

Evaluation of the protective effects of chitosan and chitosan nanoemulsion against chlorpyrifos-induced hepatotoxicity in adult male rats"

Behrdin, P.¹, Karami Banari, A.R.², arlan Farhoosh, T.², Tafangdarzadeh, Sh.^{3*}

1- D.V.M. Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Shab.C, Islamic Azad University, Shabestar, Iran.

2- Associate Professor Faculty of Veterinary Medicine, Shab.C, Islamic Azad University, Shabestar, Iran.

3- Assistant Professor, Food Packaging and Science Research Center, Shab.C, Islamic Azad University, Shabestar, Iran.

*Corresponding author's email: shahin.tofangdar@iaut.ac.i

(Received: 2024/12/8 Accepted: 2025/3/2)

Abstract

Chlorpyrifos (CHP) is an organophosphate pesticide that, in addition to inhibiting cholinesterase activity, plays a role in inducing oxidative stress. Given the liver's critical role in detoxification, the present study was conducted to evaluate the protective effects of chitosan and chitosan nano-emulsion against CHP-induced hepatotoxicity in male rats. For this purpose, 48 adult male Wistar rats were randomly divided into four equal groups: healthy control, CHP-treated group (2 mg/kg, intraperitoneally, for 14 days), CHP + chitosan-treated group, and CHP + chitosan nano-emulsion-treated group (both chitosan treatments at a dose of 200 mg/kg orally for 14 days). After 14 days, the animals were euthanized, and liver tissues were collected for analysis. The activity of antioxidant enzymes including Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione Peroxidase (GPX), as well as the level of Malondialdehyde (MDA), a key marker of lipid peroxidation, were measured. Additionally, levels of inflammatory cytokines including Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β), and Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) were evaluated. The results showed that CHP significantly decreased SOD and GPX activities and increased MDA levels compared to the healthy control group ($p < 0.05$). Moreover, chitosan nano-emulsion had a greater effect than chitosan alone in enhancing GPX activity and reducing MDA levels. In the CHP group, levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α were also significantly elevated compared to controls ($p < 0.05$). These findings suggest that chitosan, particularly in its nanoemulsion form, with its antioxidant and anti-inflammatory properties, could effectively mitigate the hepatotoxic effects of CHP, including oxidative stress and inflammation, in rats.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Chlorpyrifos, Chitosan, Chitosan Nanoemulsion, Hepatotoxicity, Rat.

"مقاله پژوهشی"

DOI: 10.71499/jvcp.2025.1191786

بررسی اثرات محافظتی کیتوسان و امولسیون نانوکیتوسان بر سمیت کبدی ناشی از کلرپیریفوس در موش صحرایی نر بالغ

پارسا بهردین^۱، امیررضا کرمی‌بناری^۲، طرلان فرهوش^۲، شاهین تفنگدارزاده^{۳*}

۱- دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.

۲- استادیار گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.

۳- استادیار گروه علوم پایه و مرکز تحقیقات صنایع غذایی و بسته‌بندی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: shahin.tofangdar@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۹/۱۸ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۱۲/۱۲)

چکیده

سم کلرپیریفوس (Chlorpyrifos; CHP) جز آفت‌کش‌های ارگانوفسفره می‌باشد که علاوه بر مهار آنزیم کولین استراز در القای استرس اکسیداتیو نقش دارد. با توجه به اهمیت کبد در دفع سموم، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات محافظتی کیتوسان و نانوکیتوسان بر سمیت ناشی از CHP در کبد موش صحرایی انجام شد. بدین منظور تعداد ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به ۴ گروه یکسان شامل گروه‌های شاهد سالم، دریافت‌کننده CHP (با دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی به مدت ۱۴ روز)، دریافت‌کننده CHP همراه با کیتوسان و دریافت‌کننده CHP همراه با نانوکیتوسان (هر دو با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی همزمان به مدت ۱۴ روز) تقسیم شدند. پس از ۱۴ روز، کبد موش‌ها پس از آسان‌کشی جدا گردیده و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase; SOD) و گلوکاتایون پراکسیداز (Glutathione peroxidase; GPX) و مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde; MDA) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی و تغییر در میزان سیتوکاین‌های التهابی شامل اینترلوکین‌های ۶ (IL-6) و ۱ بتا (IL-1β) و فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF-α) مورد سنجش و بررسی قرار گرفت. CHP میزان فعالیت SOD و GPX را کاهش و مقدار MDA را در مقایسه با میزان آن‌ها در گروه شاهد سالم به طور معنی‌داری افزایش داد ($p < 0.05$). همچنین نانوکیتوسان در مقایسه با کیتوسان، تأثیر بیشتری در افزایش GPX و کاهش MDA داشت. در گروه CHP هم سیتوکاین‌های التهابی IL-6، IL-1β و TNF-α در مقایسه با گروه شاهد سالم به طور معنی‌داری افزایش یافتند ($p < 0.05$). احتمالاً کیتوسان و به‌ویژه نانوکیتوسان با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی خود، توانستند اثرات مضر CHP (ایجاد استرس اکسیداتیو و التهاب) را در کبد موش‌های صحرایی، کاهش دهند.

کلیدواژه‌ها: کلرپیریفوس، کیتوسان، نانوکیتوسان، سمیت کبدی، موش صحرایی.

مقدمه

کلرپیریفوس (CHP) با نام آیوپاک [O, O] دی اتیل-O-(۶,۵,۳-تری کلرو-۲-پیریدیل) فسفروتیوات (چهارمین آفت کش پرمصرف در جهان پس از مونوکروتوفوس، آسفیت و اندوسولفان می باشد که به عنوان پرکاربردترین حشره کش ارگانوفسفره نیز مطرح می باشد (Djekkoun et al., 2022). طبق طبقه بندی سازمان بهداشت جهانی (WHO) از آفت کش های ارگانوفسفره (Organophosphorus pesticides)، CHP یک آفت کش کلاس II با سمیت متوسط است؛ بنابراین نسبت به سایر OPPs ها نسبتاً ایمن تر است که این امر منجر به استفاده بی رویه از آن در تولیدات کشاورزی شده است (Bilaro et al., 2022). در حال حاضر، CHP به طور گسترده در کشاورزی، سایت های صنعتی، آفت کش های خانگی، باغبانی و همچنین به عنوان نماتد کش و کنه کش در مدیریت محصولات کشاورزی، چمن ها و گیاهان زینتی استفاده می شود. به تنهایی در چین در سال ۲۰۱۴ بیش از ۲۰۰۰ تن CHP استفاده شده و تا سال ۲۰۱۸، مصرف کل آن در کشور مذکور به ۲۸,۶۰۰ تن رسیده بود. همچنین در یک دهه گذشته، مصرف CHP در کشور برزیل به ۵۷۰ میلیون لیتر رسیده است (Cuci et al., 2021).

گزارش ها نشان می دهد که بدنبال استفاده از CHP، کمتر از ۰/۰۱ درصد آن روی هدف مورد نظر اثر گذاشته و مابقی در محیط باقی می ماند. لذا ترکیب مذکور از طریق رواناب بارانی وارد اکوسیستم شده و در آب های سطحی، خاک و جو، تجمع یافته و در نهایت توسط موجودات غیرهدف جذب می شود. شواهد نشان داده که CHP به طور گسترده در

محیط های آبی مناطق کشاورزی طی فصل رشد گیاهان شناسایی شده و حتی بقایای آن در محصولات کشاورزی مانند گوجه فرنگی، اسفناج ارگانیک، سیب و سویا یافت می شود (Fu et al., 2023; Cuci et al., 2021). علاوه بر این، خاصیت آب گریزی بالای CHP باعث افزایش پایداری آن در محیط شده و لذا نیمه عمر آن ممکن است بیش از دو سال باشد (Rahman et al., 2021). این پایداری موجب شده است که در ۵۴ درصد از نمونه های سطحی آب، CHP شناسایی شود (Fatunsin et al., 2020) و حتی در طول ذخیره سازی مواد غذایی نیز باقی بماند. به طوری که بقایای CHP در گندم پس از ۱۲۰ روز ذخیره سازی به ۲۸ درصد رسیده و در فرآورده هایی مانند آرد، نان چپاتی و نان معمولی به ترتیب در محدوده ۸۳-۶۵، ۵۱-۲۹ و ۷۵-۲۵ درصد بوده است (Mohammed and Boateng 2017). همچنین، فرآورده های آماده سازی مانند خمیر کردن، تخمیر و بخارپزی تنها ۴ درصد تا ۳۸ درصد از CHP موجود در نان های بخارپز چینی را کاهش داده اند که این امر نشان دهنده مقاومت بالای ترکیب مذکور در برابر فرآوری های رایج غذایی است (Chiu et al., 2021). گزارش شده که بقایای CHP از طریق مصرف مواد غذایی، آب آشامیدنی و تماس پوستی وارد بدن انسان ها و حیوانات شده و به ویژه در کبد تجمع می یابند. همچنین شواهد علمی نشان می دهند که CHP و متابولیت های آن در نمونه های بیولوژیکی مانند ادرار زنان باردار قابل شناسایی هستند (Bose et al., 2021). با توجه به خطرات ناشی از ترکیب فوق برای سلامت انسان و محیط زیست، آژانس حفاظت محیط زیست ایالات متحده در سال ۲۰۰۰ پیشنهاد ممنوعیت استفاده

اعلام شده که CHP متابولیسم انرژی کبدی را از طریق تغییر سطح mRNA ژن‌های مرتبط با متابولیسم گلوکز در کبد ماهی گورخری بالغ مختل می‌کند (Wang et al., 2019). لازم به ذکر است که گلوکز منبع اصلی انرژی برای کبد می‌باشد (Shirinabadi et al., 2020). طه و همکاران نیز، اختلال در متابولیسم انرژی میتوکندریایی را در کبد موش‌های صحرایی آلبینوی نر (*Rattus norvegicus*) از طریق کاهش قابل توجه فعالیت آنزیم آدنوزین تری فسفاتاز (ATPase) پس از مواجهه با CHP را تأیید کرده‌اند (Taha et al., 2021). کیتوسان، پلی ساکاریدی طبیعی است که از N-دی استیله شدن کیتین حاصل می‌شود و از مقادیر مختلفی گلوکزآمین که توسط پیوندهای گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند، تشکیل شده و در پوست خرچنگ و دیواره قارچ‌ها یافت می‌شود (Kou et al., 2021). کیتوسان به دلیل خواص منحصر به فردی چون زیست تخریب‌پذیری (Hadi et al., 2022)، غیرسمی بودن، (Tang et al., 2020) آثار ضدباکتریایی (Li et al., 2020)، زیست سازگاری (Zhang et al., 2022)، چسبندگی به مخاط (Barros et al., 2021)، القاء استخوان‌سازی و داشتن پتانسیل لازم برای تحریک رشد و تمایز سلول‌های پیش‌ساز استخوانی (Osteoprogenitors) (Kudiyarasu et al., 2024) و آسان‌سازی تشکیل استخوان و نیز قیمت پائین (Ressler, 2022a)، به عنوان یک زیست‌ماده برای کاربردهایی مانند مهندسی بافت استخوان و داروسازی مورد استفاده قرار گرفته‌است (Ressler, 2022b). کیتوسان علاوه بر خواص مطرح‌شده، به دلیل خواص ضد التهابی و آنتی اکسیدانی برجسته‌ای که دارد، توجه

از آن را مطرح کرد که در نهایت منجر به اعمال محدودیت‌های گسترده و ممنوعیت کاربرد آن در بسیاری از کشورها شد (Bilaro et al., 2022a; Mohamed et al., 2018).

عوارض ناشی از CHP طیف وسیعی از سیستم‌های زیستی را تحت تأثیر قرار می‌دهد که از جمله می‌توان به اختلال در هورمون‌های جنسی FSH و LH، مهار آنزیم استیل کولین استراز در دستگاه عصبی، تغییر در عملکرد دستگاه گوارش و فرایندهای هاضمه و دفع، تأثیرات منفی بر عملکرد ریه‌ها، تغییر در زمان‌بندی آپوپتوز سلولی و نیز بروز مشکلات پوستی و چشمی اشاره کرد (Montanari et al., 2024). البته در این میان، کبد به عنوان اندامی کلیدی، در متابولیسم و سم‌زدایی CHP، نقش اساسی ایفا می‌کند، زیرا مسئول پردازش بیگانه‌زیست‌ها (xenobiotic) و تنظیم متابولیسم آن‌هاست (Cui et al., 2022). مطالعات نشان داده‌اند که مواجهه با CHP می‌تواند موجب اختلال در متابولیسم انرژی در کبد شده و فرایندهای حیاتی این اندام را تحت تأثیر قرار دهد (Khodadad et al., 2018). در این ارتباط، شارما نشان داده که سمیت CHP بر متابولیسم انرژی، با کاهش وابسته به زمان در فعالیت آنزیم آدنوزین تری فسفاتاز (ATPase) در کبد ماهی‌های غربی پشه‌خوار (*Gambusia affinis*) پس از مواجهه با CHP تأثیر می‌گذارد (Sharma, 2014). اولسویک و همکاران هم گزارش کرده‌اند که مواجهه با CHP متابولیسم انرژی را در سلول‌های کبدی ماهی سالمون اطلس (*Salmo salar L.*) کاهش داده که این امر با بررسی اختلال در متابولیسم گلوکز اثبات شده‌است (Olsvik et al., 2019). به‌طور مشابه،

زیادی در مطالعات علمی به خود جلب کرده است. این ترکیب با داشتن گروه‌های هیدروکسیل و آمین واکنش‌پذیر، قادر است از تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن جلوگیری کرده و به این ترتیب از آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو در سیستم‌های بیولوژیکی پیشگیری می‌کند. علاوه بر این، کیتوسان توانایی مهار پراکسیداسیون لیپیدی را دارد که یکی از فرآیندهای آسیب‌زای سلولی ناشی از رادیکال‌های آزاد به شمار می‌رود. ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی کیتوسان باعث می‌شود که آن را به عنوان یک ماده غیرسمی و امیدوارکننده در درمان اختلالات مرتبط با استرس اکسیداتیو و التهابات مزمن در نظر بگیرند. نانوکیتوسان هم نسخه‌ای پیشرفته از کیتوسان با ساختار نانومقیاس می‌باشد که به دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد خود، در سال‌های اخیر در حوزه‌های مختلف کاربرد داشته‌است (Mohamadi *et al.*, 2022). نانوکیتوسان، به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی قوی‌تری که نسبت به کیتوسان معمولی دارد، در درمان بسیاری از بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو و التهابات مؤثر بوده‌است. ترکیب فوق با داشتن اندازه نانو، سطح تماس بیشتری با سلول‌ها ایجاد می‌کند و می‌تواند به راحتی از موانع بیولوژیکی عبور کند. نانوکیتوسان با کاهش رادیکال‌های آزاد و مهار فرآیندهای پراکسیداسیون لیپیدی، از آسیب‌های اکسیداتیو جلوگیری می‌کند و همچنین با کاهش تولید سایتوکاین‌های التهابی و مهار آنزیم‌های التهابی مانند ۲-سیکلوآکسیژناز (Cyclooxygenase-2; COX-2) و لیپوآکسیژناز، التهاب را کاهش می‌دهد و خواص مذکور نانوکیتوسان را به یک ماده ایده‌آل در درمان اختلالات

التهابی مزمن، آرتریت، بیماری‌های قلبی-عروقی و سایر شرایط ناشی از استرس اکسیداتیو تبدیل کرده- است (Hassan *et al.*, 2021).

استرس اکسیداتیو یکی از مکانیسم‌های اصلی در آسیب سلولی ناشی از عوامل شیمیایی و سموم بوده و نقش مهمی در پاتوژنز بیماری‌های مختلف ایفا می‌کند. در این زمینه، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) به عنوان خطوط دفاعی اولیه در برابر رادیکال‌های آزاد شناخته می‌شوند. آنزیم SOD با تبدیل سوپراکسید پراکسید هیدروژن و GPx با حذف پراکسید هیدروژن، نقش کلیدی در کنترل آسیب اکسیداتیو دارند (Sadiq, 2013). از سوی دیگر، MDA به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها، یک شاخص معتبر برای سنجش شدت استرس اکسیداتیو و آسیب غشایی سلول‌ها محسوب می‌شود. علاوه بر این، در پاسخ به استرس و آسیب‌های سلولی، مسیرهای التهابی نیز فعال می‌شوند که در این میان، سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند IL-6، IL-1 β و TNF- α از مهم‌ترین واسطه‌های التهابی هستند که افزایش بیان آن‌ها با تشدید پاسخ التهابی، نکرور سلولی و تخریب بافتی همراه است (Dinarelo, 2018). با توجه به نقش بیولوژیکی حیاتی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر SOD و GPx در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو، و نیز شاخص MDA به عنوان نشانگر پراکسیداسیون لیپیدها، همچنین اهمیت سایتوکاین‌های التهابی نظیر IL-6، IL-1 β و TNF- α در پیشبرد

پاسخ‌های التهابی، انتخاب این فاکتورها در مطالعه حاضر بر پایه شواهد علمی و به‌منظور سنجش دقیق تأثیر سمیت ناشی از CHP و نیز کارایی ترکیبات محافظتی انجام شده است (Slaats *et al.*, 2016). بنابراین این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد التهابی و آنتی اکسیدانی کیتوسان و امولسیون نانوکیتوسان در کاهش اثرات ناشی از CHP صورت گرفت. بر اساس تحقیقات قبلی مواجه طولانی مدت با سم CHP باعث التهاب در بافت‌ها، آپوپتوز و اختلال در کانال‌های سدیم و پتاسیم می‌گردد (Abdel-Naim *et al.*, 2023). با توجه به این که کبد یکی از اندامهای مهم زیستی در تبدیل مواد زیستی است، CHP از طریق سیستم گردش خون و نهایتاً تغییر بیومارکرهای کبد می‌تواند منجر به سمیت کبدی گردد (Pourbabaki *et al.*, 2021). سمومی مانند CHP که به افزایش ROS کمک می‌کنند، نه تنها باعث آسیب سلولی و التهابات حاد می‌شوند بلکه می‌توانند زمینه‌ساز بیماری‌های مزمن شوند. کنترل و کاهش سطح ROS در این شرایط می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی مؤثر برای کاهش التهاب و پیشگیری از بیماری‌های مزمن مطرح شود (Al Meanazel *et al.*, 2024). بنابراین، شناسایی عوامل محافظتی که بتوانند سطح ROS را کاهش داده و از شدت التهاب بکاهند، اهمیت زیادی دارد. در این راستا، کیتوسان به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی خود، مورد توجه قرار گرفته است. از طرف دیگر با توجه به بررسی‌های انجام‌شده توسط نویسندگان مقاله حاضر، مشخص شده که تاکنون

مطالعه‌ای جامع جهت تعیین تأثیر کیتوسان و نانوکیتوسان بر کاهش سمیت کلروپیریفوس (CHP) در کبد انجام نگرفته است. لذا، هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی اثرات محافظتی کیتوسان و امولسیون نانوکیتوسان بر سمیت کبدی ناشی از CHP بود که در این راستا، تلاش شده است با تحلیل شاخص‌های بیوشیمیایی مرتبط با استرس اکسیداتیو و التهاب، کارایی مواد مذکور در کاهش سمیت کبدی و نیز تقویت عملکرد کبد، بررسی شود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع مداخله‌ای آزمایشگاهی بوده و در سال ۱۴۰۲ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر در قالب یک پایان نامه دکتری حرفه‌ای در رشته دامپزشکی با کد اخلاق (IR.IAU.TABRIZ.REC.1402.129) انجام شده که همه پروتکل‌های مربوطه آن هم بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته است (Clark *et al.*, 1997).

- نمونه‌گیری و روش مطالعه: تحقیق حاضر بر روی تعداد ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم که از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه گردیده‌بود، انجام گرفت. همه موش‌ها در طول اجرای طرح، به خوراک کنسانتره مخصوص (شرکت به پرور، ایران) به صورت آزادانه دسترسی داشتند و تحت شرایط محیطی کنترل شده از جمله دمای 21 ± 2 درجه سلسیوس، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. لازم به ذکر است که عمل ضدعفونی کردن جعبه‌های

مخصوص نگهداری موش‌های صحرایی جهت اجرای مطالعه هم، با استفاده از مواد ضد عفونی کننده (فرمالدئید و الکل) انجام شد. در ادامه و پس از گذشت ۷ روز (به منظور سازگاری حیوانات به شرایط آزمایشگاهی)، مراحل اصلی مطالعه مورد نظر آغاز گردید. بدین منظور ابتدا موش‌های تحقیق، به طور تصادفی به ۴ گروه ۱۲ تایی به شرح ذیل تقسیم شدند: گروه ۱ (گروه شاهد سالم)، موش‌های مربوطه هیچ گونه مداخله‌ای دریافت نکردند. گروه ۲ (گروه CHP)، حیوانات مربوطه کلرپیریفوس (مرک-آلمان) را با دوز ۲ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت تزریق داخل صفاقی به مدت ۱۴ روز، بدون مداخله با کیتوسان یا امولسیون نانوکیتوسان دریافت کردند. گروه ۳ (گروه کیتوسان)، موش‌های مربوطه CHP را با دوز ۲ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت صفاقی و کیتوسان (گسترش آذین ترکان-ایران) را با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی همزمان به مدت ۱۴ روز دریافت کردند. گروه ۴ (گروه امولسیون نانوکیتوسان)، حیوانات مربوطه CHP را با دوز ۲ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت صفاقی و امولسیون نانوکیتوسان در آب (شرکت آرمینا-ایران، قطر ذرات ۲۰-۲۵ نانومتر) را با غلظت ۳ میلی گرم بر میلی لیتر و میانگین قطر ذرات ۲۵ الی ۵۰ نانومتر، با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی همزمان به مدت ۱۴ روز دریافت کردند (Jeon et al., 2003).

- نمونه برداری و انجام آزمایشات مورد نظر: بدین منظور، پس از گذشت ۱۴ روز از شروع دوره تحقیق، ابتدا القاء بیهوشی عمیق برای همه موش‌های تحقیق با تزریق داخل صفاقی کتامین (آلفا سان، هلند، ۱۰

درصد) (۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (آلفاسان، هلند، ۲ درصد) (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) انجام شد (Neufeld et al., 2011) و بلافاصله کبد همه موش‌های تحقیق، همزمان خارج گردیده و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی به داخل یک ظرف پلاستیکی استریل شده انتقال داده شدند. سپس در دمای ۷۰- درجه سلسیوس در دیپ فریز (ژال طب، ایران) تا زمان انجام آزمایش نگهداری گردید. در ادامه و در روز انجام آزمایش، همه کبد‌های مذکور، جداگانه و به دقت توزین شدند و سپس با نسبت ۱ به ۱۰ در داخل ظرف حاوی بافر فسفات سالین (مرک-آلمان) همورنه شده و به مدت ۱۵ دقیقه با شتاب ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ (یخچال دار مدل SCD، ابزار طب ماهان، ایران) گردیدند. در نهایت از مایع رویی حاصله از عمل سانتریفیوژ به منظور سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های SOD (کارمانیا پارس ژن، ایران) (Grings et al., 2016)، GPX (کارمانیا پارس ژن، ایران) (Biasibetti et al., 2017) و MDA (کارمانیا پارس ژن، ایران) (Sadeghi et al., 2021) بر حسب واحد بین المللی بر میلی گرم (U/mg) و تعیین مقدار سایتوکاین‌های التهابی IL-6 (کیت مخصوص موش، کارمانیا پارس ژن، ایران)، IL-1 β (کیت مخصوص موش، کارمانیا پارس ژن، ایران) و TNF- α (کیت مخصوص موش، کارمانیا پارس ژن، ایران) بر حسب نانوگرم بر میلی لیتر، به روش الایزا (داس-ایتالیا)، استفاده گردید (Festing and Wilkinson, 2007).

- تحلیل آماری داده‌ها

نتایج بدست آمده از تحقیق در نرم افزار اکسل ۲۰۱۳ وارد و مرتب شدند. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 26 استفاده گردید. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون نرمالیت کوموگروف-اسمیرنوف در سطح ۵ درصد انجام شد. سپس، داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) مورد آنالیز قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها $\pm$ خطای استاندارد هم با استفاده از آزمون تعقیبی چند دامنه‌ای دانکن و در سطح ۵ درصد صورت گرفت.

یافته‌ها

- نتایج سنجش فعالیت آنزیم‌های مربوط به استرس اکسیداتیو: به منظور بررسی تاثیر کیتوسان و امولسیون نانوکیتوسان بر سمیت ناشی از CHP بر بافت کبد میزان فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX و مقدار MDA در نمونه‌های هموزنات کبد جمع‌آوری شده از موش‌های صحرایی گروه‌های آزمایشی اندازه‌گیری شد که نتایج حاصله در جدول ۱ ارائه گردیده‌است. مطابق داده‌های ارائه شده، مشاهده می‌گردد که آنزیم SOD در گروه CHP نسبت به گروه‌های شاهد، کیتوسان و امولسیون نانوکیتوسان کمترین مقدار را داشته ولی ۳ گروه مذکور اختلاف آماری معنی‌داری از نظر تغییر در میزان فعالیت آنزیم SOD نسبت به یکدیگر نشان ندادند. اما تفاوت معنی‌داری مابین مقدار آنزیم SOD در گروه‌هایی که تحت درمان با کیتوسان و نانوکیتوسان قرار گرفته بودند نسبت به گروه CHP وجود داشت که نشانگر تاثیر خواص آنتی اکسیدانی این مواد در کاهش شرایط استرس اکسیداتیو بود. در مورد تاثیر نانوذرات کیتوسان هر چند میزان

فعالیت آنزیم SOD نسبت به کیتوسان افزایش نشان داده اما این اختلاف معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). همچنین بررسی نتایج نشان می‌دهد که استفاده از کیتوسان و امولسیون نانوکیتوسان، فعالیت آنزیم GPX را در بین گروه‌های آزمایشی را تحت تاثیر قرار داده به گونه‌ای که در گروه CHP کمترین مقدار و در گروه-های امولسیون نانوکیتوسان و شاهد بیشترین مقدار را داشته‌است ($p < 0.05$). همچنین، در کبد موش‌های گروهی که تحت تیمار با کیتوسان قرار گرفتند، تفاوت معنی‌داری در میزان آنزیم مذکور نسبت به مقدار آن در حیوانات گروه‌های شاهد سالم و دریافت‌کننده CHP مشاهده شد ($p < 0.05$). نتایج فوق نشان می‌دهد که کیتوسان می‌تواند به عنوان یک عامل تقویت‌کننده سیستم آنتی‌اکسیدانی عمل کرده و در نتیجه سطح فعالیت آنزیم GPX را افزایش دهد. موش‌های گروه‌هایی هم که نانوامولسیون کیتوسان را دریافت کردند، نسبت به گروه کیتوسان افزایش معنی‌داری در غلظت آنزیم فوق را نشان دادند ($p < 0.05$). این یافته‌ها هم نشان‌دهنده اثرات مثبت بیشتر نانو ذرات کیتوسان در بهبود عملکرد آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو در مقایسه با کیتوسان است و احتمالاً ناشی از کارایی امولسیون نانوکیتوسان در کاهش دهندگی اثر مضر CHP می‌باشد.

از طرف دیگر با بررسی نتایج ارائه شده در جدول ۱ مشخص می‌شود که کمترین و بیشترین مقدار آنزیم MDA، به ترتیب در بافت کبد موش‌های گروه-های شاهد و CHP بوده و افزایش معنی‌داری در میزان آنزیم MDA در گروه CHP نسبت به شاهد سالم مشاهده می‌شود ($p < 0.05$). در واقع تیمار با کیتوسان

باعث کاهش میزان آنزیم مذکور به طور معنی داری نسبت به گروهی که سم CHP دریافت کردند شده که این امر نشانگر تاثیر خواص آنتی اکسیدانی کیتوسان در مقدار آنزیم کبدی فوق بود. همچنین در درمان با

امولسیون نانوکیتوسان این تاثیر خاصیت آنتی اکسیدانی به مراتب بیشتر نمود پیدا کرده و کاهش معنی داری در میزان آنزیم MDA نسبت به گروه کیتوسان مشاهده می شد ($p < 0.05$).

جدول ۱- مقایسه میانگین مقدار آنزیم های SOD، GPX و MDA در نمونه های کبد موش های گروه های آزمایشی تحقیق (Mean±SE)

گروه	پارامتر	SOD (U/mg)	GPX (U/mg)	MDA (U/mg)
شاهد		49/58 ± 5/24 ^a	71/76 ± 5/5 ^a	0/75 ± 0/08 ^c
گروه CHP		40/33 ± 3/22 ^b	55/97 ± 4/01 ^c	1/18 ± 0/15 ^a
گروه کیتوسان		48/82 ± 3/00 ^a	63/58 ± 2/97 ^b	1/02 ± 0/08 ^a
گروه امولسیون نانوکیتوسان		52/45 ± 6/17 ^a	74/27 ± 4/05 ^a	0/83 ± 0/09 ^b
معداداری		0/001	0/000	0/000

a,b,c حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف آماری معنی دار می باشد ($p < 0.05$).

- نتایج مربوط به سنجش مقدار سایتوکاین های التهابی: در تحقیق حاضر مقدار سایتوکاین های التهابی IL-6، IL-1β و TNF-α موجود در نمونه های بافت کبدی هم مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج حاصله در جدول ۲ ارائه شده که بیانگر تاثیر معنی دار کیتوسان و امولسیون نانوکیتوسان بر مقدار سایتوکاین های IL-6، IL-1β و TNF-α می باشد ($p < 0.05$).

ملاحظه می گردد که مقدار سایتوکاین IL-6 در نمونه های کبد موش های گروه CHP نسبت به میزان آن در کبد حیوانات ۳ گروه دیگر، بیشترین مقدار را داشته است (۶۶/ ۹۷۷ نانوگرم بر میلی لیتر)، در حالی که در مورد موش های تیمار شده با گروه امولسیون نانوکیتوسان، بیشترین کاهش را نسبت به ۳ گروه

دیگر نشان داد (۳۶۲/۹۸ نانوگرم بر میلی لیتر) ($p < 0.05$). همچنین در ارزیابی مقایسه ای تاثیر کیتوسان و امولسیون نانوکیتوسان، میزان سایتوکاین IL-6 تفاوت آماری معنی داری نشان داد ($p < 0.05$)، که این امر احتمالا ناشی از تاثیر بیشتر امولسیون نانوکیتوسان در مقایسه با کیتوسان بوده است. این در حالی است که در نمونه های کبد حیوانات گروه کیتوسان، اختلاف آماری معنی داری نسبت به گروه شاهد از نظر میزان سایتوکاین فوق مشاهده نگردید ($p > 0.05$).

مقدار سایتوکاین IL-1β نیز تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت به طوری که مقدار آن در نمونه های کبد موش های گروه های CHP و کیتوسان نسبت به مقدار آن در مورد حیوانات گروه شاهد

افزایش معنی‌داری را از نظر آماری نشان داد ($p < 0/05$)، ولی در گروه امولسیون نانوکیتوسان اختلاف آماری معنی‌داری نسبت به گروه شاهد سالم مشاهده نشد. همچنین مشخص شد که استفاده از امولسیون نانوکیتوسان اثر کاهشی بیشتری را در مقدار سایتوکاین IL-1 β نسبت به تیمار با کیتوسان ایجاد کرده است ($p < 0/05$).

روند تغییرات در میزان سایتوکاین TNF- α هم به‌گونه‌ای بود که مقدار آن در نمونه‌های کبد حیوانات گروه CHP نسبت به سایر گروه‌ها بیشترین مقدار را داشت (۱/۱۷ نانوگرم بر میلی‌لیتر)، در حالی که در نمونه‌های مربوط به موش‌های گروه امولسیون

نانوکیتوسان، بیشترین کاهش را نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد (۰/۶۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر) ($p < 0/05$). همچنین در مقایسه میان تیمار موش‌ها با کیتوسان و امولسیون نانوکیتوسان، میزان سایتوکاین مذکور، تفاوت آماری معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/05$) که این امر احتمالاً به دلیل تأثیر بیشتر امولسیون نانوکیتوسان در مقایسه با کیتوسان بوده است. از طرف دیگر، در موش‌های گروه کیتوسان، هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی‌دار در مقدار سایتوکاین TNF- α نسبت به میزان آن در نمونه‌های کبد حیوانات گروه شاهد مشاهده نشد ($p > 0/05$).

جدول ۲- مقایسه میانگین مقدار سایتوکاین‌های التهابی IL-6، IL-1 β و TNF- α در نمونه‌های کبد موش‌های گروه‌های آزمایشی تحقیق (Mean $\pm$ SE)

گروه	پارامتر	IL-6 (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	IL-1 β (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	TNF- α (نانوگرم بر میلی‌لیتر)
شاهد		۵۲۷/۵۷ $\pm$ ۱۳۷/۲۹ ^b	۱۴۲/۴۸ $\pm$ ۱۴/۹۷ ^c	۰/۶۵ $\pm$ ۰/۰۳ ^c
کلرپیرفوس (CHP)		۹۷۷/۶۶ $\pm$ ۲۱۶/۳۷ ^a	۲۵۷/۶۰ $\pm$ ۲۰/۹۴ ^a	۱/۱۷ $\pm$ ۰/۱۵ ^a
کیتوسان		۶۷۱/۱۳ $\pm$ ۹۲/۴۲ ^b	۲۰۹/۶۷ $\pm$ ۳۰/۳۲ ^b	۰/۸۷ $\pm$ ۰/۱۶ ^b
امولسیون نانوکیتوسان		۳۶۲/۹۸ $\pm$ ۳۵/۲۲ ^c	۱۲۲/۷۳ $\pm$ ۲۵/۶۸ ^c	۰/۶۶ $\pm$ ۰/۰۸ ^c
معنی‌داری		۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰

a,b,c: حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با به کارگیری سم CHP بروی بافت کبد موش‌های صحرایی در تمام موارد اثرات منفی سم CHP در کاهش آنزیم SOD و افزایش آنزیم GPX و MDA مشهود بود. کاهش در میزان SOD نشان‌دهنده کاهش توانایی سلول‌ها در مقابله با استرس اکسیداتیو و افزایش آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم‌های GPX

و MDA نشان‌دهنده حضور بیشتر فرآیندهای اکسیداتیو و آسیب‌های غشایی و بافتی در نتیجه این سمیت هستند.

در مورد سیتوکاین‌های التهابی نیز به کارگیری سم CHP در تمام موارد میزان سیتوکاین‌های التهابی را افزایش می‌داد. این نشان‌دهنده فعال شدن مسیرهای التهابی و پاسخ ایمنی بدن به آسیب‌های ناشی از سم است. به‌طور کلی، این یافته‌ها تأکید دارند که سم

CHP می‌تواند با ایجاد اختلالات شدید در سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش التهاب، به طور جدی بر عملکرد و سلامت کبد تأثیر بگذارد. این نتایج بر اهمیت توجه به اثرات سمی و التهابی طولانی‌مدت مواجهه با سموم شیمیایی مانند CHP در بافت‌های مختلف، به‌ویژه کبد، تأکید می‌کنند و ضرورت مطالعات بیشتر برای ارزیابی راه‌های مقابله با چنین اثرات زیانبار را نمایان می‌سازند.

در مطالعه حاضر، تأثیر خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی کیتوسان در کاهش اثرات مخرب سم CHP در بافت کبد موش‌های صحرایی بررسی شد. طبق تحقیقات، کیتوسان به عنوان خاموش‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و این ویژگی آن‌ها ممکن است به دلیل ساختار شیمیایی خاص کیتوسان باشد. گروه‌های هیدروکسیل OH در واحد پلی‌ساکاریدی کیتوسان قادرند با رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل (OH) واکنش نشان دهند و این مکانیسم می‌تواند در کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از سموم مؤثر باشد. به عبارت دیگر، کیتوسان با مهار رادیکال‌های آزاد اکسیداتیو و کاهش اثرات مخرب آن‌ها در سلول‌ها، از بروز آسیب‌های سلولی و التهابی در بافت کبد جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، گروه‌های آمینی NH₂- در کیتوسان می‌توانند با جذب یون‌های هیدرونیوم H⁺ و واکنش با رادیکال‌های هیدروکسیل از طریق تشکیل گروه‌های آمونیومی (NH₃⁺) و ایجاد مولکول‌های ماکرومولکولی پایدار، اثرات رادیکال‌های آزاد را کاهش دهند. این ویژگی موجب می‌شود که کیتوسان قادر به کاهش فعالیت رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل و در نتیجه کاهش استرس اکسیداتیو در

سلول‌ها باشد. این واکنش‌ها که منجر به تشکیل ترکیبات پایدار می‌شوند، نه تنها از آسیب‌های اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند بلکه باعث افزایش فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها نیز می‌گردند (Wardani et al., 2022).

با توجه به اثرات مخرب سم CHP بر افزایش التهاب و ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت کبد، بررسی راهکارهای کاهش این آسیب‌ها اهمیت زیادی دارد. در این راستا، مطالعه حاضر تأثیر خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی کیتوسان در کاهش اثرات مخرب این سم را بررسی کرد و با توجه به نتایج حاصله مشخص گردید که استفاده از سم CHP مقدار تمام سایتوکاین‌ها را نسبت به گروه شاهد سالم افزایش داده است، به نظر می‌رسد این تغییر به علت افزایش تولید ROSها توسط سم فوق در بافت کبد باشد چرا که CHP از طریق القای استرس اکسیداتیو و کاهش توانایی سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها، تولید ROSها را افزایش می‌دهد و ROSها هم با فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی مانند فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده زنجیره سبک کاپا (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NF-κB) و اینفلامازوم کرایوپایرین (LRR and PYD domains-containing protein 3; NLRP3)، باعث افزایش تولید سایتوکاین‌هایی مانند TNF-α، IL-6 و IL-1β می‌شوند. TNF-α و IL-6 که از سایتوکاین‌های کلیدی در فرآیندهای التهابی هستند، با افزایش تولید ROS فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی، پاسخ‌های التهابی را تشدید کرده و التهاب را در سطح سیستمیک تقویت می‌کنند (Lee et al., 2012). همچنین سایتوکاین‌های

التهابی مذکور می‌تواند باعث بروز بیماری‌های التهابی مزمن مانند آرتریت روماتوئید و دیابت نوع ۲ شوند (Wang et al., 2020). از طرف دیگر سایتوکاین IL- 1β ، از طریق فعال‌سازی اینفلامازوم NLRP₃، تولید می‌شود و نقش مهمی در تشدید التهاب و آسیب بافتی دارد. افزایش سایتوکاین التهابی فوق نیز می‌تواند به ایجاد التهاب مزمن و بیماری‌های مرتبط با آن منجر شود که این روند، منجر به ایجاد یک چرخه معیوب می‌شود که در آن تولید بیشتر ROSها و سایتوکاین‌ها یکدیگر را تقویت کرده و التهاب مزمن را تشدید می‌کنند (Chen et al. 2018).

از طرف دیگر مطالعات نشان داده‌اند که کیتوسان با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپر اکسید دسموتاز (SOD) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)، استرس اکسیداتیو را کاهش داده و از آسیب‌های ناشی از ROS جلوگیری می‌کند. در واقع، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به طور مستقیم به کاهش سطح MDA که به عنوان یکی از نشانگرهای اصلی آسیب اکسیداتیو شناخته می‌شود، منجر شود. علاوه بر کاهش دادن سطح MDA، همچنین کیتوسان با کاهش تجمع رادیکال‌های آزاد ROS در سلول‌ها و تقویت مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی، اثرات منفی سم CHP را در بافت کبد کاهش داده و سلامت کبد را در برابر آسیب‌های ناشی از سم مذکور حفظ می‌کند (Zhang et al., 2022).

با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، مشخص شد که استفاده از کیتوسان و امولسیون نانوکیتوسان با کاهش تولید سایتوکاین‌های التهابی IL- 1β و TNF- α ، قادرند التهاب ناشی از سم CHP

را کاهش دهند، به طوری که تیمار با کیتوسان در تمام موارد به طور معنی‌داری مقدار هر سه سایتوکاین التهابی مذکور را نسبت به گروه CHP کاهش داد (جدول ۲) که این امر نشان‌دهنده تأثیر مثبت کیتوسان در کاهش پاسخ التهابی و محافظت از بافت‌های کبدی در برابر آسیب‌های ناشی از سموم می‌باشد. در واقع یافته‌های مذکور از پتانسیل بالای کیتوسان به عنوان یک ماده حفاظتی در برابر آسیب‌های ناشی از سموم شیمیایی و استرس اکسیداتیو پشتیبانی می‌کنند.

اندازه نانوذرات کیتوسان استفاده شده در تحقیق حاضر بین ۲۵ تا ۵۰ نانومتر بود (شناسه محصول CS923 بوده و دیتا شیت آن در سایت شرکت آرمینا موجود است) که این اندازه به آن‌ها اجازه می‌دهد تا به راحتی از طریق غشای سلولی عبور کرده و به بافت‌ها و اندام‌ها دسترسی بهتری پیدا کنند، لذا به نظر می‌رسد که یکی از دلایل اصلی تفاوت عملکرد کیتوسان و نانوذرات آن، اندازه کوچک نانوذرات کیتوسان می‌باشد چرا که اندازه نانوذرات کیتوسان باعث افزایش دسترسی زیستی (Bioavailability) این نانوذرات می‌شود و به آن‌ها اجازه می‌دهد تا بهتر با رادیکال‌های آزاد و مولکول‌های آسیب‌زننده در داخل سلول‌ها واکنش دهند. از طرف دیگر می‌توان به توزیع زیستی (Biodistribution) بالای نانوذرات کیتوسان اشاره کرد، چرا که نانوذرات به دلیل اندازه کوچکی که دارند، می‌توانند به راحتی در سیستم‌های زیستی توزیع شده و به نقاط مختلف بدن برسند و این امر منجر به اثربخشی بهتر آن‌ها در مقابله با استرس اکسیداتیو و التهاب می‌شود. علاوه بر این، نانوذرات کیتوسان می‌توانند سازگاری بیشتری نسبت به شرایط محیطی

داشته باشند و در برابر تغییرات pH یا شرایط اکسیداتیو، مقاومت بیشتری از خود نشان دهند (Wardani et al., 2022).

از طرف دیگر، نانوذرات کیتوسان، به دلیل ویژگی‌های خاص نانوساختاری خود، نه تنها در کاهش سمیت داروها و مواد شیمیایی مؤثرند، بلکه در پیشگیری از آسیب‌های کبدی و کلیوی نیز تأثیرگذار هستند. این ویژگی‌ها مخصوصاً به هنگام استفاده از ترکیبات و مواد شیمیایی با سمیت بالا، اهمیت بیشتری پیدا می‌کند (Mohamad et al., 2018). در تحقیق انجام شده توسط ماریانتی و همکاران (۲۰۲۴)، نانوذرات کیتوسان با کاهش سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و سیتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند $TNF-\alpha$ ، اثرات محافظتی در برابر مسمومیت مزمن با سرب داشتند. این نتایج مشابه با تأثیرات نانوذرات کیتوسان در کاهش آسیب‌های ناشی از سم CHP در تحقیق حاضر است، هرچند در مطالعه ماریانتی، سطح IL-6 در کلیه سرکوب نشد و حتی بالاترین سطح در گروه درمان مشاهده گردید (Marianti et al., 2024).

در تحقیق انجام شده توسط جعون و همکاران (۲۰۰۳)، اثر آنتی‌اکسیدانی کیتوسان در برابر آسیب مزمن کبدی ناشی از تتراکلریدکربن در موش‌های صحرایی بررسی شد و نتایج نشان داد که کیتوسان به طور قابل توجهی باعث کاهش مواد فعال اسید تیوباربیتوریک کبد (TBARS) و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز می‌شود (Jeon et al., 2003) که نتایج مذکور حاکی از اثرات آنتی‌اکسیدانی کیتوسان می‌باشد که با یافته‌های تحقیق حاضر همسو می‌باشد (جدول ۱).

همچنین، در مطالعه‌ای دیگر توسط السون‌باتی و همکاران (۲۰۱۹)، اثرات نانوذرات کیتوسان در مقابل سمیت کبدی ناشی از دی‌اتیل نیتروزامین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که نانوذرات کیتوسان با کاهش استرس اکسیداتیو، بهبود عملکرد کبد و افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی، اثرات منفی دی‌اتیل نیتروزامین را کاهش می‌دهد (Elsonbaty et al., 2019). یافته‌های فوق نیز همسو با نتایج پژوهش حاضر در خصوص تأثیر نانوذرات کیتوسان بر کاهش آسیب‌های کبدی ناشی از سموم شیمیایی هستند (جدول ۱). در تحقیق پور بابکی و همکاران در سال ۲۰۲۱ هم استفاده از ترکیبات سرشار از مواد آنتی‌اکسیدانی مانند کاکتوس، چای سبز، کورکومین، عسل و روغن رازیانه به عنوان عوامل حفاظتی در برابر آسیب‌های کبدی ناشی از سم CHP مورد بررسی قرار گرفته و نتایج نشان داده که پلی‌فنول‌ها به طور غیرمستقیم می‌توانند جذب گوارشی CHP را کاهش داده و از تجمع آن در کبد جلوگیری کنند که در نتیجه باعث جلوگیری از القای استرس اکسیداتیو می‌شوند (Pourbabaki et al., 2021) که نتایج تحقیق فوق نیز با یافته‌های تحقیق حاضر همسو است (جدول ۱ و ۲). در واقع نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کیتوسان با خواص آنتی‌اکسیدانی خود، فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی را افزایش داده و در نتیجه موجب کاهش مقدار سایتوکاین‌های التهابی IL-6، IL-1 β و $TNF-\alpha$ می‌شود (جدول ۲)، بنابراین، علاوه بر پیشگیری‌های لازم در برابر سم CHP و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی، به نظر می‌رسد که استفاده از ترکیباتی مانند کیتوسان می‌تواند به عنوان یک استراتژی مؤثر در

در مجموع، می‌توان گفت نانوکیتوسان، به دلیل ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی بهبود یافته و فراهمی

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافع ندارند.

منابع

- Abdel-Naim, A.B., Hassanein, E.H., Binmahfouz, L.S., Bagher, A.M., Hareeri, R.H., Algandaby, M.M., *et al.* (2023). Lycopene attenuates chlorpyrifos-induced hepatotoxicity in rats via activation of Nrf2/HO-1 axis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 262: 115122-115134.
- Al Meanazel, O.T., Alharasees, M.I., Al-Tarawneh, L.M., Al-Hababbeh, S., Abdelhadi, N.N., Sapaev, I.B., *et al.* (2024). Hesperidin, a flavone glycoside isolated from citrus fruits, can be used to facilitate Chlorpyrifos pollution side effect. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 1-14.
- Barros, A.S., Costa, A. and Sarmento, B. (2021). Building three-dimensional lung models for studying pharmacokinetics of inhaled drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 170: 386-395.
- Biasibetti, H., Pierozan, P., Rodrigues, A.F., Manfredini, V. and Wyse, A.T. (2017). Hypoxanthine intrastratial administration alters neuroinflammatory profile and redox status in striatum of infant and young adult rats. *Molecular Neurobiology*, 54: 2790-2800.
- Bilaro, J.S., Materu, S.F. and Temba, B.A. (2022). Dietary risk assessment of selected organophosphorus and pyrethroid pesticide residues in fresh harvested tomatoes at Makambako Town, Njombe region, Tanzania. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 15(3): 235-243.
- Chen, R., Cui, Y., Zhang, X., Zhang, Y., Chen, M., Zhou, T., *et al.* (2018). Chlorpyrifos induction of testicular-cell apoptosis through generation of reactive oxygen species and phosphorylation of AMPK. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 66(47): 12455-12470.
- Chiu, K.C., Sisca, F., Ying, J.H., Tsai, W.J., Hsieh, W.S., Chen, P.C., and Liu, C.Y. (2021). Prenatal chlorpyrifos exposure in association with PPAR γ H3K4me3 and DNA methylation levels and child development. *Environmental Pollution*, 274: 116-121.
- Clark, J.D., Gebhart, G.F., Gonder, J.C., Keeling, M.E. and Kohn, D.F. (1997). The 1996 guide for the care and use of laboratory animals. *ILAR Journal*, 38(1): 41-48.
- Cuci, Y. and Çelik, S. (2021). Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial genus *pseudomonas putida*. *International Journal of Chemistry and Technology*, 5(2): 91-99.
- Dinarello, C.A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological Reviews*, 281(1): 8-27.
- Djekkoun, N., Depeint, F., Guibourdenche, M., El Khayat El Sabbouri, H., Corona, A., Rhazi, L., *et al.* (2022). Chronic perigestational exposure to chlorpyrifos induces perturbations in gut bacteria and glucose and lipid markers in female rats and their offspring. *Toxics*, 10(3): 138.
- Elsonbaty, S., Moawad, F. and Abdelghaffar, M. (2019). Antioxidants and hepatoprotective effects of chitosan nanoparticles against hepatotoxicity induced in rats. *Benha Veterinary Medical Journal*, 36(1): 252-261.
- Festing, S. and Wilkinson, R. (2007). The ethics of animal research: talking point on the use of animals in scientific research. *EMBO Reports*, 8(6): 526-530.
- Grings, M., Moura, A.P., Parmeggiani, B., Motta, M.M., Boldrini, R.M., August, P.M., *et al.* (2016). Higher susceptibility of cerebral cortex and striatum to sulfite neurotoxicity in sulfite oxidase-deficient rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1862(11): 2063-2074.
- Hadi, A.G., Saddam, N.S., Ahmed, D.S. and Yousif, E. (2022). Extraction and characterization of Chitosan gained from oyster and fish shells and evaluation its application as antioxidant. *AIP Conference Proceedings*, 2386(1): 030016.
- Hassan, F.A., Abd El-Maged, M.H., El-Halim, H. and Ramadan, G. (2021). Effect of dietary chitosan, nano-chitosan supplementation and different japanese quail lines on growth performance, plasma constituents, carcass characteristics, antioxidant status and intestinal microflora population. *Journal. Animal. Health Production*, 9(2): 119-131.
- Jeon, T.I., Hwang, S.G., Park, N.G., Jung, Y.R., Im Shin, S., Choi, S.D., *et al.* (2003). Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Toxicology*, 187(1): 67-73.

- Kou, S.G., Peters, L.M. and Mucalo, M.R. (2021). Chitosan: A review of sources and preparation methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169: 85-94.
- Kudiyarasu, S., Perumal, M.K.K., Renuka, R.R. and Natrajan, P.M. (2024). Chitosan composite with mesenchymal stem cells: Properties, mechanism, and its application in bone regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 275: 133502.
- Lee, J.E., Park, J.H., Shin, I.C. and Koh, H.C. (2012). Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 263(2): 148-162.
- Li, J. and Zhuang, S. (2020). Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. *European Polymer Journal*, 138: 109984.
- Li, Z., Ramay, H.R., Hauch, K.D., Xiao, D. and Zhang, M. (2005). Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 26(18): 3919-3928.
- Marianti, A., Amalina, N.D., Chairani Dimarti, S., Anindita, R., Dyarizky Ramadhan, M.D. and Bintang Ramadani, M. (2024). Protective Effects of Chitosan Nanoparticles against Hepatic and Renal Damage in Rats with Chronic Lead Poisoning. *Iranian Journal of Toxicology*, 18(3): 130-137.
- Mohamed, A.O., Mater, A.A., Hammad, A.M., Ishag, A.E., El Tayeb, E.M., et al. (2018). Pesticide residues detected on tomato and cucumber fruits grown in greenhouse farms in Khartoum State, Sudan. *International Journal of Life Sciences Research*, 6(3): 472-481
- Mohammed, M. and Boateng, K. (2017). Evaluation of pesticide residues in tomato (*Lycopersicon esculentum*) and the potential health risk to consumers in urban areas of Ghana. *Pollution*, 3(1): 69-80.
- Neufeld, K.M., Kang, N., Bienenstock, J. and Foster, J.A. (2011). Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology & Motility*, 23(3): 119-255.
- Olsvik, P.A., Hammer, S.K., Sanden, M. and Sjøfteland, L. (2019). Chlorpyrifos-induced dysfunction of lipid metabolism is not restored by supplementation of polyunsaturated fatty acids EPA and ARA in Atlantic salmon liver cells. *Toxicology in Vitro*, 61: 104655.
- Pourbabaki, R., Samiei, S., Khadem, M., Kalantari, S., Beigzadeh, Z. and Shahtaheri, S.J. (2021). Antioxidant-rich products as protective agents and therapeutic factors against Chlorpyrifos hepatotoxicity-a review. *Iran Occupational Health*, 18(1): 125-149.
- Rahman, H.U., Asghar, W., Nazir, W., Sandhu, M.A., Ahmed, A. and Khalid, N. (2021). A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies. *Science of the Total Environment*, 755: 142649.
- Ressler, A. (2022a). Chitosan-based biomaterials for bone tissue engineering applications: a short review. *Polymers*, 14(16): 3430.
- Sadeghi, M.A., Hemmati, S., Mohammadi, S., Yousefi-Manesh, H., Vafaei, A., Zare, M., et al. (2021). Chronically altered NMDAR signaling in epilepsy mediates comorbid depression. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1): 53.
- Sadiq, I.Z. (2023). Free radicals and oxidative stress: Signaling mechanisms, redox basis for human diseases, and cell cycle regulation. *Current Molecular Medicine*, 23(1): 13-35.
- Sharma, N. (2014). Analysis of Lactate Dehydrogenase & ATPase activity in fish, *Gambusia affinis* at different period of exposure to chlorpyrifos. *International Journal of Pharmacy Research & Technology (IJPRT)*, 4(2): 39-41.
- Slaats, J., Ten Oever, J., van de Veerdonk, F.L. and Netea, M.G. (2016). IL-1 β /IL-6/CRP and IL-18/ferritin: distinct inflammatory programs in infections. *PLoS Pathogens*, 12(12): e1005973-e1005988.
- Taha, M.A.I., Badawy, M.E.I., Abdel-Razik, R.K., Younis, H.M., et al. (2021). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in liver of male albino rats after exposing to sub-chronic

-
- intoxication of chlorpyrifos, cypermethrin, and imidacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 178: 104938.
- Tang, S., Jiang, L., Ma, B., Tang, C., Wen, Y., Zhang, N., *et al.* (2020). Preparation and characterization of bamboo fiber/chitosan/nano-hydroxyapatite composite membrane by ionic crosslinking. *Cellulose*, 27: 5089–5100.
 - Wang, L., Wang, L., Shi, X. and Xu, S. (2020). Chlorpyrifos induces the apoptosis and necroptosis of L8824 cells through the ROS/PTEN/PI3K/AKT axis. *Journal of Hazardous Materials*, 398: 122905-122917.
 - Wang, X., Shen, M., Zhou, J. and Jin, Y. (2019). Chlorpyrifos disturbs hepatic metabolism associated with oxidative stress and gut microbiota dysbiosis in adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 216: 19-28.
 - Wardani, G.A., Putri, C.K., Gustaman, F., Hidayat, T. and Nofiyanti, E. (2022). Chitosan-activated charcoal of modified corn cobs as an antibiotics adsorbent. *Walisongo Journal of Chemistry*, 5(2): 167-176.
 - Zhang, X., Li, J., Chen, J., Peng, Z.X., Chen, J.N., Liu, X., *et al.* (2022). Enhanced bone regeneration via PHA scaffolds coated with polydopamine-captured BMP2. *Journal of Materials Chemistry B*, 10(32): 6214-6227.