

بررسی اثر ژل رویال بر تغییرات هیستوپاتولوژیک و بیوشیمیایی ریه موش‌های صحرائی متعاقب مسمومیت با آرسنیک تری اکساید

حسین محمدی^۱، بابک محمدیان^{۲*}، حسین نجف‌زاده‌ورزی^۳ و علی شهریار^۴

^۱ دانش‌آموخته دکتری تخصصی پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۴ دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۴

چکیده

گونه‌های فعال اکسیژن و آسیب اکسیداتیو اصلی‌ترین عوامل دخیل در آسیب‌های بافتی ناشی از آرسنیک تری اکساید است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات محافظتی ژل رویال بر پارامترهای استرس اکسیداتیو و آسیب‌های هیستوپاتولوژیک وارده بر بافت ریه ناشی از مسمومیت با آرسنیک تری اکساید بوده است. ۴۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار آلبینو به مدت ۳۰ روز به صورت خوراکی آرسنیک تری اکساید و ژل رویال دریافت کردند و به صورت تصادفی در ۸ گروه پنج تایی تقسیم شدند؛ گروه اول نرمال سالین را با دوز ۱ mg/kg، گروه دوم ژل رویال را با دوز ۱۵۰ mg/kg، گروه سوم آرسنیک تری اکساید را با دوز ۱ mg/kg، گروه چهارم آرسنیک تری اکساید (۱ mg/kg) را به همراه ژل رویال با دوز ۱۵۰ mg/kg، گروه پنجم آرسنیک تری اکساید (۱ mg/kg) را به همراه ژل رویال با دوز ۱۰۰ mg/kg، گروه ششم آرسنیک تری اکساید (۱ mg/kg) را به همراه ژل رویال با دوز ۱۰۰ mg/kg، گروه هفتم آرسنیک تری اکساید (۱ mg/kg) را به همراه ویتامین E و ژل رویال با دوز ۱۰۰ mg/kg، گروه هشتم آرسنیک تری اکساید (۱ mg/kg) را به همراه ویتامین E و ژل رویال (هر دو) با دوز ۱۰۰ mg/kg دریافت کردند. سپس فراسنجه‌های استرس اکسیداتیو شامل: مالون دی آلدئید (MDA)، گلووتاتیون پراکسیداز (GPx)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین آسیب‌های وارده به بافت ریه از طریق رنگ‌آمیزی بافتی همتوکسیلین-ئوزین مورد سنجش قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آرسنیک تری اکساید سبب افزایش MDA و کاهش GPx، SOD و CAT گردید. درمان با ژل رویال باعث کاهش سطح MDA و افزایش غلظت GPx، SOD و CAT در بافت ریه گردید. همچنین شدت آسیب‌های بافتی ریه کاهش یافت. به طور کلی ژل رویال سبب کاهش استرس اکسیداتیو و آسیب‌های بافتی ریه گردید.

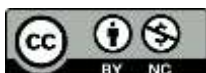
کلمات کلیدی: آرسنیک تری اکساید، ژل رویال، ریه، استرس اکسیداتیو

مقدمه

آرسنیک یک عنصر فلزی سمی قوی محیطی است که به طور گسترده در خاک، آب و غذا یافت می‌شود. ترکیبات آن به سه شکل گازی، آلی و معدنی موجود است. این ماده معمولاً از انحلال مواد معدنی ناشی از پساب‌های صنعتی و

* نویسنده مسئول: بابک محمدیان، دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: mohammadb@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

ژنوتوکسیسیتی بر روی سلول‌های انسانی، تغییرات بافتی دژنراتیو و بی‌ثباتی ساختار اسکلت سلولی نیز از آسیب‌های مسمومیت با آرسنیک می‌باشند (Abdollahzade et al, 2021).

مکانیسم‌های مختلفی در مطالعات قبلی به عنوان واسطه‌های سلولی و مولکولی پیشنهاد شده بود، که بیش‌تر آن‌ها نشان می‌دهد که نقش استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد در این مسمومیت قابل توجه است که منجر به افزایش استفاده درمانی از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی و عوامل شل‌کننده شده است (Flora et al, 2007). مطالعات قبلی نشان می‌داد که استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی در برابر پاتوفیزیولوژی اندام‌هایی که در معرض مواد شیمیایی قرار می‌گیرند، مفید است (Yun et al, 2016). به تازگی، ژل رویال به دلیل مطالعاتی که نشان داده است یک آنتی-اکسیدان بسیار کارآمد است و دارای قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد است، مورد توجه خاصی قرار گرفته است (Cemek et al, 2010; Silici et al, 2011). ژل رویال توسط غدد زیر حلق و فک پایین زنبورهای عسل کارگر (*Apis mellifera*) ترشح می‌شود. ژل رویال حاوی بسیاری از ترکیبات مهم با فعالیت بیولوژیکی مانند اسیدهای آمینه آزاد، پروتئین‌ها، قندها، اسیدهای چرب، مواد معدنی و ویتامین‌ها است (Nakajima et al, 2009). تا کنون مشخص شده است که ژل رویال دارای چندین فعالیت فیزیولوژیکی در حیوانات آزمایشگاهی از جمله فعالیت‌های گشاد کننده عروق و کاهش فشار خون، القای کاهش سطح کلسترول سرم، ضد میکروبی، ضد حساسیت، ضد التهابی، تنظیم کننده سیستم ایمنی و خواص آنتی‌اکسیدانی است (Abdollahzade et al, 2021).

در مطالعات پیشین اثرات آنتی‌اکسیدانی‌های فراوانی از جمله ملاتونین، رزوراترول، آسکوربیک اسید و آلفا توکوفرول در پیش‌گیری از اثرات زیان‌بار مسمومیت با آرسنیک تری اکساید بررسی شده است (Abdollahzade et al, 2021; Mukhopadhyay et al, 2013; Zhang et al, 2013). تا کنون مطالعه‌ای بر روی اثرات ژل رویال در

معدنی و رسوبات جوی وارد آب می‌شود. در سال‌های اخیر، به دلیل توسعه صنعتی و افزایش آلودگی، میزان آرسنیک نیز افزایش یافته است (Jomova et al, 2011). میلیون‌ها نفر در سراسر جهان، عمدتاً در کشورهای در حال توسعه، به دلیل انتشار گازهای گلخانه‌ای ناشی از فعالیت‌های معدنی، استفاده از صنایع یا آفت‌کش‌ها، یا آب چاه‌های آلوده از قرار گرفتن در معرض آرسنیک مزمن رنج می‌برند (Burchiel et al, 2009; States et al, 2011). متداول‌ترین راه برای افزایش در معرض قرار گرفتن محیط زیست به آرسنیک معدنی در سراسر جهان از طریق آب آشامیدنی است. قرار گرفتن مزمن در معرض آرسنیک باعث ایجاد طیف گسترده‌ای از اثرات سمی می‌شود و بنابراین، این فلز در گروه یک سرطان‌زا در انسان طبقه‌بندی می‌شود (آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان) (Mukhopadhyay et al, 2013). قرار گرفتن در معرض آرسنیک با افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های ریوی همراه است، که ممکن است آن را به سمی منحصر به فرد که منجر به سرکوب ایمنی ذاتی و ضایعات ریوی می‌شود، تبدیل کند (Kozul et al, 2009; Zhao et al, 2012). جدا از این اثرات مضر، آرسنیک تری اکسید (As_2O_3) دارای اثرات قابل ملاحظه‌ای در درمان افراد مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد عود کننده و مقاوم است (Zhang et al, 2010). آرسنیک و ترکیبات آن در داروهای سرطان، شیشه، سرامیک، مواد رنگی، آلیاژهای فلزی و صنایع دامداری و کشاورزی نیز استفاده می‌شود (Xu et al, 2019). مسمومیت با آرسنیک یک موضوع بهداشتی است که اهمیت زیادی برای سلامت انسان دارد و اغلب باعث انواع بیماری‌ها از جمله دژنراسیون کبدی، التهاب، نکروز و آپوپتوز می‌شود (Abdollahzade et al, 2021). از جمله مشکلاتی که ایجاد می‌کند شامل اختلالات عصبی، سرطان‌ها، کم خونی، بیماری‌های قلبی عروقی، ریوی، کبدی، دیابت، ضایعات پوستی و اختلالات غدد درون‌ریز در بدن انسان می‌باشد. آرسنیک با ایجاد آسیب اکسیداتیو سمیت سلولی را آغاز و گسترش می‌دهد (Abdollahzade et al, 2021). علاوه بر این،

۳- گروه سوم (کنترل منفی، دریافت کننده آرسنیک تری اکساید)، که آرسنیک تری اکساید را به صورت خوراکی (گاواژ) به مدت ۳۰ روز با دوز ۱ mg/kg دریافت نمودند (Reagan-Shaw et al, 2008).

۴- گروه چهارم (تیمار اول)، که آرسنیک تری اکساید (۱mg/kg) را به همراه ژل رویال به صورت خوراکی (گاواژ) با دوز ۱۵۰ mg/kg به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند.

۵- گروه پنجم (تیمار دوم)، که آرسنیک تری اکساید (۱mg/kg) را به همراه ژل رویال به صورت خوراکی (گاواژ) با دوز ۱۰۰ mg/kg به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند.

۶- گروه ششم (تیمار سوم)، که آرسنیک تری اکساید (۱mg/kg) را به همراه ژل رویال به صورت خوراکی (گاواژ) با دوز ۵۰ mg/kg به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند.

۷- گروه هفتم (تیمار چهارم)، که آرسنیک تری اکساید (۱mg/kg) را به همراه ویتامین E با دوز ۱۰۰ mg/kg به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند.

۸- گروه هشتم (تیمار پنجم) که آرسنیک تری اکساید (۱mg/kg) را به همراه ویتامین E و ژل رویال (هر دو) با دوز ۱۰۰ mg/kg به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند.

یک روز بعد از آخرین روز مداخلات و با رعایت اخلاق کار با حیوانات، موش‌ها با تزریق دوز بیش از حد مجاز ترکیب کتامین - زایلازین (۲۵۰ mg/kg، ۳۰ mg/kg) آسان‌کشی شدند و نمونه‌های بافت ریه اخذ گردید. مقدار تقریبی ۴۰ میلی‌گرم از هر کدام از بافت‌های ریه گروه‌های مختلف در بافر فسفات (PH برابر ۷/۴) به طور کامل هموژن شده و بعد از سانترفیوژ (به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm) و جداسازی مایع رویی جهت اندازه‌گیری شاخص‌های استرس اکسیداتیو (گلوکوتاتیون پراکسیداز، مالون دی‌آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز) مورد استفاده قرار گرفت. پارامترهای گلوکوتاتیون پراکسیداز با کیت تجاری (شرکت Randox انگلستان، Cat No: SC692) با دقت اندازه‌گیری ۷۵-۹۲۵ IU/L و سوپراکسید

مسمومیت القا شده توسط آرسنیک تری اکساید انجام نشده است. در مطالعه حاضر، اثر ژل رویال بر تغییرات هیستوپاتولوژیک و بیوشیمیایی ریه موش‌های صحرایی متعاقب مسمومیت با آرسنیک تری اکساید مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر از ۴۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار آلبینو با وزن حدود ۱۸۰-۲۲۰ گرم استفاده گردید. حیوانات در شرایط استاندارد و در دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد، رطوبت تقریبی ۵۵ درصد و سیکل نوردهی ۱۲/۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی نگهداری شدند. غذای پلیت مخصوص جوندگان و آب به مقدار کافی در اختیار موش‌های صحرایی قرار داده شد. پیش از انجام آزمایشات حیوانات به محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی در دانشکده دامپزشکی منتقل و به مدت یک هفته در آن‌جا نگهداری شدند تا به این شرایط عادت کنند. برای القا مسمومیت ریوی در پژوهش حاضر از آرسنیک تری اکساید به صورت خوراکی (گاواژ) روزانه به مدت ۳۰ روز استفاده گردید. برای درمان هم از دوزهای مختلف (۵۰ mg/kg، ۱۰۰، ۱۵۰) ژل رویال (سیگما-آلدريج) استفاده گردید. همچنین از ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدان برای قیاس با گروه‌های درمانی استفاده شد.

موش‌های صحرایی به صورت تصادفی در ۸ گروه ۵ تایی به ترتیب زیر تقسیم‌بندی شدند:

۱- گروه اول (شاهد، دریافت کننده نرمال سالین)، که نرمال سالین را با دوز ۱ mg/kg به صورت خوراکی (گاواژ) به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند.

۲- گروه دوم (کنترل مثبت، دریافت کننده ژل رویال)، که ژل رویال (سیگما-آلدريج) را به صورت خوراکی (گاواژ) با دوز ۱۵۰ mg/kg به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند (Karaca et al, 2010).

برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۲۰ استفاده گردید به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها از آزمون آماری کولموگرو-سمیرنوف استفاده گردید. سپس داده‌هایی که توزیع نرمال داشتند با آزمون واریانس یک طرفه ANOVA و داده‌هایی که فاقد توزیع نرمال بودند با آزمون کروسکال والیس مورد ارزیابی قرار گرفتند. سطح معنی‌داری داده‌ها $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج مربوط به پارامترهای استرس اکسیداتیو در Figure 1 درج گردیده است. Figure 1.A یافته‌های مربوط به غلظت MDA را نشان می‌دهد. همان گونه که از نمودار مشخص است، در گروه کنترل منفی پس از القا مسمومیت با آرسنیک تری اکساید غلظت مالون دی آلدئید افزایش یافته که اختلاف آن با گروه‌های شاهد و کنترل مثبت از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$). تمامی گروه‌های تیمار سطح مالون دی آلدئید را در قیاس با گروه‌های شاهد و کنترل مثبت به طرز معنی‌داری کاهش دادند ($P < 0/05$). تمام گروه‌های تیمار با گروه تیمار آرسنیک تری اکساید + ژل رویال با دوز ۱۵۰ mg/kg معنی‌دار داشتند ($P < 0/05$). Figure 1.B مقادیر بیان آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز را نشان می‌دهد. تمامی گروه‌های تیمار و گروه کنترل منفی با گروه‌های شاهد و کنترل مثبت اختلاف معنی‌دار داشتند ($P < 0/05$). درمان با دوزهای مختلف ژل رویال سطح گلوکوتاتیون پراکسیداز را افزایش داد و به جز گروه تیمار اول در بقیه گروه‌ها اختلاف با گروه کنترل منفی معنی‌دار بود ($P < 0/05$). مقادیر SOD در Figure 1.C نشان داده شده است. مسمومیت با آرسنیک تری اکساید سطح SOD را به طرز معنی‌داری در قیاس با گروه‌های شاهد و کنترل مثبت کاهش داد ($P < 0/05$). به جز گروه تیمار اول بقیه گروه‌های درمانی به طور معنی‌داری سطح سوپراکسید دیسموتاز را در قیاس با گروه کنترل منفی افزایش دادند. همچنین اختلاف بین گروه تیمار آرسنیک تری اکساید + ژل رویال با دوز ۱۵۰ mg/kg با سایر گروه‌های تیمار از

دیسموتاز با کیت تجاری (شرکت Randox انگلستان، Cat No: SD125) با محدوده اندازه‌گیری ۴/۵۲-۰/۰۶ U/ml و طبق دستورات موجود در راهنمای کیت مورد سنجش قرار گرفت. برای سنجش غلظت مالون دی آلدئید از روش Ohkawa و همکاران (۱۹۷۹) استفاده شد. مطابق این روش، ده درصد هموزن بافت با سدیم دودسیل سولفات، بافر استات (pH 3.5) و محلول آبی تیوباربیتریک اسید مخلوط شد. پس از حرارت دادن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه، رنگدانه قرمز تولید شده با مخلوط n-بوتانول-پیریدین استخراج شد و جذب آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر برآورد شد. سطح آنزیم کاتالاز طبق روش Aebi و همکاران (۱۹۸۴) مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور خلاصه، واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر نمونه بافت هموزن شده به ۱۰۰۰ میکرولیتر سالیین بافر فسفات (pH = 7) آغاز شد. پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن، محلول نهایی با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. نمونه‌های بافت ریه در فرمالین بافر ۱۰ درصد فیکس و تثبیت گردید، پس از آن وارد سبدهای دستگاه اتوتکنیکون شدند، مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها شامل: آب‌گیری، شفاف‌سازی و آغشته‌سازی به صورت خودکار توسط دستگاه مذکور انجام شد، سپس در پارافین قالب‌گیری شدند. از بلوک‌های پارافینی تهیه شده برش‌هایی به ضخامت تقریبی ۵ میکرومتر با استفاده از میکروتوم چرخشی تهیه گردید. پس از آن برش‌های تهیه شده پارافین‌زدایی شده و بر روی لام‌های میکروسکوپی گذاشته شده و تثبیت گردید. در نهایت لام‌ها با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوژین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. آسیب‌های بافت ریه توسط یک پاتولوژیست و بدون اطلاع از گروه‌بندی‌ها و آزمایشات صورت گرفته بر اساس شدت آسیب به طور نیمه‌کمی و به صورت نرمال (-)، خفیف (+)، متوسط (++) و شدید (+++) دسته‌بندی شدند.

و شاهد به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0.05$). تمامی گروه‌های تیمار به طور معنی داری سطح آنزیم کاتالاز را در قیاس با گروه کنترل منفی افزایش دادند ($P < 0.05$).

نظر آماری معنی دار گزارش گردید ($P < 0.05$). سطح کاتالاز در بافت ریه در Figure 1.D نشان داده شده است. کاتالاز در گروه کنترل منفی در قیاس با گروه کنترل مثبت

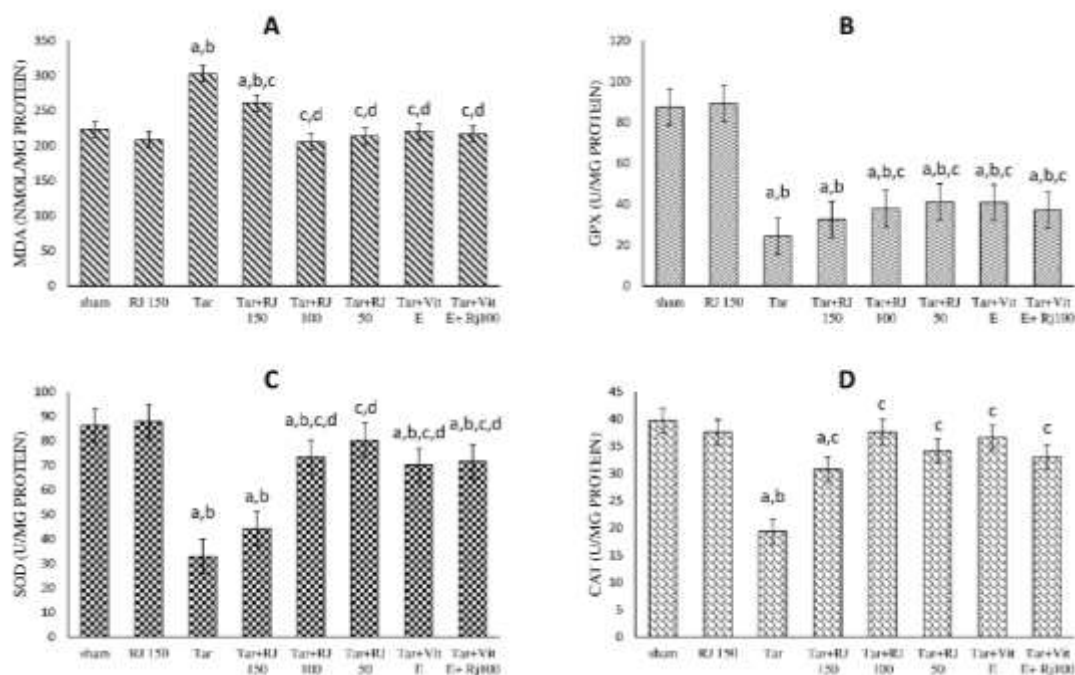


Figure 1: A; The comparison of Malondialdehyde (MDA), B; The comparison of Glutathione peroxidase (GPx), C; the comparison of Superoxide dismutase (SOD), and D; the comparison of catalase (CAT) in different experimental groups of study. a means the significant difference with sham group ($p < 0.05$). b means the significant difference with positive control group ($p < 0.05$). c means the significant difference with negative control group ($p < 0.05$). d means the significant difference with trioxide arsenic + royal jelly 150 mg/kg group ($p < 0.05$).

۴۰ درصد نمونه‌های نرمال و ۶۰ درصد دیگر دارای آسیب خفیف بافتی بودند. در گروه تیمار اول که ژل رویال با دوز ۱۵۰ mg/kg دریافت نموده بود نیز نتایج مشابه با گروه کنترل منفی مشاهده گردید. در سایر گروه‌های تیمار هیچ گونه آسیب بافتی در بافت ریه مشاهده نشد و همه نرمال بودند.

مقایسه اثرات هیستوپاتولوژیک آرسنیک تری اکساید ۱ mg/kg و تیمارهای انجام شده بر بافت ریه موش‌های نژاد ویستار در گروه‌های ۸ گانه مورد مطالعه در Table 1 درج شده است. همان طور که از جدول مشخص است، در گروه‌های شاهد و کنترل مثبت هیچ گونه آسیب بافتی در بافت ریه مشاهده نشد. در گروه دریافت کننده آرسنیک تری اکساید که هیچ درمانی دریافت نکردند (کنترل منفی)

Table 1: Comparison of histopathological effects of arsenic trioxide 1 mg / kg on lung tissue of male Wistar rats in the 8 groups studied

Groups	Normal	Low damage	Moderate damage	Severe damage
Normal saline (Sham group)	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Royal jelly 150 mg / kg	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Arsenic trioxide 1 mg/kg	2 (40%)	3 (60%)	0 (0%)	0 (0%)
Arsenic trioxide 1 mg/kg + Royal jelly 150 mg/kg	2 (40%)	3 (60%)	0 (0%)	0 (0%)
Arsenic trioxide 1 mg/kg + Royal jelly 100 mg/kg	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Arsenic trioxide 1 mg/kg + Royal jelly 50 mg/kg	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Arsenic trioxide 1 mg / kg + Vitamin E	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Arsenic trioxide 1 mg / kg + Vitamin E + Royal jelly 100 mg / kg	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Chi-square test results (P-value)	0.004			

گروه‌های درمانی به جز گروه تیمار اول (آرسنیک تری اکساید 1 mg/kg + ژل رویال با دوز 150 mg/kg) درمان‌های انجام شده به صورت معنی‌داری باعث کاهش آسیب‌های وارد شده به ریه‌ها در اثر القای مسمومیت گردید.

ارزیابی‌های پاتولوژیک بافت ریه در Figure 2 نشان داده شده است. در گروه‌های شاهد و گروه کنترل مثبت هیچ آسیب پاتولوژیکی در بافت ریه مشاهده نشد و ریه‌ها کاملاً سالم بودند. در گروه کنترل منفی Figure 2. C بینابینی و پرخونی شدید در بافت ریه مشاهده شد. در تمام

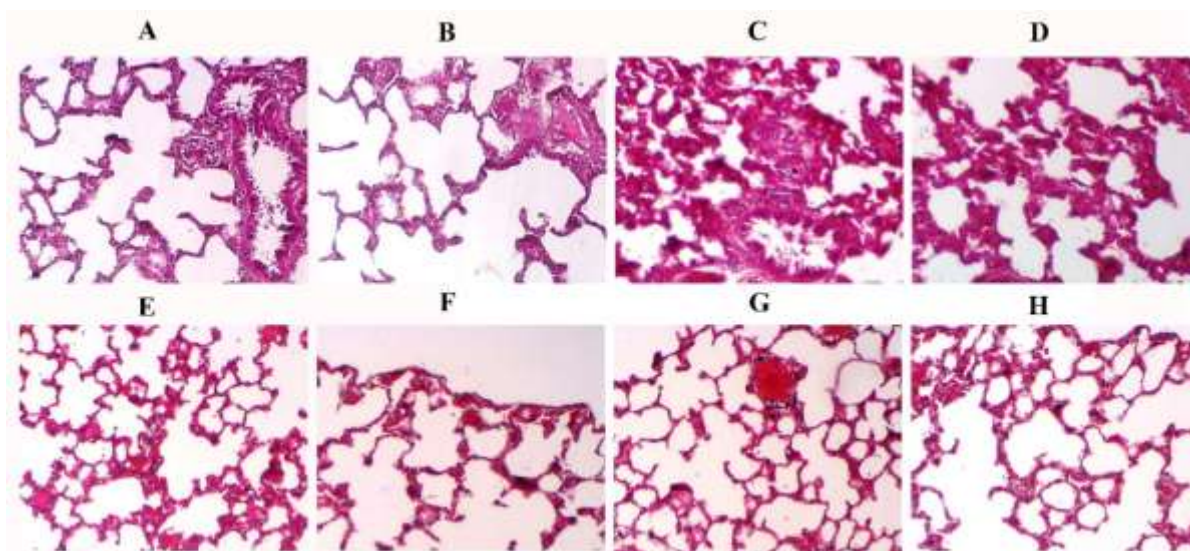


Figure 2: Hematoxylin and Eosin (H&E) stained slides of the lung tissue in different study groups with 100X magnification. A: Normal saline (Sham group), B: Royal jelly 150 mg / kg, C: Arsenic trioxide 1 mg / kg, D: Arsenic trioxide 1 mg / kg + Royal jelly 150 mg / kg, E: Arsenic trioxide 1 mg / kg + royal jelly 100 mg / kg, F: Arsenic trioxide 1 mg / kg + royal jelly 50 mg / kg, G: Arsenic trioxide 1 mg / kg + vitamin E & H: Arsenic trioxide 1 mg / kg + vitamin E + royal jelly 100 mg / kg. In all study groups the lung tissue was normal without any pathological lesions. Only in the control group and Arsenic trioxide 1 mg / kg + Royal jelly 150 mg / kg interstitial pneumonia and hyperemia were observed.

بحث

طور معنی داری در قیاس با گروه کنترل کاهش یافته و سطح مالون دی آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها به طرز معنی داری افزایش یافت (Mohanta et al, 2014). Lin و همکاران (۲۰۰۴) به بررسی توزیع بافتی گونه‌های آرسنیک پس از مصرف خوراکی تک دوزه و چند دوزه آرسنیک تری اکساید پرداختند و یافته‌های مطالعه آن‌ها حاکی از این بود که در بافت‌ها دی متیل آرسینیک اصلی-ترین متابولیت ناشی از آرسنیک تری اکساید بوده و با افزایش دوز مصرفی آرسنیک تری اکساید غلظت این متابولیت در بافت‌ها نیز افزایش می‌یابد. دی متیل آرسنیک به صورت غالب در بافت‌های ریه، کبد، کلیه و قلب یافت گردید (Lin et al, 2005).

Pourmoradian و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای اثرات مصرف ژل رویال را بر پارامترهای استرس اکسیداتیو در دیابت نوع دو در بیماران بررسی کردند و نتیجه گرفتند که پس از مصرف ژل رویال مقادیر SOD و GSH به شکل معنی داری افزایش و سطح مالون دی آلدئید به طور معنی-داری کاهش یافت. Karadeniz و همکارانش (۲۰۱۱) در پژوهشی اثرات ژل رویال را بر استرس اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از درمان با سیسیلاتین در موش‌های صحرایی بررسی کردند. نتایج مطالعه آن‌ها حاکی از آن بود که در گروهی که ژل رویال دریافت کرده بودند غلظت گلوکاتایون احیا، گلوکاتایون اس ترانسفراز و سوپراکسید دیسموتاز به صورت معنی داری در قیاس با گروهی که ژل رویال دریافت نکرده بودند افزایش یافته و سطح مالون دی آلدئید به صورت معنی دار کاهش یافت. Silici و همکاران (۲۰۱۱) اثرات محافظتی ژل رویال را در آسیب کلیوی القا شده توسط سیسیلاتین در موش‌های صحرایی مطالعه کردند. نتایج بررسی پارامترهای استرس اکسیداتیو در مطالعه آن‌ها که در گروه درمان شده با ژل رویال SOD، CAT و GSH-PX به صورت معنی داری در قیاس با گروه کنترل افزایش و سطح MDA کاهش یافت. در مطالعه‌ای دیگر، تضعیف ماندگاری آرسنیک توسط رزوراترول در ریه موش‌های در معرض تری اکسید آرسنیک مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های

ریه یکی از ارگان‌های اصلی است که تحت تأثیر آرسنیک قرار دارد. ریه انسان به دلیل دفع گاز دی متیل آرسین و همچنین فشار جزئی بالای اکسیژن می‌تواند یک اندام مستعد ابتلا به سرطان توسط آرسنیک باشد (Abdollahzade et al, 2021). با مکانیسم ناشناخته، حتی قرار گرفتن در معرض دوزهای پایین آرسنیک باعث بروز سرطان‌های مختلف از جمله سرطان ریه شده است و از آن جا که انسان می‌تواند هم از طریق تماس شغلی و هم از طریق آلودگی محیط زیست در معرض این ماده قرار گیرد، اجتناب و اقدامات پیش‌گیرانه ضروری است (Abdollahzade et al, 2021). استرس اکسیداتیو یکی از مکانیسم‌های احتمالی است که زمینه‌ساز مسمومیت ناشی از آرسنیک و آسیب بافتی است (Wang et al, 2013). در بافت‌های زنده، تشکیل ROS به دلیل قرار گرفتن در معرض آرسنیک باعث آسیب جدی اکسیداتیو به بافت‌ها و سلول‌ها می‌شود (Noman et al, 2015). آرسنیک منجر به تولید ROS و رادیکال‌های آزاد مانند پراکسید هیدروژن (H₂O₂)، نیتریک اکسید (NO-)، گونه‌های هیدروکسیل (HO-)، آنیون سوپراکسید (O₂-)، رادیکال دی متیل آرسنیک و رادیکال پراکسیل دی متیل آرسنیک می‌گردد (Abdollahzade et al, 2021). سمیت آرسنیک می‌تواند به صورت غیر مستقیم با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) یا مستقیماً با حمله به گروه‌های SH رخ دهد (Zaaza, 2014). پس از قرار گرفتن سلول‌ها در معرض آرسنیک، تولید بیش از حد ROS باعث تغییر در دفاع آنتی اکسیدانی ذاتی سلول و در نتیجه استرس اکسیداتیو می‌شود (Greani et al, 2017).

Mohanta و همکاران در مطالعه‌ای به بررسی وضعیت بیوشیمی خون، هورمون‌های تیروئید و وضعیت اکسیدان/آنتی‌اکسیدان خوکچه‌های هندی به چالش کشیده شده با آرسنیت سدیم یا تری اکسید آرسنیک پرداختند و نتیجه گرفتند که در گروهی که آرسنیک تری اکساید به جیره موش‌ها اضافه گردید مقادیر کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون ردوکتاز و گلوکاتایون اس ترانسفراز به

بلئومایسین تغییرات هیستوپاتولوژیک شدید مانند ضخیم شدن فضاهای آلوئولی و نفوذ سلول‌های التهابی مشاهده شد. همچنین در رنگ آمیزی ماسون تریکروم الیاف کلاژن آبی در بافت بینابینی افزایش یافت. تغییرات هیستوپاتولوژیک ذکر شده در گروه‌های تحت درمان با ژل رویال بهبود یافت و ضایعات به طور قابل توجهی توسط ژل رویال با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش یافت. در پژوهشی که به تضعیف ماندگاری آرسنیک توسط رزوراترول در ریه موش‌های در معرض تری اکسید آرسنیک پرداخته شد هیستوپاتولوژی بافت ریه نیز مورد بررسی قرار گرفت. میزان آسیب ناشی از آرسنیک تری اکساید، شامل نفوذ سلول‌های التهابی، احتقان عروقی و تخریب ساختارهای آلوئولی بود که موش‌های تحت درمان با رزوراترول سلول‌های التهابی کم‌تری در بافت‌های ریوی و گلبول‌های قرمز نسبت به موش‌هایی که آرسنیک تری اکساید به تنهایی دریافت کرده بودند، داشتند (Zhang et al, 2013). مطابق با یافته‌های مطالعات پیشین، در پژوهش حاضر نیز در گروه کنترل منفی که فقط آرسنیک تری اکساید دریافت کرده بود، پرخونی، پنومونی بینابینی و نفوذ سلول‌های التهابی رخ داد. استفاده از ژل رویال به عنوان درمان سبب کاهش شدت آسیب‌های ناشی از مسمومیت با آرسنیک تری اکساید در گروه‌های تیمار شده گردید.

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که استفاده از آرسنیک تری اکساید باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب‌های بافت ریه در موش‌های صحرائی گردید. استفاده از ژل رویال در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg در کاهش استرس اکسیداتیو و آسیب‌های بافت ریه مؤثرتر از دوز ۱۵۰ mg/kg بود. همچنین ویتامین E نیز به عنوان یک آنتی اکسیدان سبب کاهش آسیب اکسیداتیو و آسیب‌های بافتی گردید. بنابراین می‌توان ژل رویال و ویتامین E را به عنوان درمان‌های مؤثر برای کاهش اثرات زیان‌بار مسمومیت با آرسنیک تری اکساید پیشنهاد نمود. در مطالعات آتی پیشنهاد می‌گردد مکانیسم‌های دقیق تر عملکرد ژل رویال به عنوان یک آنتی اکسیدان مورد بررسی قرار گیرد.

این مطالعه نشان داد مقادیر ROS در بافت ریه در گروه آسیب دیده توسط آرسنیک تری اکساید به طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه کنترل بود و رزوراترول به صورت مؤثری توانست مقادیر گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش داده و از استرس اکسیداتیو ایجاد شده بکاهد. همچنین سطح GSH در اثر مسمومیت با آرسنیک تری اکساید به صورت معنی‌داری کاهش یافت که درمان با رزوراترول این سطح را افزایش داد (Zhang et al, 2013). مطابق با مطالعات پیشین، در مطالعه حاضر نیز درمان با ژل رویال باعث کاهش معنی‌دار غلظت MDA در تمامی گروه‌های درمانی در قیاس با گروه کنترل منفی گردید. سطح GPx در همه گروه‌های تیمار به جز گروه تیمار اول در مقایسه با گروه کنترل منفی به صورت معنی‌دار از نظر آماری افزایش یافت. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز در همه گروه‌های تیمار به جز گروه درمان شده با ژل رویال با دوز ۱۵۰ در قیاس با گروه کنترل منفی به صورت معنی‌دار افزایش یافت. غلظت کاتالاز در تمام گروه‌ها تیمار به صورت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل منفی به صورت معنی‌دار افزایش یافت.

در یک مطالعه Mingxing و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی مسمومیت حاد تزریق تری اکسید آرسنیک با دوزهای مختلف داخل نایی در ریه‌های موش صحرائی پرداختند. نمونه‌ها در ساعات ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ پس از مواجهه جمع‌آوری شد و تغییرات دینامیکی نشان‌دهنده سمیت حاد ریوی مورد بررسی قرار گرفت. در مقایسه با گروه کنترل، گروه‌های مواجهه تغییرات معنی‌داری از جمله افزایش محتوای آب ریه و غلظت پروتئین در مایع لاواژ شده برونکوآلوئولار، ادم بینابینی ریوی، ادم غشای سلولی، افزایش غلظت فاکتورهای التهابی، JNK و P38 به طور معنی‌داری فعال شدند و درجه فسفوریلاسیون افزایش یافت. Zargar و همکاران (۲۰۱۷) در پژوهشی به بررسی اثرات درمان طولانی مدت با ژل رویال در فیروز ریوی القا شده توسط بلئومایسین در موش‌ها پرداختند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که در گروه شم بافت ریه نرمال و بدون تغییرات پاتولوژیک بود. در گروه فیروز ریوی القا شده با

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز بابت پشتیبانی‌های مالی و نیز مساعدت و همراهی کارشناسان بخش پاتولوژی دانشکده دامپزشکی، آقای حسین بهداروند و خانم فاطمه بهداروند کمال تشکر و قدردانی را دارند.

کد اخلاق

تاییدیه‌های اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی از کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه شهید چمران اهواز اخذ گردید (کد اخلاق: EE/1400.2.24.13667/scu.ac.ir)

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله هیچ گونه تعارضی با یکدیگر ندارند.

منابع مالی

تمامی منابع مالی این تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین گردید.

منابع

- Abdollahzade, N., Majidinia, M., & Babri, S. (2021). Melatonin: A pleiotropic hormone as a novel potent therapeutic candidate in arsenic toxicity. *Molecular biology reports*, 1-16 .
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Burchiel, S. W., Mitchell, L. A., Lauer, F. T., Sun, X., McDonald, J. D., Hudson, L. G., & Liu, K. J. (2009). Immunotoxicity and biodistribution analysis of arsenic trioxide in C57Bl/6 mice following a 2-week inhalation exposure. *Toxicology and applied pharmacology*, 241(3), 253-259 .
- Cemek, M., Aymelek, F., Büyükkuroğlu, M. E., Karaca, T., Büyükbek, A., & Yilmaz, F. (2010). Protective potential of Royal Jelly against carbon tetrachloride induced-toxicity and changes in the serum sialic acid levels. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2827-2832 .
- Flora, S., Bhadauria, S., Kannan, G., & Singh, N. (2007). Arsenic induced oxidative stress and the role of antioxidant supplementation during chelation: a review. *Journal of Environmental Biology*, 28(2), 333.
- Greani, S., Lourkisti, R., Berti, L., Marchand, B., Giannettini, J., Santini, J., & Quilichini, Y. (2017). Effect of chronic arsenic exposure under environmental conditions on bioaccumulation, oxidative stress, and antioxidant enzymatic defenses in wild trout *Salmo trutta* (Pisces, Teleostei). *Ecotoxicology*, 26(7), 930-941 .
- Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., . . . Valko, M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of Applied Toxicology*, 31(2), 95-107 .
- Karaca, T., Bayiroglu, F., Yoruk, M., Kaya, M., Uslu, S., Comba, B., & Mis, L. (2010). Effect of royal jelly on experimental colitis induced by acetic acid and alteration of mast cell distribution in the colon of rats. *European journal of histochemistry: EJH*, 54(4).
- Karadeniz, A., Simsek, N., Karakus, E., Yildirim, S., Kara, A., Can, I., . . . Turkeli, M. (2011). Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011 .
- Kozul, C. D., Hampton, T. H., Davey, J. C., Gosse, J. A., Nomikos, A. P., Eisenhauer, P. L., . . . Hamilton, J. W. (2009). Chronic exposure to arsenic in the drinking water alters the expression of immune response genes in mouse lung. *Environmental health perspectives*, 117(7), 1108-1115 .

- Lin, C.-J., Wu, M.-H., Hsueh, Y.-M., Sun, S. S.-M., & Cheng, A.-L. (2005). Tissue distribution of arsenic species in rabbits after single and multiple parenteral administration of arsenic trioxide: tissue accumulation and the reversibility after washout are tissue-selective. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 55(2), 170-178 .
- Mingxing, S., Haiying, W., Congsong, S., Chunyu, Y., Liu, C., & Wang, Q. (2019). Acute toxicity of intratracheal arsenic trioxide instillation in rat lungs. *Journal of Applied Toxicology*, 39(11), 1578-1585 .
- Mohanta, R. K., Garg, A. K., Dass, R. S., & Behera, S. K. (2014). Blood biochemistry, thyroid hormones, and oxidant/antioxidant status of guinea pigs challenged with sodium arsenite or arsenic trioxide. *Biological trace element research*, 160(2), 238-244 .
- Mukhopadhyay, P. K., Dey, A., Mukherjee, S., & Pradhan, N. K. (2013). The effect of coadministration of α -tocopherol and ascorbic acid on arsenic trioxide-induced testicular toxicity in adult rats. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 24(4), 245-253 .
- Nakajima, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Mishima, S., & Hara, H. (2009). Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC complementary and alternative medicine*, 9(1), 1-9 .
- Noman, A. S. M., Dilruba, S., Mohanto, N. C., Rahman, L., Khatun, Z., Riad, W., . . . Chowdhury, S. (2015). Arsenic-induced histological alterations in various organs of mice. *Journal of cytology & histology*, 6(3).
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358 .
- Pourmoradian, S., Mahdavi, R., Mobasseri, M., Faramarzi, E., & Mobasseri, M. (2014). Effects of royal jelly supplementation on glycemic control and oxidative stress factors in type 2 diabetic female: a randomized clinical trial. *Chinese journal of integrative medicine*, 20(5), 347-352 .
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB journal*, 22(3), 659-661 .
- Silici, S., Ekmekcioglu, O., Kanbur, M., & Deniz, K. (2011). The protective effect of royal jelly against cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *World journal of urology*, 29(1), 127-132 .
- States, J. C., Barchowsky, A., Cartwright, I. L., Reichard, J. F., Futscher, B. W., & Lantz, R. C. (2011). Arsenic toxicology: translating between experimental models and human pathology. *Environmental health perspectives*, 119(10), 1356-1363 .
- Wang, H., Xi, S., Xu, Y., Wang, F., Zheng, Y., Li, B., . . . Sun, G. (2013). Sodium arsenite induces cyclooxygenase-2 expression in human uroepithelial cells through MAPK pathway activation and reactive oxygen species induction. *Toxicology in Vitro*, 27(3), 1043-1048 .
- Xu, M., Niu, Q., Hu, Y., Feng, G., Wang, H., & Li, S. (2019). Proanthocyanidins antagonize arsenic-induced oxidative damage and promote arsenic methylation through activation of the Nrf2 signaling pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019 .
- Yun, S.-M., Woo, S. H., Oh, S. T., Hong, S.-E., Choe, T.-B., Ye, S.-K., . . . Noh, W. C. (2016). Melatonin enhances arsenic trioxide-induced cell death via sustained upregulation of Redd1 expression in breast cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 422, 64-73 .
- Zaazaa, A. M. (2014). Protective role of the nigella sativa oil against arsenic-induced neurotoxicity in male rats. *World J Pharm Res*, 3(2), 1624-1636 .
- Zargar, H. R., Hemmati, A. A., Ghafourian, M., Arzi, A., Rezaie, A., & Javad-Moosavi, S. A. (2017). Long-term treatment with royal jelly improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 95(1), 23-31 .
- Zhang, W., Yao, C., Ge, M., Xue, J., Ma, D., Liu, Y., . . . Zhang, Z. (2013). Attenuation of arsenic retention by resveratrol in lung of arsenic trioxide-exposed rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(1), 35-39 .
- Zhang, X.-W., Yan, X.-J., Zhou, Z.-R., Yang, F.-F., Wu, Z.-Y., Sun, H.-B., . . . Jeanne, M. (2010). Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RAR α oncoprotein by directly binding PML. *Science*, 328(5975), 240-243 .
- Zhao, Y., Toselli, P., & Li, W. (2012). Microtubules as a critical target for arsenic toxicity in lung cells in vitro and in vivo. *International journal of environmental research and public health*, 9(2), 474-495 .

Received: 14.01.2022

Accepted: 18.04.2022

Evaluation of the effect of royal jelly on histopathological and biochemical changes in the lungs of rats following arsenic trioxide toxicity

Hossien Mohammadi¹, Babak Mohammadian^{2*}, Hossen Najafzadeh Varzi³ and Ali Shahriari⁴

¹ PhD Graduated in Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Associated Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁴ Associated Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 14.01.2022

Accepted: 18.04.2022

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) and the oxidative damage are the main factors involved in tissue damage caused by arsenic trioxide. In the present study, we investigated the protective effects of royal jelly on the parameters of oxidative stress and histopathological damage to lung tissue due to arsenic trioxide toxicity. Forty male Wistar albino rats received arsenic trioxide and royal jelly orally for 30 days and were randomly divided into eight groups of five; The first group received normal saline at a dose of 1 mg /kg, the second group received royal jelly at a dose of 150 mg /kg, the third group received arsenic trioxide at a dose of 1 mg / kg, the fourth group received arsenic trioxide (1 mg /kg) with Royal jelly at a dose of 150 mg /kg, the fifth group received arsenic trioxide (1 mg /kg) with royal jelly at a dose of 100 mg /kg, the sixth group received arsenic trioxide (1 mg /kg) with royal jelly at a dose of 50 mg /kg, the seventh group received arsenic trioxide (1 mg /kg) with vitamin E at a dose of 100 mg /kg, and the eighth group received arsenic trioxide (1 mg /kg) with vitamin E and royal jelly (both) at a dose of mg/ kg 100. Oxidative stress parameters including malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were evaluated. Damage to lung tissue was also assessed by hematoxylin-eosin (H&E) tissue staining. The results of the present study revealed that arsenic trioxide increased the level of MDA and decreased the levels of GPx, SOD and CAT. Royal jelly treatment decreased MDA levels and increased GPx, SOD and CAT concentrations in lung tissue. The severity of lung tissue damage was also reduced. In general, Royal Jelly reduced oxidative stress and lung tissue damage.

Key word: Arsenic trioxide, Royal jelly, Lung, Oxidative stress

* **Corresponding Author:** Babak Mohammadian, Associated Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: mohammadb@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).