحلیل آماری شدند. میزان $P \leq 0.05$ به عنوان اختلاف قابل ملاحظه در نظر گرفته شد.

نتایج

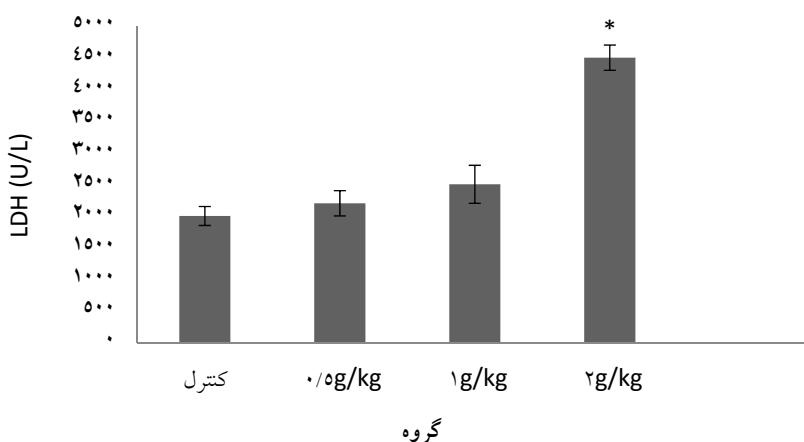
ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس بهارنارنج

نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی- جرمی در نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی- جرمی در جدول شماره ۱ خلاصه شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس شامل لینالیل استات، تربین-۴-ال، لینالول و فتیل الکل می‌باشند.

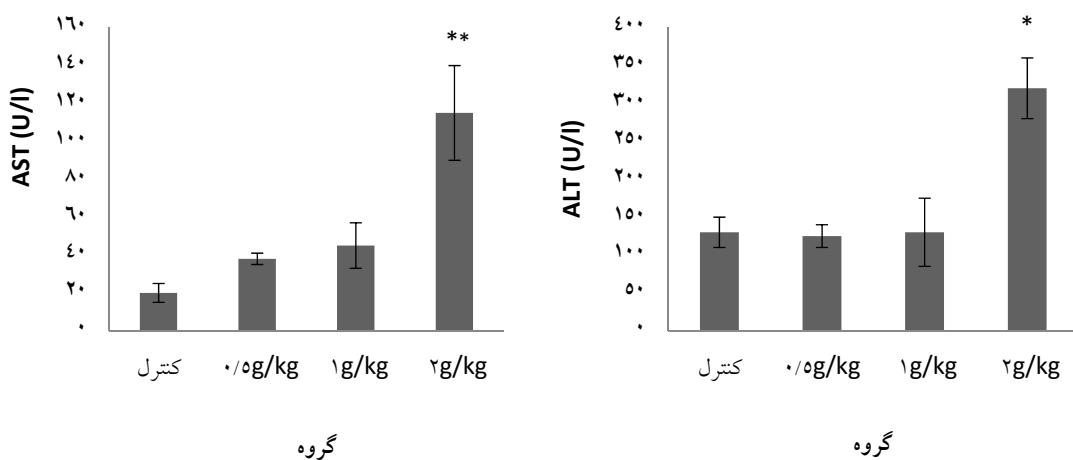
اثر اسانس بهارنارنج بر شاخص‌های سلامت کبدی داده‌های مربوط به TBARs، LDH، AST، ALT و GSH توسط آزمون Multivariate analysis of variance (MANOVA) مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از آزمون Wilks' Lambda MANOVA شاخص مقدار شاخص $F = ۱۵/۴۴, ۰.۵۷$ برابر با 0.01 و مختلف از این نظر تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P \leq 0.01$). سپس تست مقایسه چندگانه Tukey جهت مقایسه هر گروه با

جدول شماره ۱- ترکیبات شناسایی شده از اسانس بهار نارنج با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی-جرمی

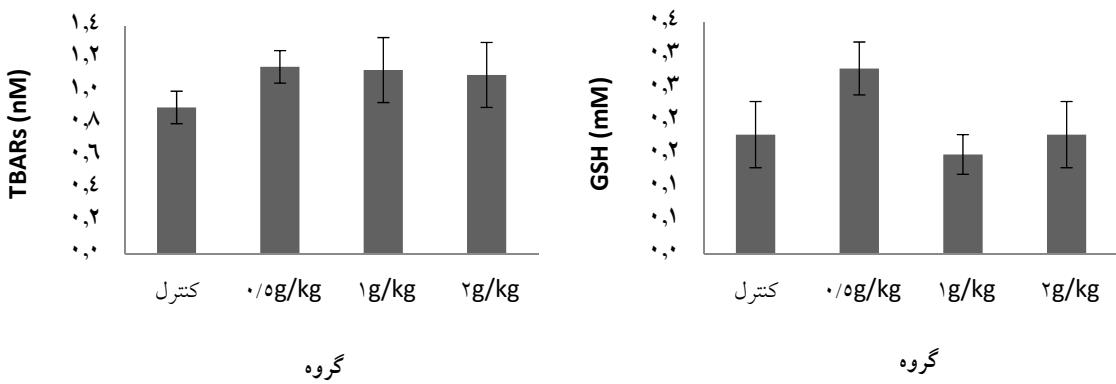
ردیف	نام ترکیب شیمیایی	درصد (وزنی/ وزنی) ترکیبات شیمیایی	شاخص کواتس
۱	لینالیل استات	۵۳/۴۷	۱۲۶۰
۲	تریپن-۴-ال	۰۲/۲۱	۱۱۷۴
۳	لیتالول	۹۹/۱۶	۱۰۹۹
۴	فتیل الکل	۹۱/۵	۱۱۱۵
۵	هگزان	۶۳/۱	۶۰۳
۶	ژوانل استات	۴۱/۱	۱۳۹۰
۷	نربل استات	۸۱/۰	۱۳۹۷
۸	میرسن	۵۵/۰	۹۹۰
۹	لیمونن	۳۲/۰	۱۰۲۵
۱۰	ترانس-بنا-اسیمن	۳۷/۰	۱۰۴۶
	نامشخص	۴۶/۰	



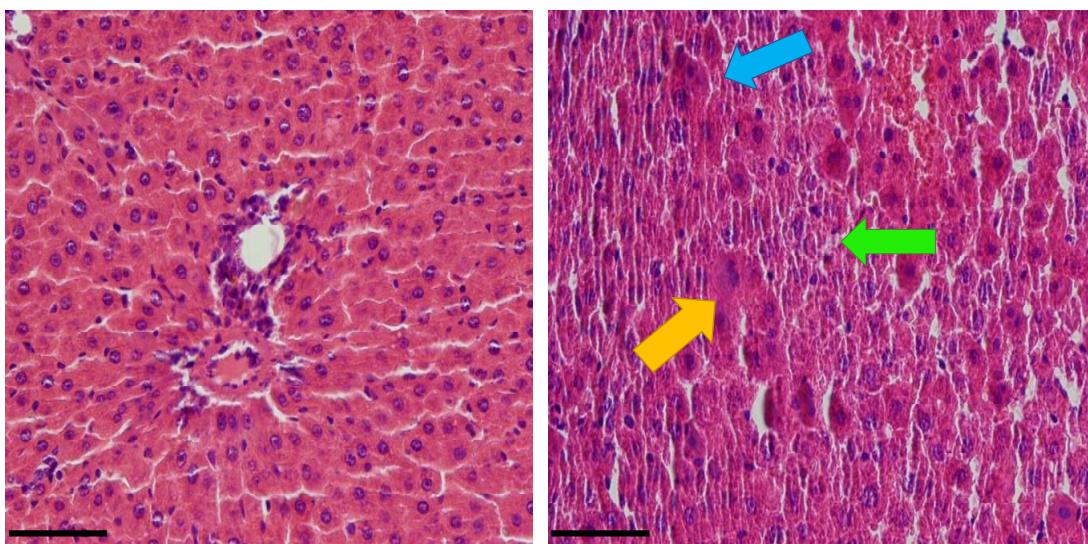
شکل شماره ۱- تأثیر تجویز اسانس بهار نارنج بر میزان LDH سرم در موش صحرایی نر. داده‌ها برای حداقل ۵ موش در هر گروه و به صورت نشان داده شده‌اند. اسانس به صورت داخل صفاقی با دوز ۰،۰۵، ۱ و ۲ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن روزانه و به مدت ۳ روز متوالی تجویز شد. آزمایش ۴۸ ساعت پس از تجویز آخرین دوز اسانس به موش‌ها انجام شده است.* نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل است. ($P \leq 0.001$).



شکل شماره ۲- تأثیر تجویز اسانس بهار نارنج بر میزان ALT (سمت راست) و AST (سمت چپ) سرم در موش صحرایی نر. داده‌ها برای حداقل ۵ موش در هر گروه و به صورت نشان داده شده‌اند. اسانس به صورت داخل صفاقی با دوز ۰،۰۵، ۱ و ۲ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن روزانه و به مدت ۳ روز متوالی تجویز شد. آزمایش ۴۸ ساعت پس از تجویز آخرین دوز اسانس به موش‌ها انجام شده است.* نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل است ($P \leq 0.05$).** نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل است ($P \leq 0.01$).



شکل شماره ۳- تأثیر تجویز اسانس بهارنارنج بر میزان GSH (سمت راست) سرم در موش صحرایی نر. داده‌ها برای حداقل ۵ موش در هر گروه و به صورت $\bar{X} \pm SD$ نشان داده شده‌اند.



شکل شماره ۴- یافته‌های هیستوپاتولوژی بافت کبد در گروه دریافت‌کننده اسانس بهارنارنج (سمت راست) و گروه کنترل سالم (سمت چپ). فلاش سبز: نکروز، فلاش زرد: خونریزی و احتقان بافتی، فلاش آبی: دُزبراسیون.
Scale bar: ۱۰۰ μm. ($\times 400$)

رت انجام شده است. در این تحقیق برای بررسی آسیب کبدی، هر ۳ آنزیم نشان‌دهنده آسیب کبدی یعنی AST، ALT و LDH مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در دوزهای بالا این اسانس دارای سمیت خفیف کبدی بوده است که داده‌های هیستوپاتولوژی نیز تأیید کننده این مطلب می‌باشد. بررسی میزان گلوتاتیون بافتی و میزان استرس اکسیداتیو در بافت کبد نشان داد که این عوارض ناشی از استرس اکسیداتیو نبوده، احتمالاً از طریق سمیت مستقیم و غیراکسیداتیو عمل می‌کند. تاکنون مطالعه‌ای جهت بررسی اثر مصرف اسانس بهارنارنج بر شاخص‌های سلامت کبدی گزارش نشده است. بنابراین امکان مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات وجود ندارد. اما در یک مطالعه که در سال ۲۰۰۳ انجام شده است، میزان LD₅₀ برای مصرف خوراکی لینالیل mg/kg (۱۴۵۰ mg/kg) و برای مصرف داخل صفاقی استات (۱۴۵۰ mg/kg)

بحث
در مطالعه حاضر، ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس بهارنارنج شامل لینالیل استات، ترپین-۴-ال و لینالول بود. در مطالعه قبلی، Jiang و همکاران ترکیب اصلی بهارنارنج را ترپین-۴-ال گزارش نمودند [۷] به علاوه در مطالعه دیگری که توسط خدابخش و همکاران انجام شده استف لینالول و لینالیل استات به عنوان ترکیبات اصلی بهارنارنج گزارش شده‌اند [۲۸]. نتایج حاصل از مطالعه حاضر با گزارشات قبلی ارائه شده توسط محققان بر روی ترکیبات اسانس بهارنارنج تطابق دارد. اگرچه مقدار درصد این ترکیبات در گزارش‌های قبلی با مطالعه حاضر متفاوت می‌باشد که این امر می‌تواند به دلیل تفاوت در روش‌های اسانس‌گیری [۲۹] و نیز تفاوت در شرایط جغرافیایی مناطق مختلف رویش این گیاه باشد. مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و روی حیوان آزمایشگاهی

همکاران میزان فراهمی زیستی ترکیبات لینالول و لینالیل استات (دو ترکیب شاخص اسانس بهار نارنج) و توزیع این دو ترکیب در اندازه‌های مختلف موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه آن‌ها مشخص شد که هر دو ترکیب لینالول و لینالیل استات تمایل زیادی به تجمع در بفت کبد، کلیه و بافت‌های چربی دارند. اما از طرفی لینالیل استات به سرعت در بدن حیوان متابولیزه و به ترکیب لینالول تبدیل می‌شود که تمایل پیشتری به تجمع در بفت مغز و بافت‌های چربی دارد [۳۶]. در مجموع به نظر می‌رسد که ترکیبات شاخص اسانس بهار نارنج تمایل به تجمع در کبد دارند و یا متاپولیسم آن‌ها وابسته به آنزیم‌های کبدی می‌باشد. بنابراین در مطالعه حاضر، اثر سمیت احتمالی اسانس بهار نارنج تنها در بفت کبد مورد بررسی قرار گرفت و سمیت احتمالی این اسانس بر سایر اندازه‌ها مانند بافت مغز یا کلیه ارزیابی نشد که اگرچه این امر جزو اهداف مطالعه حاضر نبود، اما بررسی اثرات سمیت احتمالی این اسانس و ترکیبات شاخص آن مانند لینالیل استات، تریپین-۴-اول و لینالول بر سایر اندازه‌ها به ویژه کلیه و مغز در مطالعات آینده در جهت اطمینان از مصرف فرآورده‌های اسانس بهار نارنج، می‌تواند سودمند باشد. همچنین از آن‌جا که مطالعه حاضر یک مطالعه حیوانی می‌باشد، ممکن است نتایج به دست آمده از آن به طور کامل روی انسان صادق نباشد، اگرچه هشدارهای در رابطه با مصرف آن در بیماران مبتلا به مشکلات کبدی ارائه می‌کند. بنابراین قبل از بسط نتایج مطالعه حاضر به انسان، انجام مطالعات بیشتر جهت بررسی اثرات مصرف محصولات حاوی اسانس بهار نارنج مانند عرقیات و شربت‌های حاوی این اسانس بر شاخص‌های سلامت کبدی روی افراد داوطلب سالم ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشنی از پایان‌نامه دکترای عمومی داروسازی خانم مهسا دانا (یکی از نویسنده‌گان مقاله حاضر) می‌باشد و توسط گروه پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به شماره ۹۷-۰۱-۷۰-۱۸۹۸۴ IR.SUMS.REC.1398.177 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز مصوب گردیده است.

References:

- [1] Tripoli E, La Guardia M, Giannmanco S, Di Majo D, Giannmanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem* 2007;104(2): 466-79.

[2] Suryawanshi JAS. An overview of *Citrus aurantium* used in treatment of various diseases. *Afr J Plant Sci* 2011; 5(7): 390-5.
[3] Khorasani MA. Makhzan al Advieh. Tehran, Iran: Bavardaran Press Research institute for ۴۵

در اسانس بهار نارنج مورد استفاده در این مطالعه ۵۳/۴۷ درصد بود، این امر حاکی از احتمال بروز سمیت در مقادیر مصرف روزانه اسانس بهار نارنج به عنوان چاشنی یا در عرقیجات است. این نتایج با نتایج مشاهده شده در مطالعه حاضر در عدم بروز سمیت کبدی در مصرف خوراکی اسانس بهار نارنج همانگ می‌باشد. همچنین در مطالعات قبلی گزارش شده است که تزریق داخل صفاقی لینالیل استات در دوزهای (۱۶۰۰-۵۰۰۰ mg/kg) به مدل موش صحرایی باعث ایجاد آسیب‌های کبدی شامل تغییر رنگ بفت کبد و ضخیم شدن لوب‌های کبدی شد [۳۰]. اگرچه دوز مصرف شده در مطالعه حاضر کمتر از دوز گزارش شده توسط Letizia و همکاران می‌باشد، اما هر دو مطالعه حاکی از احتمال بروز آسیب‌های کبدی در صورت مصرف مقادیر بالای اسانس‌های گیاهی حاوی ترکیب لینالیل استات است. از جمله ترکیبات دیگری که در اسانس بهار نارنج شناسایی شد، ترکیب لیمونن بود. اگرچه این ترکیب جزو ترکیبات شاخص این اسانس نیست، اما در مطالعات قبلی گزارش شده است که غلظت‌های بالای لینالول ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز و به مدت سی روز) سبب بروز آسیب پارانشیم کبدی و ماتریکس کبد شامل زخم‌های کبدی، بزرگ شدن سلول‌های کوپفر و فیبروز می‌شود [۳۱]. این گزارشات مؤید نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نیز هست. از طرفی برخی مقالات حاکی از اثرات محافظت کبدی لینالول (از جمله ترکیبات اصلی اسانس بهار نارنج) در برابر سمیت ناشی از سیترال انجام شد، لینالول سبب القای تکثیر پراکسی‌زومها و افزایش سطح سیتوکروم P₄₅₀ در کبد شد. در این مطالعه غلظت‌های (۵۰۰ mg/kg) لینالول باعث افزایش در وزن کبد شد [۳۳]. ترکیب شاخص دیگر موجود در اسانس بهار نارنج در مطالعه حاضر تریپین-۴-ال بود. برخی مطالعات قبلی نشان داده‌اند که این ترکیب در کبد انسان توسط آنزیم‌های میکروزومال P₄₅₀ به ویژه آنزیم‌های CYP2A6 و CYP3A4 اکسید و متاپولیزه می‌شود [۳۵,۳۶]. در مطالعه انجام‌شده توسط Nöldner و

- Islamic and Complementary Medicine, Iran University of Medical Sciences. 2001 .p.
- [4] Aghili Shirazi S. Qarabadin-e-Kabir. Tehran, Iran: Ostad Allah Qoli Khan Qajar. 1855. p.134.
- [5] Lopes CL, Gonçalves C, Almeida A, Pereira CJ, Costa MT, Mendes FC, et al. Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of *Citrus limon* (Burn) essential oil in mice. *Die Pharmazie- Int J Pharm Sci* 2011; 66(8): 623-7.
- [6] Mosaddegh M, Kamalinejad M, Dehmaoobad Sharifabadi A, Esfahani, B. Composition of the volatile oils of the *Citrus bigaradia*, *Citrus limon* and *Citrus deliciosa*. *J Med Plant* 2004; 11(3): 25-30.
- [7] Jiang MH, Yang L, ZhuL, Piao JH, Jiang JG. Comparative GC/MS analysis of essential oils extracted by 3 methods from the bud of *Citrus aurantium* L. var. amara. *Engl J Food Sci* 2011; 76(9): 1219-25.
- [8] Moulehi I, Bourgou S, Ourghemmi I, Tounsi MS. Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulate* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Ind Crop Prod* 2012; 1(39): 74-80.
- [9] Hansen, DK, George NI, White GE, Abdel-Rahman A, Pellicore L, Fabricant D. Cardiovascular toxicity of *Citrus aurantium* in exercised rats. *Cardiovasc Toxicol* 2013; 13(3): 208-19.
- [10] Liu L, Shan S, Zhang K, Ning ZQ, Lu XP, Cheng YY. Naringenin and hesperetin, two flavonoids derived from *Citrus aurantium* upregulate transcription of adiponectin. *Phytother Res* 2008; 22(10): 1400-3.
- [11] Kim GS, Park HJ, Woo JH, Kim MK, Koh PO, Min W, et al. *Citrus aurantium* flavonoids inhibit adipogenesis through the Akt signaling pathway in 3T3-L1 cells. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12(31): 1-10.
- [12] Lee DH, Park KI, Park HS, Kang SR, Nagappan A, Kim JA, et al. Flavonoids isolated from Korea *Citrus aurantium* L. induce G2/M phase arrest and apoptosis in human gastric cancer AGS cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012(1): 1-11.
- [13] Kang SR, Park KI, Park HS, Lee DH, Kim JA, Nagappan A, et al. Anti-inflammatory effect of flavonoids isolated from Korea *Citrus aurantium* L. on lipopolysaccharide-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells by blocking of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways. *Food Chem* 2011; 129(4): 1721-8.
- [14] Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, Oskoueian A, Jaafar HZ. Phenolic compounds characterization and biological activities of *Citrus aurantium* bloom. *Molecules* 2012; 17(2): 1203-18.
- [15] Fukumoto S, Morishita A, Furutachi K, Terashima T, Nakayama T, Yokogoshi H. Effect of flavour components in lemon essential oil on physical or psychological stress. *Stress Health* 2008; 24(1): 3-12.
- [16] Carvalho-Freitas MIR, Costa M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(12): 1629-33.
- [17] Costa CA, Cury TC, Cassettari BO, Takahira RK, Flório JC, Costa M. *Citrus aurantium* L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT 1A-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. *BMC Complement Altern Med* 2013; 13(42): 1-10.
- [18] Calapai G, Firenzuoli F, Saitta A, Squadrato F, Arlotta MR, Costantino G, et al. Antidiobesity and cardiovascular toxic effects of *Citrus aurantium* extracts in the rat: a preliminary report. *Fitoterapia* 1999; 70(6): 586-92.
- [19] Stohs SJ. Assessment of the adverse event reports associated with *Citrus aurantium* (bitter orange) from April 2004 to October 2009. *J Funct Food* 2010; 2(4): 235-8.
- [20] Louw VJ, Louw H. *Citrus aurantium*-beware of the bitter orange. *SAMJ S Afr Med J* 2008; 98(7): 496-6.
- [21] Chien K, Peau R, Farber J. Ischemic myocardial cell injury. Prevention by chlorpromazine of an accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction. *Am J Pathol* 1979; 97(3): 505-25.
- [22] Arteel GE, Sies H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001; 10(4): 153-8.
- [23] Alfa HH, Arroo RR. Over 3 decades of research on dietary flavonoid antioxidants and cancer prevention: What have we achieved?. *Phytochem Rev* 2019; 19(1):1-6.
- [24] Mojab F, Hamed A, Nickavar B, Javidnia K. Hydrodistilled volatile constituents of the leaves of *Daucus carota* L. subsp. *sativus* (Hoffman.) Arcang. (Apiaceae) from Iran. *J Essent Oil Bearing Pl* 2008; 11(3): 271-7.
- [25] Heidari R, Ghanbarinejad V, Mohammadi H, Ahmadi A, Esfandiari A, Azarpira N, et al. Dithiothreitol supplementation mitigates hepatic and renal injury in bile duct ligated mice: Potential application in the treatment of cholestasis-associated complications. *Biomed Pharmacother* 2018; 99(1): 1022-32.
- [26] Heidari R, Taheri V, Rahimi HR, Yeganeh BS, Niknahad H, Najibi A. Sulfasalazine-induced renal injury in rats and the protective role of thiol-reductants. *Renal Failure* 2016; 38(1): 137-41.
- [27] Heidari R, Moezi L, Asadi B, Ommati MM, Azarpira N. Hepatoprotective effect of boldine in a bile duct ligated rat model of cholestasis/cirrhosis. *Pharma Nutr* 2017; 5(3): 109-17.
- [28] Khodabakhsh P, Shafaroodi H, Asgarpanah J. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrus aurantium* L. blossoms essential oil (neroli):

- involvement of the nitric oxide/cyclic-guanosine monophosphate pathway. *J Nat Med* 2015; 69(3): 324-31.
- [29] Najafian S, Rowshan V. Comparative of HS SPME and HD techniques in *Citrus aurantium* L. *Int J Med Arom Plants* 2012; 2(1): 488-94.
- [30] Letizia C, Cocchiara J, Lalko J, Api A. Fragrance material review on linalyl acetate. *Food Chem Toxicol* 2003; 41(7): 965-76.
- [31] Ramos CA, Sá RD, Alves MF, Benedito RB, Sousa DP, Margareth de Fátima FM, et al. Histopathological and biochemical assessment of d-limonene-induced liver injury in rats. *Toxicol Rep* 2015; 1(2): 482-8.
- [32] Li J, Zhang X, Huang H. Protective effect of linalool against lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced liver injury in mice. *Int Immunopharmacol* 2014; 23(2): 523-9.
- [33] Roffey SJ, Walker R, and Gibson G. Hepatic peroxisomal and microsomal enzyme induction by citral and linalool in rats. *Food Chem Toxicol* 1990; 28(6): 403-8.
- [34] Miyazawa M, Haigou R. Determination of cytochrome P₄₅₀ enzymes involved in the metabolism of (-)-terpinen-4-ol by human liver microsomes. *Xenobiotica* 2011; 41(12): 1056-62.
- [35] Haigou R, Miyazawa M. Metabolism of (+)-Terpinen-4-ol by cytochrome P₄₅₀ enzymes in human liver microsomes. *J Oleo Sci* 2012; 61(1): 35-43.
- [36] Nöldner M, Germer S, Koch E. Pharmacokinetics of linalool and linalyl acetate, the two main constituents of silexan, an essential oil from *Lavandula angustifolia* flowers, in rats. *Planta Med* 2011; 77(12): 1410-10.