

Paper Type: Original Article



## Neuroprotective Effects of Alpha-Pinene Nanophytosome on Oxidative Damage Induced by Carbon Tetrachloride

Kosar Taghizadeh<sup>1</sup>, Akbar Hajizadeh Moghaddam<sup>2,\*</sup> , Sedigheh Khanjani Jelodar<sup>3</sup>, Vahid Hasantabar<sup>4</sup>

<sup>1</sup> MSc student in Animal Physiology, Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Mazandaran University, Babolsar, Mazandaran, Iran; kosaritz@gmail.com.

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Mazandaran University, Babolsar, Mazandaran, Iran; a.hajizadeh@umz.ac.ir.

<sup>3</sup> Ph.D., Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Mazandaran University, Babolsar, Mazandaran, Iran; s.khanjani66@yahoo.com.

<sup>4</sup> Ph.D., Department of Polymer Chemistry, Faculty of Chemistry, Mazandaran University, Babolsar, Mazandaran, Iran; vahidhasantabar@yahoo.com.

### Citation:

Taghizadeh, K., Hajizadeh Moghaddam, A., Khanjani Jelodar, S., & Hasantabar, V. (2024). Neuroprotective effects of alpha-pinene nanophytosome on oxidative damage induced by carbon tetrachloride. *The quarterly scientific journal of applied biology*, 36(4), 38-46.

Received: 22/07/2023

Accepted: 26/12/2023

### Abstract

**Introduction:** Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) is a common chemical solvent that causes oxidative stress and brain damage. Alpha-pinene, with antioxidant properties, is important in reducing oxidative stress and improving inflammation. However, Alpha-pinene has low bioavailability due to low solubility. This study aims to investigate the protective effects of Alpha-pinene nanophytosome on brain damage caused by CCl<sub>4</sub> in male rats.

**Methods:** In this research, 35 male Wistar rats were divided into five groups: control, Alpha-pinene nanophytosome (50 mg/kg) for 14 days, CCl<sub>4</sub> (1 mg/kg) twice a week for 14 days, and two CCl<sub>4</sub> treated groups with Alpha-pinene and Alpha-pinene nanophytosome (50 mg/kg) for 14 days. Finally, the levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH), as well as the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) enzymes were investigated.

**Results:** Our results revealed that the level of GSH (P<0.001) and the activity of antioxidant enzymes (P<0.01) in the brains of rats receiving CCl<sub>4</sub> significantly decreased compared to the control group, while the Alpha-pinene nanophytosome increased significantly. The level of MDA in the brain of rats receiving CCl<sub>4</sub> increased significantly (P<0.001) compared to the control group, while Alphapinene nanophytosome significantly reduced MDA level.

**Conclusion:** This research shows that Alpha-pinene nanophytosomes can protect the brain against oxidative stress and damage caused by CCl<sub>4</sub>.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, Alpha-pinene nanophytosome, Carbon tetrachloride, Lipid peroxidation, Oxidative stress.



## اثرات محافظت عصبی نانوفیتوزوم آلفاپینن پراسیب‌های اکسیداتیو القاء شده با تتراکلریدکربن

کوثر تقی زاده<sup>۱</sup>، اکبر حاجی‌زاده مقدم<sup>۲</sup>، صدیقه خانجانی جلودار<sup>۳</sup>، وحید حسن تبار<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، مازندران، ایران.

<sup>۲</sup>دانشیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، مازندران، ایران.

<sup>۳</sup>دکتری، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، مازندران، ایران.

<sup>۴</sup>دکتری، گروه شیمی پلیمر، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، بابلسر، مازندران، ایران.

نویسنده مسئول: [a.hajizadeh@umz.ac.ir](mailto:a.hajizadeh@umz.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۳۱

### چکیده

**مقدمه:** تتراکلریدکربن ( $CCl_4$ ) حلال شیمیایی رایج که موجب استرس اکسیداتیو و آسیب مغزی می‌شود. آلفاپینن دارای خواص آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود التهاب دارد. باین حال، آلفاپینن به دلیل حلالیت کم فراهمی زیستی پایینی دارد. هدف از این پژوهش بررسی اثرات حفاظتی نانوفیتوزوم آلفاپینن بر آسیب مغزی ناشی از  $CCl_4$  در موش صحرایی نر است.

**روش‌ها:** در این پژوهش ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به پنج گروه تقسیم شدند: کنترل، نانوفیتوزوم آلفاپینن (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به مدت ۱۴ روز،  $CCl_4$  (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) دو بار در هفته به مدت ۱۴ روز و دو گروه  $CCl_4$  که با آلفاپینن و نانوفیتوزوم آلفاپینن (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به مدت ۱۴ روز تحت درمان قرار گرفتند. در نهایت، میزان سطوح مالون دی‌آلدهید (MDA) و گلوتاتیون (GSH) و همچنین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج ما نشان داد سطح GSH ( $P < 0/001$ ) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ( $P < 0/001$ ) در مغز موش دریافت‌کننده  $CCl_4$  به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت، در حالی که نانوفیتوزوم آلفاپینن به طور معنی‌داری افزایش داد. در مقابل، سطح MDA در مغز موش دریافت‌کننده  $CCl_4$  به طور معنی‌داری ( $P < 0/001$ ) نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. در حالی که نانوفیتوزوم آلفاپینن سطح MDA را به طور معنی‌داری کاهش داد.

**نتیجه‌گیری:** یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که نانوفیتوزوم آلفاپینن می‌تواند از مغز در برابر استرس اکسیداتیو و آسیب ناشی از  $CCl_4$  محافظت کند.

کلیدواژه‌ها: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، نانوفیتوزوم آلفاپینن، تتراکلریدکربن، پراکسیداسیون لیپیدی، استرس اکسیداتیو.

### ۱- مقدمه

تتراکلریدکربن ( $CCl_4$ ) در دهه‌های اخیر به طور گسترده به عنوان حلال، پاک‌کننده و چربی زدا برای مصارف صنعتی و خانگی استفاده می‌شد تا اینکه سمیت و سرطان‌زایی  $CCl_4$  در انسان‌هایی که در معرض آن قرار می‌گرفتند کشف شد [1].  $CCl_4$  معمولاً برای القای سمیت کبدی و کلیوی، در

حیوانات آزمایشگاهی استفاده می‌شود [2]. یک سم رایج که پراکسیداسیون لیپیدی را ایجاد می‌کند [3]. آسیب‌های ناشی از  $CCl_4$  در اندام‌های مختلف از جمله کبد، مغز، ریه‌ها و کلیه‌ها آشکار شده است [4].  $CCl_4$  توسط سیتوکروم P450 در شبکه آندوپلاسمی سلول‌های کبدی به رادیکال تری کلرومتیل ( $CCl_3\cdot$ ) متابولیزه شده و به سرعت با اکسیژن واکنش می‌دهد تا رادیکال تری کلرومتیل پروکسیل ( $CCl_3OO\cdot$ ) را ایجاد کند [5]. این رادیکال‌های آزاد با اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFA) واکنش می‌دهند تا یک واکنش زنجیره‌ای را منتشر کنند که منجر به پراکسیداسیون لیپیدی (LPO) یا به صورت کووالانسی به لیپیدها و پروتئین‌ها متصل می‌شوند [6]. مطالعات نشان داده است که  $CCl_4$  با ایجاد پراکسیداسیون لیپیدی علاوه بر تغییر در دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز، استرس اکسیداتیو را القاء می‌کند [2]. از بین اجزای گیاهی متنوع، اهمیت ویژه‌ای به پلی‌فنل‌های گیاهان داده شده است که می‌توانند از طریق مکانیسم‌های مختلف با استرس اکسیداتیو مقابله کنند [7]. آلفاپینن ( $C_{10}H_{16}$ ) یک هیدروکربن دو حلقه‌ای طبیعی که متابولیت ثانویه اصلی در بسیاری از اسانس‌های مشتق شده از مخروطیان است. آلفاپینن دارای اثرات محافظت عصبی، گوارشی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد تومور و ضد میکروبی است. بر اساس شواهد موجود، آلفاپینن دارای اثرات ضد تشنجی است که باعث کاهش تشنج و استرس اکسیداتیو می‌شود. همچنین، آلفاپینن در پاتوژنز سکنه مغزی ایسکمیک با کاهش بیان پروتئین‌های واسطه التهابی، التهاب عصبی را کاهش می‌دهد و سبب سرکوب آپوپتوز می‌شود [8]. با وجود تمام مزیت‌های این ترکیب، استفاده آن به دلیل فراهمی زیستی پایین محدود شده است. در سال‌های اخیر از فیتوزوم، لیپوزوم و نانو ذرات به عنوان سیستم‌های حامل ترکیبات طبیعی استفاده می‌شود. فیتوزوم‌ها در مقایسه با عصاره‌های گیاهی معمولی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری هستند [9]. نانوفیتوزوم یکی از جدیدترین نانو حامل‌ها و روشی سریع برای جذب مواد مغذی گیاهی است [10]. آن‌ها می‌توانند فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فعال زیستی را بهبود ببخشند [11]؛ بنابراین، هدف از این پژوهش بررسی اثرات نانوفیتوزوم آلفاپینن بر سطح لیپید پراکسیداسیون، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطح گلوکوتایون در آسیب مغزی القا شده با  $CCl_4$  در موش صحرایی نر نژاد ویستار می‌باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- طرز تهیه نانوفیتوزوم آلفاپینن

به منظور تهیه نانوفیتوزوم آلفاپینن، ۰/۲۴ مولار آلفاپینن (مرک، آلمان) در کلروفرم حاوی فسفاتیدیل کولین (۰/۲۵/۰ وزنی/وزنی) و توئین ۸۰ (۰/۱۵/۰ وزنی/وزنی) حل شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار گرفت. پس از آن مخلوط به دست آمده روتاری شد. به محصول برجای مانده بافر سدیم فسفات (pH=۷/۴) اضافه شد و به مدت ۱۲ ساعت تحت چرخش سریع هیدراته شد. پس از آن مخلوط حاصله به مدت نیم ساعت تحت امواج فراصوتی قرار گرفت و بدین ترتیب نانوفیتوزوم آلفاپینن تهیه شد. ۰/۵ سی سی از نمونه به دست آمده حاوی دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلفاپینن به موش‌های ۲۵۰ گرمی روزانه به مدت ۱۴ روز خوراندن شده است.

### ۲-۲- شرایط نگهداری

در این پژوهش تجربی، ۳۵ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۰۰-۱۸۰ گرم از دانشگاه علوم پزشکی ساری خریداری شد. یک هفته قبل از آزمایش، موش‌ها در اتاق حیوانات گروه زیست‌شناسی در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای  $24\pm 3$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلیه آزمایش‌ها مطابق آیین‌نامه کمیته اخلاق زیستی معاونت پژوهشی دانشگاه مازندران انجام شد (IR.UMZ.REC.1401.069).

### ۲-۳- گروه‌بندی حیوانات

موش‌ها به صورت تصادفی به ۵ گروه ۷ تایی کنترل، نانوفیتوزوم آلفاپینن (APNP) (دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به مدت ۱۴ روز،  $CCl_4$  (تزریق مخلوط  $CCl_4$  و روغن زیتون به نسبت ۱:۱) دو بار در هفته به مدت ۱۴ روز [12] و دو گروه  $CCl_4$  که با آلفاپینن (AP) و نانوفیتوزوم آلفاپینن (دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به مدت ۱۴ روز تحت درمان قرار گرفتند [13]، تقسیم شدند. دو ساعت بعد از آخرین گاوژ، موش‌ها سر بریده شدند و برای بررسی پارامترهای آنتی‌اکسیدانی ۲۰۰ میلی‌گرم از بافت مغز جدا گردید و در نیتروژن مایع تثبیت و نهایتاً تا زمان انجام سنجش پارامترهای آنتی‌اکسیدانی در فریز -۸۰- نگه‌داری شد.

#### ۲-۴- آماده‌سازی محلول هموزن و تعیین غلظت پروتئین

به‌منظور آماده‌سازی بافر هموزن، ۲۰۰ میلی‌گرم از بافت مغز در ۳ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۰/۴ مولار (pH=۷/۴) هموزن شد. سپس نمونه‌ها با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴- سانتیفریژ شدند. محلول شفاف رویی جدا شده و برای سنجش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت. محتوای پروتئین هموزن‌های نمونه مغز با روش برادفورد محاسبه شد. آلبومین سرم گاوی استاندارد در نظر گرفته شد [14].

#### ۲-۵- سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) از روش جنت و همکاران [15] استفاده شد. به‌طور خلاصه، ۱۲۰ میکرولیتر بافت هموزن شده مغز به ۵۰ میلی‌مولار بافر سدیم فسفات (pH=۷) و ۱۰ میلی‌مولار هیدروژن پراکسید اضافه شد. جذب سوپرناتانت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

#### ۲-۶- سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) بافت مغز نیز طبق روش جنت و همکاران [15] اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، ۱۲۰ میکرولیتر بافت هموزن شده مغز به ۵۰ میلی‌مولار بافر سدیم فسفات، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA و ۰/۴۸ میلی‌مولار پیروگالل اضافه شد. جذب سوپرناتانت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

#### ۲-۷- سنجش فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx) طبق روش شارما و گوپتا [16] اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، مخلوط واکنش حاوی ۱ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۰/۴ مولار (pH=۷) حاوی ۰/۴ میلی‌مولار EDTA، ۱ میلی‌لیتر سدیم آزید ۵ میلی‌مولار، ۱ میلی‌لیتر گلوکوتاتیون ۴ میلی‌مولار، ۱۲۰ میکرولیتر بافت هموزن شده مغز می‌باشد. جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

#### ۲-۸- ارزیابی سطح گلوکوتاتیون

برای اندازه‌گیری سطح گلوکوتاتیون (GSH) از روش فوکوزاوا و توکومورا [17] استفاده شد. ۲۰۰ میکرولیتر بافت هموزن شده مغز با ۱۱۰۰ میکرولیتر بافر سدیم فسفات ۰/۲۵ مولار (pH=۷/۴) و ۱۳۰ میکرولیتر DTNB ۰/۴ درصد و ۱۷۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد. در نهایت جذب محلول در مقابل شاهد در طول موج ۴۱۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

#### ۲-۹- ارزیابی سطح پراکسیداسیون لیپیدی

برای تعیین غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA) بافت مغز طبق قانون بیرلامبرت اندازه‌گیری شد [18]. به‌طور خلاصه، ۲۰۰ میکرولیتر از بافت هموزن شده مغز با ۰/۵ میلی‌لیتر تیوباربیتریک اسید ۶۷ درصد و ۱ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵-۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه، به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ rpm سانتیفریژ شد. در نهایت جذب محلول رویی در مقایسه با محلول شاهد در طول موج ۵۳۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

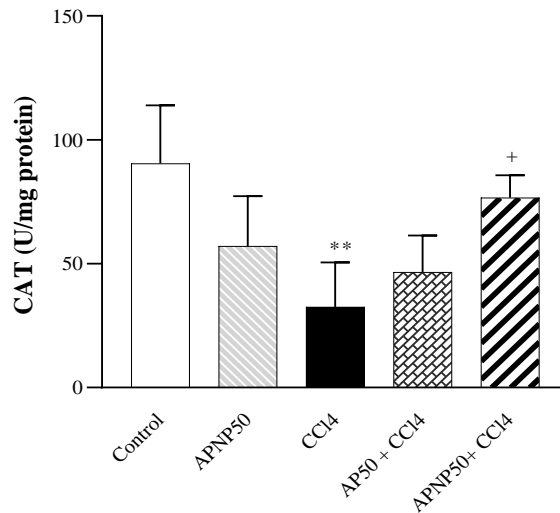
#### ۳- آنالیز آماری داده‌ها

به‌منظور تحلیل آماری، همه متغیرها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA Way-One) با هم مقایسه شدند و در صورت معنی‌دار بودن تفاوت‌ها از آزمون Tukey برای مقایسه جفت گروه‌ها استفاده گردید. تمام آنالیزها و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار آماری Prism نسخه ۸ صورت گرفت و سطح معنی‌داری  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد.

۴- نتایج

۴-۱- اثر نانوفیتوزوم آلفاپینن بر فعالیت آنزیم کاتالاز در آسیب مغزی ناشی از CCl<sub>4</sub>

میزان فعالیت آنزیم CAT در گروه CCl<sub>4</sub> کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۱) نسبت به گروه کنترل نشان داد. گروه تیمار با نانوفیتوزوم آلفاپینن دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به گروه CCl<sub>4</sub> شد. این در حالی است که تیمار با آلفاپینن در دوز مشابه نتوانست افزایش معنی‌داری نسبت به گروه CCl<sub>4</sub> موجب شود (شکل ۱).

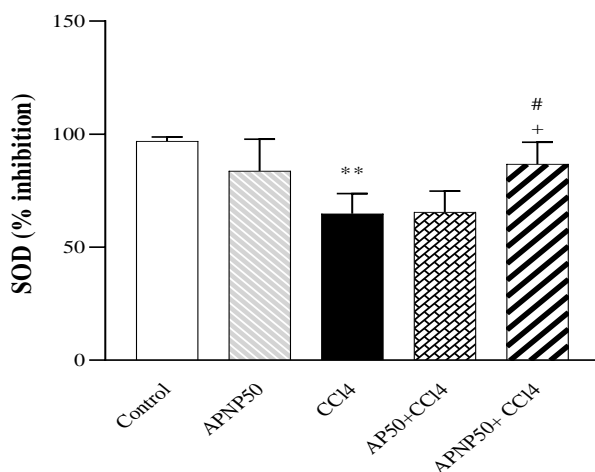


شکل ۱- اثر نانوفیتوزوم آلفاپینن بر فعالیت آنزیم کاتالاز در آسیب مغزی ناشی از CCl<sub>4</sub>. نمودار برحسب میانگین ± انحراف معیار رسم شده است. آنالیز و واریانس یک‌طرفه و تست تکمیلی توکی (در هر گروه n=7). CCl<sub>4</sub>: تتراکلرید کربن، AP: آلفاپینن، APNP: نانوفیتوزوم آلفاپینن. (\*\*P<۰/۰۱) در مقایسه با گروه کنترل. (+P<۰/۰۵) در مقایسه با گروه CCl<sub>4</sub>.

Figure 1- Effects of APNP on catalase enzyme activity in brain damage caused by CCl<sub>4</sub>. The graph is plotted in terms of mean ± standard deviation. One-way analysis and variance and Tukey supplementary test (n=7 in each group). CCl<sub>4</sub>; carbon tetrachloride, AP; Alpha-pinene and APNP; Alpha-pinene nanophytosome. (\*\*P<0.01) as compared to control group. (+P<0.05) as compared to CCl<sub>4</sub> group.

۴-۲- اثر نانوفیتوزوم آلفاپینن بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در آسیب مغزی ناشی از CCl<sub>4</sub>

میزان فعالیت آنزیم SOD در گروه CCl<sub>4</sub> کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۱) نسبت به گروه کنترل نشان داد. گروه تیمار با نانوفیتوزوم آلفاپینن دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، سبب کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به گروه CCl<sub>4</sub> شد. در حالی که تیمار با آلفاپینن در دوز مشابه نتوانست موجب افزایش معنی‌داری نسبت به گروه CCl<sub>4</sub> شود. همچنین گروه تیمار با نانوفیتوزوم آلفاپینن باعث افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) در مقایسه با گروه تیمار با آلفاپینن شد (شکل ۲).

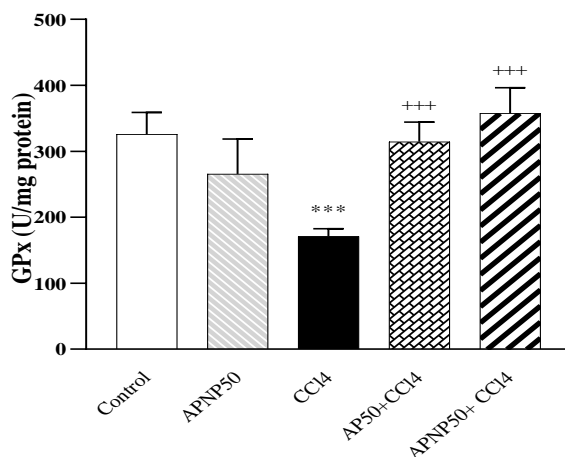


شکل ۲- اثر نانوفیتوزوم آلفاپینن بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در آسیب مغزی ناشی از CCl<sub>4</sub>. نمودار برحسب میانگین ± انحراف معیار رسم شده است. آنالیز و واریانس یک‌طرفه و تست تکمیلی توکی (در هر گروه n=7). CCl<sub>4</sub>; تتراکلرید کربن، AP; آلفاپینن، APNP; نانوفیتوزوم آلفاپینن. (\*\*P<0.01) در مقایسه با گروه کنترل. (+P<0.05) در مقایسه با گروه CCl<sub>4</sub>. (#P<0.05) در مقایسه با گروه APNP+CCl<sub>4</sub>.

Figure 2- Effects of APNP on superoxide dismutase enzyme activity in brain damage caused by CCl<sub>4</sub>. The graph is plotted in terms of mean ± standard deviation. One-way analysis and variance and Tukey supplementary test (n=7 in each group). CCl<sub>4</sub>; carbon tetrachloride, AP; Alpha-pinene and APNP; Alpha-pinene nanophytosome. (\*\*P<0.01) as compared to control group. (+P<0.05) as compared to CCl<sub>4</sub> group. (#P<0.05) as compared to AP + APNP group.

### ۳-۴- اثر نانوفیتوزوم آلفاپینن بر فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز در آسیب مغزی ناشی از CCl<sub>4</sub>

میزان فعالیت آنزیم GPx در گروه CCl<sub>4</sub> کاهش معنی‌داری (P<0.001) نسبت به گروه کنترل نشان داد. در گروه تیمار با آلفاپینن و نانوفیتوزوم آلفاپینن دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب افزایش معنی‌داری با (P<0.001) نسبت به گروه CCl<sub>4</sub> مشاهده شد (شکل ۳).

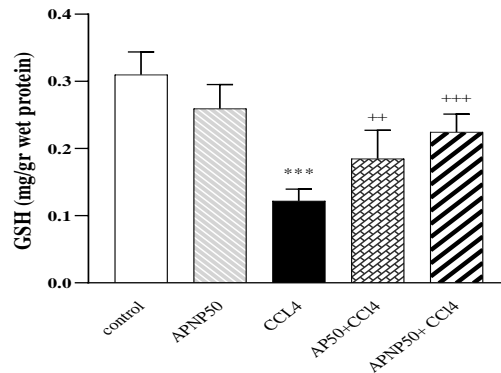


شکل ۳- اثر نانوفیتوزوم آلفاپینن بر فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز در آسیب مغزی ناشی از CCl<sub>4</sub>. نمودار برحسب میانگین ± انحراف معیار رسم شده است. آنالیز و واریانس یک‌طرفه و تست تکمیلی توکی (در هر گروه n=7). CCl<sub>4</sub>; تتراکلرید کربن، AP; آلفاپینن، APNP; نانوفیتوزوم آلفاپینن. (\*\*\*)P<0.001) در مقایسه با گروه کنترل. (+++P<0.001) در مقایسه با گروه CCl<sub>4</sub>.

Figure 3- Effects of APNP on glutathione peroxidase enzyme activity in brain damage caused by CCl<sub>4</sub>. The graph is plotted in terms of mean ± standard deviation. One-way analysis and variance and Tukey supplementary test (n=7 in each group). CCl<sub>4</sub>; carbon tetrachloride, AP; Alpha-pinene and APNP; Alpha-pinene nanophytosome. (\*\*\*)P<0.001) as compared to control group. (+++P<0.001) as compared to CCl<sub>4</sub> group.

۴-۴- اثر نانوفیتوزوم آلفاپینن بر سطح گلوپتاتینون در آسیب مغزی ناشی از CCl<sub>4</sub>

سطح GSH در گروه CCl<sub>4</sub> به طور معنی داری ( $P < 0.001$ ) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. گروه تیمار با آلفاپینن و نانوفیتوزوم آلفاپینن دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به طور معنی داری به ترتیب ( $P < 0.001$ ) و ( $P < 0.001$ ) افزایش معنی داری نسبت به گروه CCl<sub>4</sub> نشان دادند (شکل ۴).

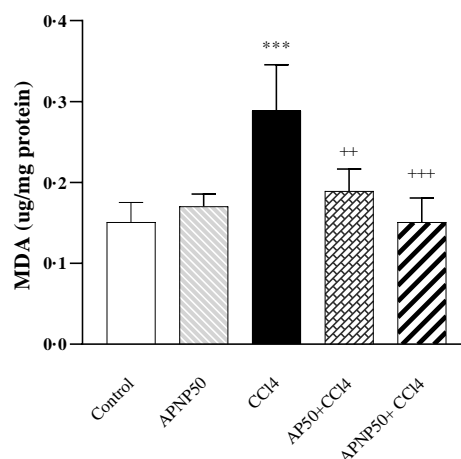


شکل ۴- اثر نانوفیتوزوم آلفاپینن بر فعالیت گلوپتاتینون در آسیب مغزی ناشی از CCl<sub>4</sub>. نمودار برحسب میانگین  $\pm$  انحراف معیار رسم شده است. آنالیز و واریانس یک‌طرفه و تست تکمیلی توکی (در هر گروه  $n=7$ ). CCl<sub>4</sub>: تتراکلرید کربن، AP: آلفاپینن، APNP: نانوفیتوزوم آلفاپینن. ( $***P < 0.001$ ) در مقایسه با گروه کنترل. ( $++P < 0.01$ ) و ( $+++P < 0.001$ ) در مقایسه با گروه CCl<sub>4</sub>.

Figure 4- Effects of APNP on glutathione activit in brain damage caused by CCl<sub>4</sub>. The graph is plotted in terms of mean  $\pm$  standard deviation. One-way analysis and variance and Tukey supplementary test ( $n=7$  in each group). CCl<sub>4</sub>; carbon tetrachloride, AP; Alpha-pinene and APNP; Alpha-pinene nanophytosome. ( $***P < 0.001$ ) as compared to control group. ( $++P < 0.01$ ), ( $+++P < 0.001$ ) as compared to CCl<sub>4</sub> group.

۴-۵- اثر نانوفیتوزوم آلفاپینن بر سطح پراکسیداسیون لیپیدی در آسیب مغزی ناشی از CCl<sub>4</sub>

سطح MDA در گروه CCl<sub>4</sub> در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری ( $P < 0.001$ ) افزایش یافت. گروه تیمار با آلفاپینن و نانوفیتوزوم آلفاپینن ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به طور معنی داری به ترتیب ( $P < 0.001$ ) و ( $P < 0.001$ ) نسبت به گروه CCl<sub>4</sub> کاهش یافت (شکل ۵).



شکل ۵- اثر نانوفیتوزوم آلفاپینن بر فعالیت مالون دی آلدئید در آسیب مغزی ناشی از CCl<sub>4</sub>. نمودار برحسب میانگین  $\pm$  انحراف معیار رسم شده است. آنالیز و واریانس یک‌طرفه و تست تکمیلی توکی (در هر گروه  $n=7$ ). CCl<sub>4</sub>: تتراکلرید کربن، AP: آلفاپینن، APNP: نانوفیتوزوم آلفاپینن. ( $***P < 0.001$ ) در مقایسه با گروه کنترل. ( $++P < 0.01$ ) و ( $+++P < 0.001$ ) در مقایسه با گروه CCl<sub>4</sub>.

Figure 5- Effects of APNP on glutathione activit in brain damage caused by CCl<sub>4</sub>. The graph is plotted in terms of mean  $\pm$  standard deviation. One-way analysis and variance and Tukey supplementary test ( $n=7$  in each group). CCl<sub>4</sub>; carbon tetrachloride, AP; Alpha-pinene and APNP; Alpha-pinene nanophytosome. ( $***P < 0.001$ ) as compared to control group. ( $++P < 0.01$ ), ( $+++P < 0.001$ ) as compared to CCl<sub>4</sub> group.

## ۵- بحث

CCl<sub>4</sub> یک مایع بی‌رنگ و چربی‌دوست که به راحتی می‌تواند از غشای سلولی از جمله سد خونی-مغزی عبور کند [19]. CCl<sub>4</sub> پس از تجویز در اندام‌های مختلف مجتمع می‌شود. بافت‌های کبد و مغز به سرعت CCl<sub>4</sub> را دریافت کرده و به گونه‌های فعال اکسیژن آسیب‌رسان مانند رادیکال تری‌کلرومتیل (CCl<sub>3</sub>•) و تری‌کلرومتیل پروکسیل (CCl<sub>3</sub>OO•) متابولیزه می‌شود. رادیکال‌های آزاد در پراکسیداسیون لیپیدی سیستم غشایی نقش دارند. افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و تغییر در وضعیت آنتی‌اکسیدانی به‌طور قابل توجهی با اختلالات ناشی از استرس اکسیداتیو مرتبط است [4]. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، تزریق مزمن CCl<sub>4</sub> سطح MDA را افزایش و سطح GSH را کاهش می‌دهد. کاهش GSH باعث افزایش حساسیت مغز به استرس اکسیداتیو و اختلال در تعادل ردوکس می‌شود. در راستای این مطالعه، زرگر و وانی [19] در سال ۲۰۲۱ گزارشی کردند که CCl<sub>4</sub> در دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند سمیت را در مغز موش ایجاد کند. همچنین، مطالعه ریتش و همکاران [20] نشان داد، پس از تزریق CCl<sub>4</sub> سطح GSH و سطح MDA را در مغز موش افزایش داد.

تغییرات اکسیداتیو بر روی پروتئین‌هایی مانند گلوکوتایون سنتتاز و پروتئین‌های عملکردی میتوکندریایی سلول‌های مغز اثرات مخرب دارد که سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آن می‌شود [20]. همچنین نتایج ما نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPx کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده سمیت CCl<sub>4</sub> بر مغز موش است. در راستای این تحقیق، مطالعه آلتینوز و همکاران [5] در سال ۲۰۱۸ نشان داد که تزریق CCl<sub>4</sub> باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود که با نتایج پژوهش ما مطابقت دارد. تعادل ظرفیتی بین تشکیل H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> با تغییر شکل O<sub>2</sub> توسط SOD و حذف توسط CAT و GPx مورد نیاز است. هرگونه عدم تعادل بر سایر فعالیت‌های آنزیمی تاثیر می‌گذارد. کاهش فعالیت SOD، CAT و GPx با ROS اضافی همراه است که می‌تواند باعث تخریب یکپارچگی و عملکرد غشای سلولی شود. القای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، سم‌زدایی متابولیک و دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت را افزایش می‌دهد، در حالی که کاهش آن‌ها منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود.

آلفاپین را می‌توان به‌عنوان مولکول آنتی‌اکسیدانی در نظر گرفت که قادر به حذف رادیکال‌های آزاد و در نتیجه محافظت از ساختارهای سلولی در برابر عوامل سیتوتوکسیک است [21]. گزارش شده است که آلفاپین باعث افزایش سطح GSH و کاهش سطح MDA در سمیت سلولی ناشی از آسپیرین شد. همچنین آلفاپین به‌طور قابل توجهی بقای سلول‌ها را در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از آسپیرین را افزایش داد [21]. یوادانت و همکاران [22] در سال ۲۰۲۳ نقش محافظتی آلفاپین را در پارامترهای بیوشیمیایی (ALT, AST, ALP, TB, UA)، کراتینین، اوره، کلسترول و تری‌گلیسرید و همچنین فعالیت NO را در سمیت ناشی از CCl<sub>4</sub> در کبد و کلیه موش بررسی کردند.

مطالعات متعدد نشان داده است که اکثر پلی‌فنل‌ها، ترکیبات قطبی هستند که به دلیل حلالیت ضعیف در چربی، توانایی آن‌ها برای عبور از غشاهای بیولوژیکی غنی از چربی محدود می‌شود. علاوه بر این، اندازه مولکولی بزرگ آن‌ها (به دلیل حلقه‌های فنولی متعدد) جذب از روده به خون از طریق انتشار ساده کاهش می‌دهد. گزارش شده است که استفاده از نانو حامل‌ها به‌طور بالقوه سبب بهبود پایداری فیزیکی و زیستی این ترکیبات زیست فعال می‌شود. نانوفیتوزوم‌ها نوع جدیدی از فرمولاسیون عصاره‌های گیاهی هستند که جذب بهتر و فراهمی زیستی بهتری نسبت به عصاره‌های گیاهی رایج دارند [10]. حاجی‌زاده مقدم و همکاران [23] در سال ۲۰۲۳ نشان دادند که ترکیب فلاونوئیدی کوئرستین به دلیل ناپایداری و حلالیت کم در آب فراهمی زیستی کمتری نسبت به نانوفیتوزوم کوئرستین دارد. نانوفیتوزوم کوئرستین دارای اثرات ضد آپوپتوز و آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به کوئرستین در دوز مشابه می‌باشد. همچنین شریرام و همکاران [24] در سال ۲۰۲۲ نشان دادند که نانوفیتوزوم سیلیمارین اثرات محافظت کبدی برتری نسبت به سیلیمارین در سمیت کبدی ناشی از CCl<sub>4</sub> دارد. فرمولاسیون فیتوزومی سیلیمارین به‌طور موثر حلالیت آبی سیلیمارین را افزایش داد. همچنین نانوفیتوزوم سیلیمارین به‌طور قابل توجهی فراهمی زیستی سیلیمارین را افزایش داد و باعث بازیابی کارآمد سطوح طبیعی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و بهبود همه تغییرات سلولی ناشی از سمیت با CCl<sub>4</sub> شد. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان می‌دهد که نانوفیتوزوم آلفاپین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPx را افزایش می‌دهد. همچنین تیمار با نانوفیتوزوم آلفاپین سطح GSH مغز را در موش‌های دریافت‌کننده CCl<sub>4</sub> افزایش و سطح MDA را کاهش می‌دهد. مشابه گزارش‌های قبلی، ما از یک سیستم دارورسانی جدید برای غلبه بر این موانع و همچنین فراهمی زیستی کم پلی‌فنل‌ها و افزایش کارایی در مغز استفاده کردیم. هرچند پژوهشگران اثر نانوفیتوزوم را با مطالعات دیگر مقایسه کرده‌اند اما از آنجایی که مورد مشابه‌ای از نانوفیتوزوم آلفاپین تاکنون گزارش نشده، در این مطالعه به‌منظور افزایش فراهمی زیستی آلفاپین برای اولین بار نانوفیتوزوم آلفاپین ساخته و ارایه شد. این اثرات احتمالاً به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوفیتوزوم آلفاپین نسبت داده می‌شود.



از این رو، نتایج این مطالعه، برتری نانوفیتوزوم آلفاپینن را نسبت به آلفاپینن خالص به دلیل فراهمی زیستی و حلالیت بهتر آن اثبات می‌کند. هرچند نیاز به مطالعات بیشتر در سطح مولکولی و بیان ژن می‌باشد تا مکانیسم دقیق اثرگذاری نانوفیتوزوم آلفاپینن گزارش شود.

## ۶- نتیجه‌گیری

یافته‌های این تحقیق نشان داد تزریق مزمن  $CCl_4$  در طی ۱۴ روز متوالی باعث کاهش شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش استرس اکسیداتیو در مغز شد. درمان با آلفاپینن و نانوفیتوزوم آلفاپینن به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش قابل توجهی در استرس اکسیداتیو و آسیب مغزی شد. همچنین اثرات بهبودی نانوفیتوزوم آلفاپینن به دلیل حلالیت و فراهمی زیستی بالا و نفوذپذیری بیشتر از سد خونی-مغزی در مقایسه با آلفاپینن به‌طور چشمگیری در مدل آسیب مغزی القاشده با  $CCl_4$  بیشتر است؛ بنابراین می‌تواند یک نامزد احتمالی برای مدیریت آسیب مغزی باشد.

## سپاس‌گزاری

این پژوهش با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه مازندران انجام گرفته است. بدین‌وسیله از مسئولین مربوطه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

## تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

## منابع

- [1] Weber, L. W. D., Boll, M., & Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical reviews in toxicology*, 33(2), 105–136. DOI:10.1080/713611034
- [2] Okoro, I. O., Kadiri, H. E., & Inegbedion, A. (2019). Ameliorative effects of *Allium cepa* extract on carbon tetrachloride neurotoxicity in rat. *Thai journal of pharmaceutical sciences*, 43(1), 14–20.
- [3] Shaalan, S., Radwan, O., & Saleh, H. (2017). Role of wheat germ oil against carbon tetrachloride-induced neurotoxicity in brain tissues of adult male mice. *Egyptian journal of zoology*, 67(67), 1–18. DOI:10.12816/0037791
- [4] Zaib, S., & Khan, M. R. (2014). Protective effect of Cucurbita pepo fruit peel against  $CCl_4$  induced neurotoxicity in rat. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 27(6), 1967–1973.
- [5] Altinoz, E., Erdemli, M. E., Gul, M., Aksungur, Z., Gul, S., Bag, H. G., ... & Turkoz, Y. (2018). Neuroprotection against  $CCl_4$  induced brain damage with crocin in Wistar rats. *Biotechnic and histochemistry*, 93(8), 623–631. DOI:10.1080/10520295.2018.1519725
- [6] Mughal, T. A., Saleem, M. Z., Ali, S., Anwar, K. K., Bashir, M. M., Babar, M., & Khan, M. A. (2019). Evaluation of hepatotoxicity of carbon tetrachloride and pharmacological intervention by Vitamin E in Balb C mice. *Pakistan journal of zoology*, 51(2), 755–761. DOI:10.17582/journal.pjz/2019.51.2.755.761
- [7] Taamalli, A., Feriani, A., Lozano-Sanchez, J., Ghazouani, L., El Mufti, A., Allagui, M. S., ... & Arraéz-Roman, D. (2020). Potential hepatoprotective activity of super critical carbon dioxide olive leaf extracts against  $CCl_4$ -induced liver damage. *Foods*, 9(6), 804. DOI:10.3390/foods9060804
- [8] Allenspach, M., & Steuer, C. (2021).  $\alpha$ -Pinene: a never-ending story. *Phytochemistry*, 190, 112857. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112857>
- [9] Jain, N., Gupta, B. P., Thakur, N., Jain, R., Banweer, J., Jain, D. K., & Jain, S. (2010). Phytosome: a novel drug delivery system for herbal medicine. *International journal of pharmaceutical sciences and drug research*, 2(4), 224–228.
- [10] Ghanbarzadeh, B., Babazadeh, A., & Hamishehkar, H. (2016). Nano-phytosome as a potential food-grade delivery system. *Food bioscience*, 15, 126–135. DOI:10.1016/j.fbio.2016.07.006
- [11] Al-Askar, M., Bhat, R. S., Selim, M., Al-Ayadhi, L., & El-Ansary, A. (2017). Postnatal treatment using curcumin supplements to amend the damage in VPA-induced rodent models of autism. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 1–11. DOI:10.1186/s12906-017-1763-7
- [12] Panahi Kokhdan, E., Ahmadi, K., Sadeghi, H., Sadeghi, H., Dadgary, F., Danaei, N., & Aghamaali, M. R. (2017). Hepatoprotective effect of *Stachys pilifera* ethanol extract in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 1389–1393.
- [13] Khan-Mohammadi-Khorrami, M. K., Asle-Rousta, M., Rahnema, M., & Amini, R. (2022). Neuroprotective effect of alpha-pinene is mediated by suppression of the TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway in Alzheimer's disease rat model. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 36(5), e23006. DOI:10.1002/jbt.23006

- [14] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- [15] Genet, S., Kale, R. K., & Baquer, N. Z. (2002). Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Molecular and cellular biochemistry*, 236(1-2), 7-12. DOI:10.1023/A:1016103131408
- [16] Sharma, M., & Gupta, Y. K. (2002). Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Life sciences*, 71(21), 2489-2498. DOI:10.1016/S0024-3205(02)02083-0
- [17] Fukuzawa, K., & Tokumura, A. (1976). Glutathione peroxidase activity in tissues of vitamin E-deficient mice. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 22(5), 405-407. DOI:10.3177/jnsv.22.405
- [18] Kim, M. S., Lee, J. I., Lee, W. Y., & Kim, S. E. (2004). Neuroprotective effect of Ginkgo biloba L. extract in a rat model of Parkinson's disease. *Phytotherapy research*, 18(8), 663-666. DOI:10.1002/ptr.1486
- [19] Zargar, S., & Wani, T. A. (2021). Protective role of quercetin in carbon tetrachloride induced toxicity in rat brain: Biochemical, spectrophotometric assays and computational approach. *Molecules*, 26(24), 7526. DOI:10.3390/molecules26247526
- [20] Ritesh, K. R., Suganya, A., Dileepkumar, H. V., Rajashekar, Y., & Shivanandappa, T. (2015). A single acute hepatotoxic dose of CCl4 causes oxidative stress in the rat brain. *Toxicology reports*, 2, 891-895. DOI:10.1016/j.toxrep.2015.05.012
- [21] Bouzenna, H., Hfaiedh, N., Giroux-Metges, M. A., Elfeki, A., & Talarmin, H. (2017). Potential protective effects of alpha-pinene against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 93, 961-968. DOI:10.1016/j.biopha.2017.06.031
- [22] Udavant, P., Gurav, P., Kanade, G., Dashputre, N., Sable, R., Khairnar, S., ... & Raut, H. (2023). Evaluation of hepatoprotective and nephroprotective effect of  $\alpha$ -pinene on wistar albino rat. *Biomedical and pharmacology journal*, 16(1), 103-112. DOI:10.13005/bpj/2592
- [23] Hajizadeh Moghaddam, A., Eslami, A., Jelodar, S. Khanjani, Ranjbar, M., & Hasantabar, V. (2023). Preventive effect of quercetin-Loaded nanophytosome against autistic-like damage in maternal separation model: the possible role of Caspase-3, Bax/Bcl-2 and Nrf2. *Behavioural brain research*, 441, 114300. DOI:10.1016/j.bbr.2023.114300
- [24] Shriram, R. G., Moin, A., Alotaibi, H. F., Khafagy, E. S., Al Saqr, A., Abu Lila, A. S., & Charyulu, R. N. (2022). Phytosomes as a plausible nano-delivery system for enhanced oral bioavailability and improved hepatoprotective activity of silymarin. *Pharmaceuticals*, 15(7), 790. DOI:10.3390/ph15070790