



## Role of rosemary officinalis in the hepatotoxicity induced by Chlorpyrifos sub-chronic exposure in rats

**Reza Pourbabaki**, Department Occupational Health Engineering, School of Public Health, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

**Monireh Khadem**, Department Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Sajjad Samiei**, Department Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Fatemeh Amir Khanloo**, Department of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Seyed Jamaledin Shahtaheri**, (\*Corresponding author), Department Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [shahtaheri@sina.tums.ac.ir](mailto:shahtaheri@sina.tums.ac.ir)

### Abstract

**Background and aims:** Chlorpyrifos is a worldwide used organophosphorus pesticide. In addition to controlling the cholinesterase enzyme, this toxicant also plays a significant role in the oxidative stress and augmented oxidants. Whereas, extracted rosemary is an antioxidant, and plays a protective role against free radicals. Therefore, the object of this study was to investigate the reduction of liver damage caused by chlorpyrifos through the effect of the rosemary extract on the oxidative stress of this pesticide.

**Methods:** In this study, 30 male wistar rats, weighing 200-220 g were used. The animals (Rats) were randomly divided into five groups, each group containing six rats for further comparison; Group I: served as control, Group II: the chlorpyrifos exposure group (13.5 mg / kg single dose), Group III: the group exposed to the rosemary extract (100 mg / kg), Group IV: the exposure group with the toxicant (13.5 mg / kg dose) and rosemary (100 mg / kg concentration), Group V: simultaneous exposure of toxicant and rosemary (200 mg / kg oral dose). After 30 days, the Rats were weighed, killed and the liver tissue was histologically examined and the changes in MDA and GPx were reviewed.

**Results:** The results of statistical tests showed that, compared to the control group, the chlorpyrifos significantly damaged the liver tissue and altered the activity of the glutathione peroxidase and malondialdehyde. The simultaneous exposure to CPF and rosemary extract can significantly make modifications to the GPx and MDA levels and mitigate the CPF damage.

**Conclusion:** According to the results, the rosemary extract can reduce the oxidative stress caused by the chlorpyrifos and this plant can be used to treat poisoning caused by this toxic pesticide.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

### Keywords

Chlorpyrifos  
Oxidative stress  
Rosemary  
Liver toxicity  
Antioxidant

Received: 2020/05/14

Accepted: 2020/12/24



## Introduction

Chlorpyrifos is a commonly used organophosphorus pesticide, used for household pests and control flies. The chlorpyrifos is toxic to human, and the exposure has been linked to the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), leading to the perturbation of the cholinergic synapses and consequent signs of neurotoxicity. The chlorpyrifos induces the chronic toxicity and acute adverse effects including, immunological perturbations, teratogenicity and hepatic dysfunction. This toxicant has a significant role on oxidative stress and augmented oxidants. Many studies confirmed that exposure to Chlorpyrifos, in different animal models, alters tissue contents of the malondialdehyde and glutathione peroxidase. Rosemary is a perennial herb generally used for remedial purposes such as, diabetes, hypercholesterolemia and renal disorders. It also has neuroprotective effects and antithrombotic activities. It has been revealed that, the Rosemary plant contains numerous biologically active substances including, carnosic acid, carnosol or rosmanol; flavonoids such as genkwanin, homoplantagin or cirsimaritin. However, literature shows that there are no studies contributed to the protective effects of Rosemary leaves against the Chlorpyrifos hepatotoxicity. Therefore, the objective of the present study was conducted to surveiling the level of malondialdehyde and glutathione peroxidase activity in the liver tissue, to check the oxidative stress and lipid peroxidation resulting from Chlorpyrifos. This was examined by recording the histopathological alterations and measuring the level changes of malondialdehyde and glutathione peroxidase in the liver tissue.

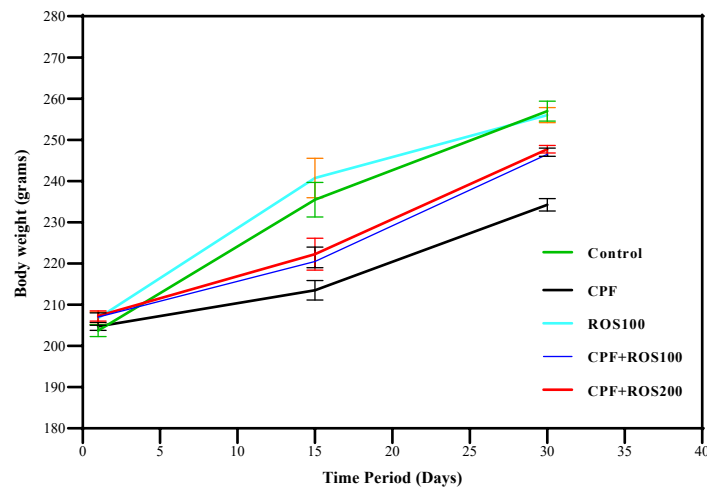
## Methods

In this study, the dried and powdered plant leaves were obtained from the local herbal shop at Tehran, Iran. 50 g of grinded rosemary leaves were suspended in 200 ml of 70% ethanol to obtain the extract. And Commercial grade chlorpyrifos (diethyl 3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate, formulation EC40.8%) purchased from an agriculturalist were used, after that 30 male Wistar Rats, weighing 200-220 g were selected. Rats were acclimatized in the laboratory conditions for seven days before the initiation of the study. The animals (rats) were randomly divided into five groups, each group containing six rats for further comparison; After the period of acclimation, the rats were randomly assigned into five experimental groups (I-V). In the control group, the distilled water was given by intraperitoneal (i.p). In the groups IV and V, the experimental rats were pre-treated with rosemary once a day for seven consecutive days (100 mg/kg; by oral gavage). After the seven days pre-treatment, rats were

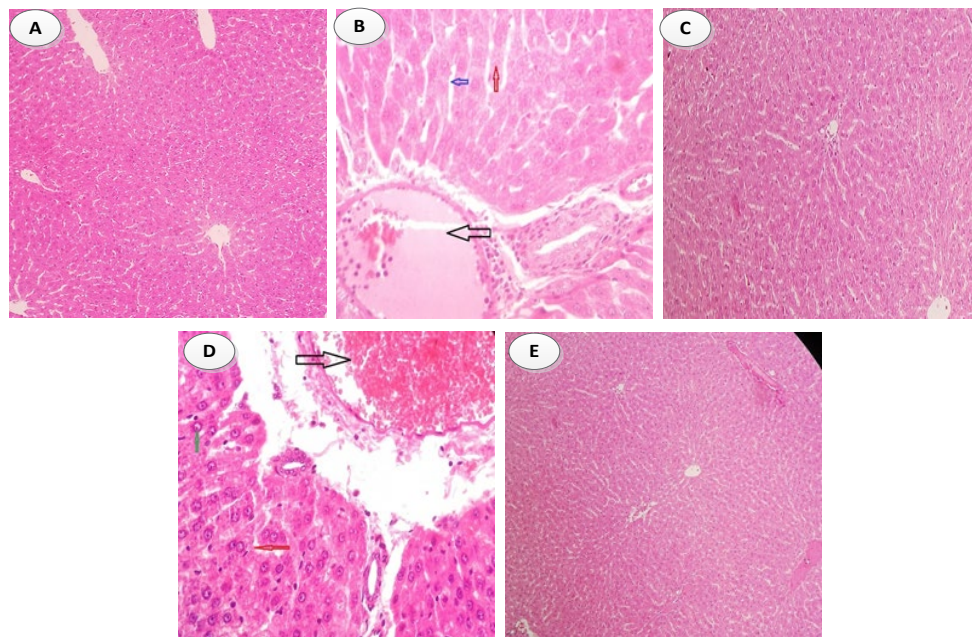
treated with rosemary in different concentrations, 100 and 200 mg/kg for the groups, IV and V, respectively, and before the administration of Chlorpyrifos only at a dose of 13.5 mg/kg (corresponding to 1/10 LD50 value: 135 mg/Kg). At the end of the experiment, 24 hours after the last exposure, all the rats were weighed and anesthetized; afterwards, the rats were killed. The serum was separated by centrifuging at 4000 rpm for 20 min to be used for the assessment of malondialdehyde and glutathione peroxidase levels. The rats' liver tissues were dissected out and rinsed in normal saline solution. One part of the liver was homogenized in 4 volumes of phosphate-buffered saline (PBS), centrifuged. The supernatants were stored at -70 0C until they were used for the biochemical studies. Also, a small slice of the liver tissue was fixed in 10% neutral formalin solution for histopathological examination purposes. Lipid peroxidation in the liver was estimated on the basis of their Malondialdehyde content according to the manufacturer protocol (ZellBio, Germany). This assay kit uses the Malondialdehyde with the thiobarbituric acid adduct formed by the reaction of Malondialdehyde and thiobarbituric acid (MDA-TBA) under high temperature. Malondialdehyde was measured in an acidic media and heat (90-1000C) colorimetrically at 535 nm. The values of Malondialdehyde were expressed as  $\mu\text{M}$ . The determination of glutathione peroxidase's activity in the liver homogenates, was measured using the ZellBio kits (ZellBio GmbH, Ulm, Germany). This assay kit was used to quantitative assay glutathione peroxidase activity on the basis of the colorimetric assay at 412 nm. For histological examination, the liver tissue was separated and washed with saline and then fixed in 10% formalin. The tissues were then dehydrated and paraffin-embedded in ethanol. The paraffin-embedded samples were spiked with a five  $\mu\text{M}$  sample with a microtome (model 4055 Iran) and stained with the hematoxylin-eosin stain. The stained sections were examined by light microscopy and were photographed afterwards. At the level of tissue sections, the pathological indices were scored on a single scale. Data were expressed using the mean and standard deviation. All the statistical analyses were performed using the SPSS 22 Version 22 software. Statistical significances were determined using the one-way ANOVA followed by the Tukey test for the comparison of the control and rosemary-treated group data. The value of  $P < 0.05$  was taken as a minimum level of significance.

## Results

The present study revealed that the body weights of the rosemary-treated and control groups increased progressively throughout the investigations and recorded a net body weight gain of 23.82 and 26.13%,



**Fig. 1.** The line chart shows the growth patterns of the control, chlorpyrifos-treated, rosemary-treated, co-exposure to CPF and ROS (100 mg/kg), and co-exposure to CPF and ROS (200 mg/kg) animals. The rosemary-treated group and control group have a much higher net body weight gain throughout, compared to the slower weight gain in the chlorpyrifos-treated animals.



**Fig. 2.** Representative histological images of liver slices (H&E). Normal histoarchitecture representative histological images of the liver slice **A:** Control rat showing a normal renal architecture. **B:** CPF-treated rats showing necrosis (red arrow), widening of the sinusoidal spaces (blue arrow) and edema of the central vein (black arrow) **C:** rats treated with ROS (100 mg/kg) revealed a normal renal architecture **D:** CPF (13.5 mg/kg) + ROS (100 mg/kg) showed a partial central vein hyperemia (black arrow), inflammation in cells (red arrow) and nucleus cell swelling (green arrow). **E:** CPF (13.5 mg/kg) + ROS (200 mg/kg) showed normal.

respectively. However, the net body weight gain of the rats intoxicated with separate administration of the chlorpyrifos was markedly less as compared to the control. Furthermore, co-exposure of the rats to chlorpyrifos and rosemary, increased the body weight gain of the treated rats in group IV and V compared to the control (Fig. 1). The results of the

statistical tests showed that, Chlorpyrifos significantly altered the activity of the glutathione peroxidase and Malondialdehyde compared to the control group. The simultaneous exposure to chlorpyrifos and rosemary extract can significantly make modifications to the glutathione peroxidase and malondialdehyde levels as well, and mitigate the Chlorpyrifos damage. After

30 days, the sections of the liver from all the groups were processed for histopathological assessment. Fig. 2 depicts a representative histopathology of hematoxylin-eosin-stained of the liver tissues from the experimental groups based on the histopathological results, the liver of the control and rosemary-treated groups, revealed a normal histoarchitecture. On the contrary, liver tissues of the chlorpyrifos-treated rats showed necrosis, widening of the sinusoidal spaces and the edema of the central vein was also observed. Whereas, co-exposure in the group which received the chlorpyrifos and rosemary with a concentration of 100 mg/kg, resulted in a marked improvement in the structure of the hepatocytes as compared to the treated with the pesticide only. In group V, co-administration of rosemary with a concentration of 200 mg/kg and chlorpyrifos, the results were similar to the control group.

### Conclusion

In toxicological investigations, body weight is an important criterion for the assessment of toxicity. Generally, a considerable decrease or increase in body weight, may be considered as a sign of toxicity. During the course of the current study, in comparison to their initial weights a significant increase in the body weights of control animals was observed at the end of the study. However, the weight gain of the rats intoxicated with chlorpyrifos was much lower compared to the control group. These results are in line with many other studies. This weight loss can be explained by a metabolic imbalance or reduced dietary intake of the rats. Rosemary treatment in the concentration of 100 and 200 mg/kg on the chlorpyrifos-treated rats also resulted in significant net body weight gain. However, this weight gain was somewhat lesser, when compared to the control group. Similar protective effects of the rosemary in improving the body weight gain of the animals, have been reported in other studies as well. According to the results, it was shown that rosemary has a positive effect on the antioxidant systems. In the current study, it was found that the administration of rosemary, dose-dependently reduced the harmful

effects of chlorpyrifos toxicity. These effects were observed in the improvement of the liver functions. The positive effects of the rosemary administration on lipid peroxidation is observed at 100 and 200 mg/kg, but at 200 mg/kg dosages, the rosemary seems to have a more prominent effect on reducing the oxidant effect and supporting the antioxidant system. Furthermore, rosemary could alleviate the induced oxidative stress by preserving the activity of glutathione peroxidase. The glutathione peroxidase enzyme levels increased predominantly in the groups in which 100 mg/kg and 200 mg/kg (co-exposure with Chlorpyrifos) of rosemary were administered, however at 200 mg/kg dosages, rosemary seems to have a more prominent effect. Compatible with our present result, it was previously demonstrated that rosemary is a strong scavenger of radicles and reactive oxygen species and therefore, the cellular content of the reduced glutathione peroxidase and antioxidant enzymes are elevated. The co-treatment of rosemary in 100 mg/kg dosage improved histological alterations induced by chlorpyrifos in the liver tissue. In the group of chlorpyrifos and rosemary with a concentration of 200 mg/kg, a normal liver architecture was observed. In conclusion, the data from this study provides further insight, that the chlorpyrifos significantly increased MDA levels, but decreased GPx enzyme activity in liver treated rats at the same time. Protective effects afforded by rosemary in animals treated with the chlorpyrifos. The data suggest that, the rosemary treatment in chlorpyrifos-treated animals afforded protection, according to its antioxidant properties and thus maintaining the structural as well as functional disturbances in the liver. Further studies are needed to determine the exact mechanism of the rosemary extract on the body of the animal and human specimens. One of the strengths of this study is, the use of commercial poison, which is currently being used in the market and agriculture. From this point of view, the results of the study can be generalized to the workplace, but it should be kept in mind that the extract was used purely in the study, and some other measures should be considered for the workplace use.

### How to cite this article:

Reza Pourbabaki, Monireh Khadem, Sajjad Samiei, Fatemeh Amir Khanloo, Seyed Jamaledin Shahtaheri. Role of rosemary officinalis in the hepatotoxicity induced by Chlorpyrifos sub-chronic exposure in rats. *Iran Occupational Health*. 2021 (01 March);18:6.



## سمیت کبدی و استرس اکسیداتیو ناشی از سم کلرپیریفوس در موش صحرائی: اثر حفاظتی عصاره رزماری در مواجهات تحت مزمن

**رضا پوربابکی:** دانشجوی دکتری تخصصی، گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.  
**منیره خادم:** استادیار، گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.  
**سجاد سمیعی:** کارشناس ارشد، گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.  
**فاطمه امیرخانلو:** دکتری تخصصی سم شناسی، گروه سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.  
**سیدجمال الدین شاه طاهری:** (\* نویسنده مسئول) استاد، گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.  
shahtaheri@sina.tums.ac.ir

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

کلرپیریفوس  
استرس اکسیداتیو  
رزماری  
سمیت کبدی  
آنتی اکسیدان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۴

**زمینه و هدف:** کلرپیریفوس یکی از پر مصرف ترین سموم ارگانوفسفره است که به طور عمومی در دنیا استفاده می شود. این سم علاوه بر مهار آنزیم کولین استراز، در القاء استرس اکسیداتیو و افزایش اکسیدان ها نیز نقش دارد. از طرفی عصاره گیاه رزماری یک ماده آنتی اکسیدانی است و نقش محافظت کننده ای در برابر رادیکال های آزاد ایفاء می کند. بنابراین هدف از انجام این مطالعه، بررسی پیشگیری از آسیب کبدی ناشی از مواجهه با سم تجاری کلرپیریفوس در نتیجه مصرف عصاره رزماری به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی این گیاه می باشد.

**روش بررسی:** در این مطالعه از ۳۰ راس موش صحرائی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۰۰-۲۲۰ گرم استفاده شد. در ابتدا حیوانات به طور تصادفی به پنج گروه (هر گروه ۶ سر) تقسیم شدند. پنج گروه شش تایی شامل، گروه کنترل تیمار با آب مقطر به صورت تزریق درون صفاقی، گروه مواجهه با کلرپیریفوس به صورت تزریق درون صفاقی (دوز ۱۳/۵ mg/kg)، گروه مواجهه با عصاره رزماری به صورت خوراکی و توسط گاواژ (غلظت ۱۰۰ mg/kg)، گروه مواجهه توأم با سم به صورت تزریق درون صفاقی (دوز ۱۳/۵ mg/kg) و رزماری به صورت خوراکی و توسط گاواژ (غلظت ۱۰۰ mg/kg)، گروه مواجهه همزمان سم به صورت تزریق درون صفاقی و رزماری به صورت خوراکی و توسط گاواژ (غلظت ۲۰۰ mg/kg خوراکی)، به عنوان گروه های مورد مطالعه انتخاب شدند. بعد از ۳۰ روز متوالی، موش ها وزن شده و کشته شدند و بافت کبد جهت بررسی های هیستوپاتولوژی و تغییرات سطح مالون دی آلدئید و فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز مورد بررسی قرار گرفت. جهت سنجش سطح مالون دی آلدئید، دستگاه الایزا ریدر مدل بیوتیک بر روی طول موج ۵۳۵ نانومتر و جهت سنجش سطح فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز، دستگاه بر روی طول موج ۴۱۲ نانومتر تنظیم شد. سپس داده های حاصل توسط نرم افزار آماری SPSS 22 و روش آزمون آنالیز واریانس یک طرفه One-way ANOVA و به دنبال آزمون آماری Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و تفاوت میانگین ها در سطح  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

**یافته ها:** طبق تست های آماری گروه مواجهه یافته با عصاره رزماری نتایج مشابه گروه کنترل یافت شد. اما در گروه مواجهه یافته با کلرپیریفوس این سم به طور معنی داری باعث تغییر در میزان فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز و مالون دی آلدئید نسبت به گروه کنترل و همچنین آسیب هایی از جمله آشفستگی در چیدمان سلول ها، افزایش فضای سینوزوئیدها، نکروز سلول های کبدی و ادم سیاهرگ مرکزی در بافت کبد گردید. در حالیکه مواجهه همزمان با کلرپیریفوس و عصاره رزماری به طور معنی داری باعث بهبود فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز و سطح مالون دی آلدئید و همچنین کاهش آسیب ناشی از کلرپیریفوس می گردد.

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج فوق به نظر می رسد که سم کلرپیریفوس به واسطه تولید رادیکال های آزاد، تنش اکسیداتیو و تضعیف دفاع آنتی اکسیدانی باعث آسیب سلولی و تغییرات ساختاری در بافت کبد موش های صحرائی می شود. در حالی که عصاره رزماری به دلیل دارا بودن ترکیبات آنتی اکسیدان باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی، کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و محافظت در برابر آسیب کبدی ناشی از ماده سمی کلرپیریفوس می گردد.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت کننده:** ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Reza Pourbabaki, Monireh Khadem, Sajjad Samiei, Fatemeh Amirkhanloo, Seyed Jamaledin Shahtaheri. Role of rosemary officinalis in the hepatotoxicity induced by Chlorpyrifos sub-chronic exposure in rats. *Iran Occupational Health*. 2021 (01 March);18:6.

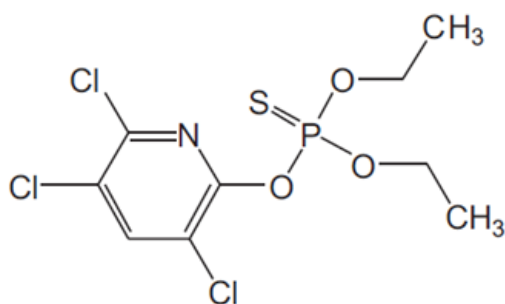
\*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-4.0 صورت گرفته است

## مقدمه

در میان ترکیبات شیمیایی خطرناک، مواد زیستی فعال از جمله آفت کش ها از اهمیت خاصی برخوردارند. سموم ارگانوفسفره از رایج ترین سموم دفع آفات هستند که برای اهداف کشاورزی و خانگی به کار برده می شوند (۱-۳). استفاده گسترده از این سموم همراه با افزایش قابل توجهی در بروز مسمومیت ها همراه بوده است. اختلالاتی از جمله سرطان، دیابت، نقایص مادرزادی، بیماری های عصبی از جمله پارکینسون و آلزایمر، و بیماری های قلبی در ارتباط با مواجهه مزمن با ترکیبات ارگانوفسفره گزارش شده است (۴). پیشرفت های اخیر نشان دهنده کاهش فعالیت کولین استراز در خون (اریتروسیت ها، پلازما یا سرم) و سایر بافت هایی مانند مغز به عنوان شاخص مهم زیست شناختی ارگانوفسفره ها و مسمومیت با آن ها است (۵). کلرپیریفوس (CPF) (با نام آیوپاک: ۳، ۵، ۶- تری کلرو- ۲- پیریدال فسفروتیونات) (شکل ۱) یک حشره کش ارگانوفسفره جامد بلوری، بی رنگ و متمایل به سفید است که به طور گسترده ای در فعالیتهای مختلف کشاورزی، صنعتی و کاربردهای خانگی مصرف می شود. مواجهه حاد و مزمن با این ماده می تواند باعث اثرات عصبی، سیستمیک (۶)، ایمونولوژیکی (۷)، تولیدمثلی (۸)، رشد، و سرطان زایی (۹) شود. علاوه بر این، پایداری و مقاومت بالای CPF در محیط های داخلی باعث آلودگی اکوسیستم و مواجهه بیش از حد انسان می شود (۱۰).

استرس اکسیداتیو از جمله مکانیسم های اصلی برخی از آفت کش ها در ایجاد سمیت آن ها می باشد (۱۱). در سلول های سالم آنتی اکسیدان ها به وسیله خنثی کردن محصولات اکسیژن فعال ( $ROS^2$ ) از آسیب سلول ها جلوگیری می کنند. اگر این عملکرد توسط ترکیبات فسفره آلی مختل شود سلول ها مستعد اثرات اکسیژن فعال شده و در نهایت منجر به مرگ سلول می شوند (۱۲). مطالعات اخیر نشان داده اند که CPF می تواند باعث استرس اکسیداتیو شده و منجر به انباشت محصولات پراکسیداسیون لیپید ( $LPO^3$ ) و تولید اکسیژن واکنش پذیر شود (۱۳-۱۵). برخی از مطالعات نشان داده اند که تولید ROS، کاهش آنزیم گلوتاتیون ( $GSH^4$ ) و افزایش مالون دی آلدئید ( $MDA^5$ ) به عنوان شاخص های استرس اکسیداتیو جهت بررسی آسیب های وارده به بافت کبدی و کلیوی در اثر مواجهه با CPF مورد بررسی قرار می گیرند (۱۶، ۱۷).

- 1 Chlorpyrifos
- 2 reactive oxygen species
- 3 Lipid peroxidation
- 4 Glutathione
- 5 Malondialdehyde



شکل ۱. ساختار کلرپیریفوس

سموم ارگانوفسفره دارای ساختار مولکولی غیر قطبی هستند بنابراین پس از جذب به سرعت می توانند در کبد، غده های بزاقی و کلیه تجمع یابند (۱۸). سم کلرپیریفوس با توجه به دوز می تواند باعث تغییرات هیستوپاتولوژیک در کبد شود (۱۹-۲۱).

مطالعات آزمایشگاهی نشان داده اند که مکمل های آنتی اکسیدان می توانند باعث کاهش اثرات سمی شوند (۲۲-۲۴). درمان با آنتی اکسیدان ها می تواند یک استراتژی خوب به منظور کاهش استرس اکسیداتیو باشد. امروزه تمایل زیادی به مصرف محصولات گیاهی به عنوان منابع آنتی اکسیدان ها وجود دارد که این روند نیاز به ارزیابی خواص دارویی این محصولات گیاهی دارد (۲۵-۲۷).

رزماری متعلق به خانواده Lamiaceae و یک گیاه معطر است که از برگ های آن به طور گسترده در غذاهای دریایی مدیترانه ای به عنوان طعم دهنده و در طب سنتی جهت پیشگیری از بیماری های التهابی، آترواسکلروز، بیماری های قلبی و درمان دیابت و همچنین درمان بیماری های تنفسی مورد استفاده قرار می گیرد (۲۸، ۲۹). خواص آنتی اکسیدانی گیاه رزماری به دلیل ترکیبات هیدروفیلی و لیپوفیلی این گیاه است، مطالعات نشان داده اند که ایزوپروپونوئیدها، کینون ها، دیترین های فنلی (از قبیل اسید کارنوزیک و کارنوزول)، رزمارینیک اسید و دیگر اسیدهای فنلی و فلاوونوئیدها می توانند واکنش های رادیکال آزاد و گونه های اکسیژن فعال را خنثی نمایند (۳۰). در میان این اجزا اسید کارنوزیک (یک ترکیب دیترین فنولی) و کارنوزول قوی ترین اجزای آنتی اکسیدانی گیاه (حدود ۹۰ درصد فعالیت آنتی اکسیدانی) هستند (۳۱). بنابراین با توجه به کمبود مطالعات در خصوص آنتی اکسیدان های طبیعی جهت پیشگیری از ایجاد استرس اکسیداتیو ناشی از سم کلرپیریفوس و عدم توجه به مباحث بنیادی، در این پروژه

6 Rosmarinus officinalis

صورت تصادفی به ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. همچنین جهت سازگاری حیوانات، گروه‌های ۳، ۴ و ۵ یک هفته قبل از شروع آزمایش عصاره رزماری را از طریق گاواژ دریافت کردند.

۱. گروه کنترل، دریافت آب مقطر (با توجه به وزن موش‌ها) به صورت تزریق درون صفاقی به منظور گروه شاهد (Control)
۲. گروه دریافت کننده سم کلرپیریفوس (13.5 mg/kg, LD50 1/10) به صورت داخل صفاقی (CPF)
۳. گروه دریافت کننده رزماری با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی از طریق گاواژ (ROS)
۴. گروه دریافت کننده عصاره گیاه با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی توسط گاواژ و یک ساعت پس از دریافت عصاره، دریافت سم کلرپیریفوس (13.5 mg/kg, LD50 1/10) به صورت تزریق داخل صفاقی (CPF + ROS100)
۵. گروه دریافت کننده عصاره گیاه با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (به منظور بررسی تأثیر عصاره در غلظت‌های بالاتر) و پس از یک ساعت دریافت سم کلرپیریفوس (13.5 mg/kg, LD50 1/10) به صورت داخل صفاقی (CPF + ROS200)

#### جداسازی بافت

در این مطالعه جهت بررسی و سنجش سطح مالون دی آلدئید و فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز، پس از اتمام دوره مواجهه ۳۰ روزه (۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق سم) و وزن کردن موش‌ها، در ابتدا موش‌ها توسط کتامین و زایلازین بیهوش شده سپس تشریح و بافت کبد موش‌ها برای انجام آنالیز و بررسی تغییرات آنزیم GPx و سطح MDA، جمع‌آوری گردید. بافت کبد پس از جداسازی با محلول سدیم کلراید و آب مقطر شستشو داده شده و عاری از خون گردید. سپس بافت کبد به قسمت‌های کوچک‌تر بریده شد. و در ادامه ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت کبد با یک میلی‌لیتر pbs<sup>۱</sup> (بافر فسفات با PH برابر ۷/۴) مخلوط و عمل هموژن سازی بر روی آن صورت گرفت. محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با نرخ ۶۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوز و مایع رویی به دست آمده جهت بررسی و آنالیز جمع‌آوری گشت. جهت آنالیز نمونه‌های استاندارد و مجهول طبق دستورالعمل، کیت سنجش در میکرو پلایت‌های مربوط قرار گرفته و جهت سنجش مالون دی آلدئید، دستگاه الیزا ریدر مدل بیوتیک<sup>۲</sup> بر روی طول

تصمیم گرفتیم اثر حفاظتی عصاره گیاه رزماری را به منظور کاهش اثرات ناشی از مواجهه با این سم بررسی نماییم.

#### مواد و روش

##### آماده‌سازی عصاره گیاه رزماری

در ابتدا گیاه مد نظر از عطاری معتبر خریداری و جهت عصاره گیری از روش خیساندن استفاده شد، بدین صورت که گیاه پس از شستشو، خشک و آسیاب شد. سپس جهت به دست آوردن غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با توجه به منابع، مقدار ۵۰ میلی‌گرم پودر گیاه با ۲۵۰ سی‌سی متانول خالص مخلوط گردید. نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت با حلال در تماس بوده و در طی این مدت به منظور اختلاط بهتر از دستگاه شیکر مغناطیسی استفاده گردید. و پس از آن با عبور مخلوط از کاغذ واتمن عصاره به دست آمده بر روی سطح شیشه‌ای گسترده شد (۳۲، ۳۳).

##### مواد شیمیایی

سم تجاری کلرپیریفوس (ethyl 3,5,6-trichol-oro-2-pyridyl phosphorothionate, formulation EC40.8%) از شرکت کشاورزی آریا شیمی (کشور ایران) خریداری شد. کیت‌های سنجش مالون دی آلدئید و گلوکوتاتیون پراکسیداز از شرکت zell bio آلمان تهیه شدند، همچنین مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک (آلمان) و با درصد خلوص بالا تهیه گردید.

##### حیوانات

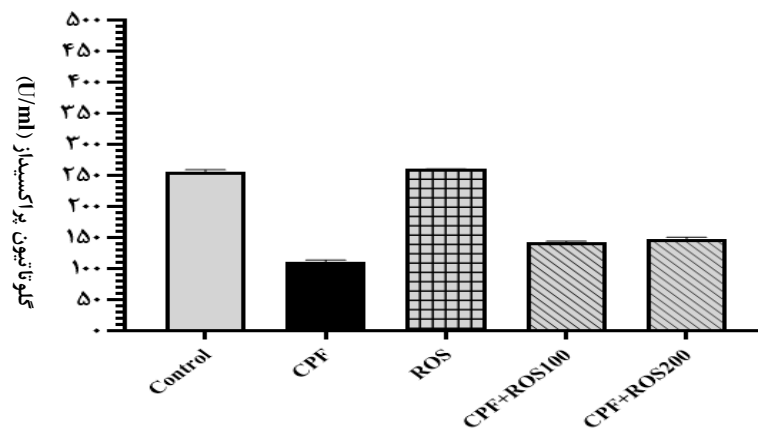
در این بررسی از ۳۰ سر موش آزمایشگاهی نر بالغ از نژاد ویستار (سن بیش از ۸ هفته) با محدوده وزنی ۲۰۰-۲۲۰ گرم استفاده گردید. تمامی حیوانات در شرایط دمایی کنترل شده  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعته در حیوان خانه دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران نگهداری شدند. در ضمن آب و غذا آزادانه در اختیار آن‌ها قرار گرفت. کلیه آزمایش‌های حیوانی براساس دستورالعمل کمیته اخلاق در پژوهش و با کد اخلاق IR.TUMS.SPH.REC.1397.061 صورت گرفت.

##### نحوه گروه‌بندی

جهت سازگاری موش‌ها با محیط، حیوانات به مدت یک هفته در حیوان خانه نگهداری شده و سپس به

1 Phosphate-buffered saline

2 Biotek



شکل ۲. تغییرات سطح گلوکوتاتیون پراکسیداز در گروه‌های مورد مطالعه

## نتایج

### گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx)

در این مطالعه یکی از شاخص‌های استرس اکسیداتیو مورد بررسی آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx<sup>1</sup>) بود (شکل ۲) مشاهده گردید که بین گروه دریافت کننده CPF و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری در میزان GPx وجود دارد ( $p < 0.05$ ). در گروهی که تنها با ماده آنتی‌اکسیدان برخورد داشتند مشاهده شد که عصاره گیاه رزماری می‌تواند باعث افزایش اندکی در سطح فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز نسبت به گروه کنترل گردد که نشان از فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری است. ( $p > 0.05$ ). همچنین در گروهی که مواجهه همزمان با عصاره رزماری و سم داشتند مشاهده شد که افزایش غلظت ماده آنتی‌اکسیدان باعث بهبود سطح گلوکوتاتیون پراکسیداز می‌شود اما این افزایش معنی‌دار نیست ( $P > 0.05$ ).

### پراکسیداسیون لیپیدی (MDA)

طبق یافته‌های به دست آمده مشاهده گردید سطح MDA در گروهی که سم دریافت کرده‌اند به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). در گروهی که تنها با ماده آنتی‌اکسیدان مواجهه داشتند نسبت به گروه کنترل کاهش اندکی مشاهده گردید. همچنین در گروهی که مواجهه همزمان با ماده آنتی‌اکسیدان و سم داشتند مشاهده گردید افزایش غلظت ماده آنتی‌اکسیدان باعث بهبود سطح MDA می‌گردد که این میزان کاهش نسبت به گروه

موج ۵۳۵ نانومتر و جهت سنجش سطح فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز، دستگاه بر روی طول موج ۴۱۲ نانومتر تنظیم شد. سپس داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار آماری SPSS 22 و روش آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه One-way ANOVA و به دنبال آزمون آماری Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و تفاوت میانگین‌ها در سطح  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### بررسی‌های هیستوپاتولوژی

جهت مطالعه بافت‌شناسی، بافت کبد جدا شده و با استفاده از سرم فیزیولوژیکی شستشو و سپس در فرمالین 10 درصد تثبیت شد. آنگاه بافت با درجات صعودی اتانول، آبگیری و توسط پارافین قالب‌گیری گردید. نمونه‌های قالب‌گیری شده با پارافین توسط میکروتوم (مدل ۴۰۵۵ ایران) با ضخامت ۵ میکرومتر برش‌گیری و با رنگ هماتوکسیلین-ئوزین رنگ‌آمیزی شدند. برش‌های رنگ‌آمیزی شده توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفته و از آن‌ها عکس‌برداری شد. در مقاطع بافتی شاخص‌های آسیب‌شناسی با مقیاس واحد مورد بررسی قرار گرفت.

### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این مطالعه، داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS 22 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه One-way ANOVA و Post Hoc توکی جهت مقایسه گروه‌ها استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد و نهایتاً نتایج حاصل به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شد.

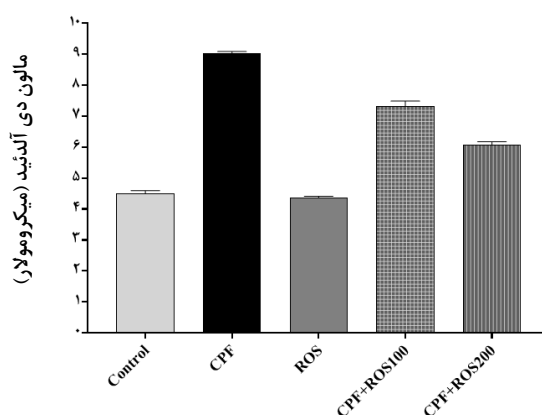
1 Glutathione peroxidase

کبدی و ادم سیاهرگ مرکزی را نشان دادند. بافت کبد موش‌های صحرائی تیمار شده با عصاره رزماری با غلظت ۱۰۰ mg/kg به همراه CPF، کاهش در حالت پرخونی سیاهرگ‌های مرکزی، تورم سلول‌های کبدی و هسته سلول‌ها را نشان داد، که نسبت به گروه تنها مواجهه یافته با CPF آسیب کمتر شده است. همچنین در گروه تیمار شده با عصاره رزماری با غلظت ۲۰۰ mg/kg به همراه CPF وضعیت سلول‌های بافت کبد بیشتر مشابه ساختار بافتی گروه کنترل بود. (شکل ۴)

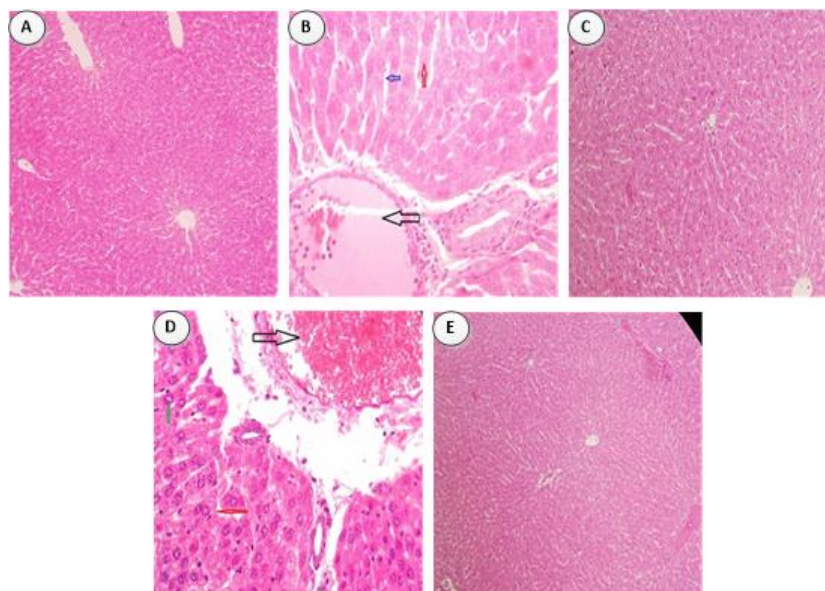
دریافت کننده سم و کنترل معنی‌دار است و حاکی از این است که افزایش ماده آنتی‌اکسیدان روند کاهشی در میزان MDA کبدی داشته است.

### نتایج حاصل از مطالعات بافت‌شناسی

نتایج حاصل از مطالعات بافت‌شناسی مشخص کرد که بافت کبد در موش‌های صحرائی تیمار شده با CPF در مقایسه با ساختار طبیعی بافت کبد موش‌های صحرائی گروه کنترل، افزایش فاصله سینوزوئیدها، نکروز سلول‌های



شکل ۳. تغییرات سطح مالون دی آلدئید در گروه‌های مورد مطالعه



**شکل ۴.** تصاویر بافت‌شناسی کبد در موش‌های صحرائی نر. A: ساختار بافت کبد در موش‌های صحرائی گروه کنترل که چیدمان سلولی طبیعی را نشان می‌دهد. B: آشفته‌گی شدید در چیدمان سلول‌ها، افزایش فاصله سینوزوئیدها (پیکان آبی)، نکروز سلول‌های کبدی (پیکان قرمز) و ادم سیاهرگ مرکزی (پیکان مشکی) در موش‌های صحرائی تیمار شده با CPF را نشان می‌دهد. C: ساختار بافت کبد در موش‌های صحرائی تیمار شده با عصاره رزماری که از نظر چیدمان سلولی و ساختار بافتی مشابه گروه کنترل می‌باشد. D: ساختار بافت کبد موش‌های صحرائی تیمار شده با عصاره رزماری با غلظت ۱۰۰ mg/kg به همراه CPF که پرخونی سیاهرگ مرکزی (پیکان مشکی) و تورم سلول‌های کبدی و هسته سلول‌ها قابل مشاهده است (پیکان سبز). E: ساختار بافت کبد در موش‌های صحرائی تیمار شده با عصاره رزماری با غلظت ۲۰۰ mg/kg به همراه CPF که از نظر چیدمان سلولی و ساختار بافتی مشابه گروه کنترل می‌باشد. (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انوزین بزرگ‌نمایی X ۴۰۰)

## تغییرات وزنی

وزن هر یک از موش‌ها در هفته اول، دوم و انتهای آزمایش اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج به دست آمده در شکل ۵ مشخص است که مواجهه با سم کلرپیریفوس می‌تواند باعث کاهش وزن گیری موش‌ها در دوره ۳۰ روزه نسبت به گروه کنترل گردد. همچنین مشاهده شد که دریافت عصاره گیاه رزماری هم زمان با دریافت سم، می‌تواند باعث بهبود در افزایش وزن موش شود.

## بحث

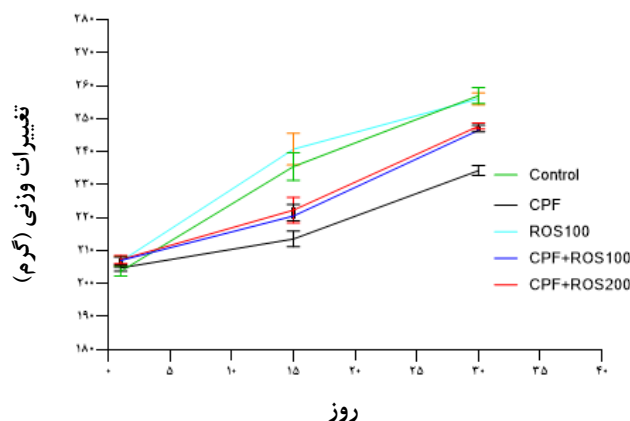
امروزه یکی از استراتژی‌های مناسب جهت جلوگیری و یا کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از سموم استفاده از مواد آنتی‌اکسیدان طبیعی است (۳۴). بنابراین این مطالعه با هدف بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری در کاهش اثرات ناشی از CPF صورت گرفت.

مواجهه طولانی مدت با این CPF باعث التهاب در بافت‌ها (۳۵)، آپوپتوز (۳۶) و اختلال در کانال‌های سدیم پتاسیم می‌گردد (۳۷). با توجه به اینکه کبد یکی از اندام‌های مهم در تبدیل زیستی مواد است، CPF از طریق سیستم گردش خون و نهایتاً تغییر بیومارکرهای کبد می‌تواند منجر به سمیت کبدی گردد (۳۸). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره گیاه رزماری در برابر مسمومیت کبدی القاء شده با CPF در موش‌های صحرایی نقش حفاظتی دارد. عصاره‌های گیاهی دارای ترکیبات مختلف آنتی‌اکسیدانی از جمله پلی‌فنل‌ها هستند. مطالعات نشان داده‌اند که این عصاره‌ها به ویژه فلاونوئیدها فعالیت‌های زیستی فراوانی داشته و می‌توان بسیاری از خواص عصاره‌های گونه‌های گیاهی را به آن‌ها نسبت داد (۳۹). این ترکیبات در ساختار شیمیایی خود دارای گروه‌های هیدروکسیل هستند و به‌عنوان عوامل آنتی‌اکسیدانی عمل می‌کنند. پلی‌فنل‌ها قدرت احیاکنندگی بالایی داشته و می‌توانند با رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن واکنش داده و باعث کاهش استرس اکسیداتیو و درنهایت خسارات ناشی از آن به سلول‌ها و بافت‌های بدن شوند (۴۰). همچنین در میان آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیبات فنلی دارای فعالیت ضد رادیکالی بیشتری نسبت به توکوفرول (ویتامین E) و اسید آسکوربیک (ویتامین C) هستند (۴۱).

مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که سم CPF باعث افزایش پراکسیداسیون لیپید در بافت کبد می‌گردد (۴۲). در این مطالعه تیمار موش‌های صحرایی با عصاره رزماری باعث کاهش تغییر برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی ناشی از استرس شد که نقش حفاظتی عصاره

را به‌عنوان یک مکمل آنتی‌اکسیدان در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از CPF و آسیب بافت کبد نشان داد.

طبق مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت مشخص گردید کلرپیریفوس با دوز ۱۶/۴ mg/kg به مدت دو هفته موجب افزایش لیپید پراکسیداسیون در کبد موش‌های صحرایی شد (۱۳). MDA به‌عنوان محصول واکنش پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی شناخته شده که نقش مؤثری در بیماری‌های مختلف و همچنین فرایند التهابی دارد (۴۳). مطالعه حاضر نشان داد که مواجهه با CPF در موش‌های صحرایی پس از ۳۰ روز به‌طور قابل توجهی باعث افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود که عامل آن افزایش پراکسیداسیون لیپید در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد. افزایش MDA با مطالعات قبلی انجام شده در این خصوص مطابقت دارد (۴۴). تغییرات آنزیم MDA در گروه دریافت کننده سم به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که این نتیجه با مطالعات هم‌خوانی دارد (۱۲). همچنین مشاهده گردید که در گروه دریافت کننده هم‌زمان سم و عصاره رزماری با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه تغییرات آنزیمی به نسبت به حالت تعدیل رسیده که این امر نشان دهنده مؤثر بودن این گیاه در کاهش اثرات سمی CPF است. و در گروه دریافت کننده هم‌زمان سم و عصاره‌ی رزماری با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم مشاهده گردید که تغییرات آنزیم MDA به‌طور معنی‌داری به گروه کنترل نزدیک شده‌اند که می‌توان نتیجه گرفت افزایش مصرف رزماری می‌تواند باعث کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از سم CPF در کبد موش صحرایی گردد (شکل ۳). آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx) با اکسید کردن گلوکوتاتیون احیا به گلوکوتاتیون اکسید، H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> را به آب و اکسیژن تبدیل می‌نماید (۴۵). سمیت کبدی معمولاً همراه با اختلالات در سنتز و متابولیسم پروتئین‌ها و چربی‌ها و تغییرات آنزیمی است. در مطالعه حاضر تغییرات معنی‌داری در سطوح GPx گروه مواجهه با CPF و کنترل مشاهده شد (شکل ۱) که این نتایج با مطالعات صورت گرفته در این زمینه هم‌خوانی دارد (۴۶). همچنین مشاهده گردید که در گروه دریافت کننده هم‌زمان سم و عصاره رزماری با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه تغییرات آنزیمی بهبود یافته که این امر نشان دهنده مؤثر بودن این گیاه در کاهش اثرات سمی CPF است. و در گروه دریافت کننده هم‌زمان سم و عصاره رزماری با غلظت ۲۰۰ مشاهده گردید که تغییرات آنزیم GPx اگرچه به گروه کنترل نزدیک شده اما این



شکل ۵. تغییرات وزنی (گرم) در گروه‌های مورد مطالعه

داشتند نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش وزن کمتری داشتند. که تأیید کننده مطالعات صورت گرفته در این زمینه است (۵۲-۵۴). اما در مطالعه باهاتین و همکاران وزن نهایی موش‌های مواجهه یافته با CPF کمتر از وزن اولیه است (۱۲) که ممکن است به دلیل دوز بسیار بالای CPF (۲۷۹ mg/kg) و کم بودن زمان مواجهه (پنج روز) باشد. در گروهی که با عصاره رزماری مواجهه داشتند تغییرات وزنی مشابه تغییرات وزنی گروه کنترل یافت شد، طبق مطالعه‌ای که توسط آنادوم و همکاران (۲۰۰۸) جهت بررسی تغییرات وزنی موش‌های مواجهه یافته با عصاره رزماری صورت گرفت نتایج مطالعه مشابه مطالعه حاضر بود (۵۵). و در گروه مواجهه همزمان با CPF و ماده آنتی‌اکسیدان در دو غلظت مختلف مشاهده گردید تغییرات وزنی به حالت تعدیل رسیده است. در مطالعه صورت گرفته توسط باهاتین و همکاران به منظور بررسی اثر حفاظتی امگا ۳ جهت کاهش سمیت CPF تغییرات وزنی مشابه مطالعه حاضر بود (۱۲).

مواد آنتی‌اکسیدانی زیادی سمیت اکسیداتیو ناشی از ارگانوفسفره‌ها به خصوص کلرپیریفوس را تعدیل می‌نمایند (۱۳، ۱۴، ۴۷، ۵۳، ۵۶). با توجه به مطالعه حاضر گیاه رزماری با توجه به دارا بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی فراوان از جمله کارنوزیک اسید در کاهش سمیت این سم می‌تواند مؤثر می‌باشد.

با توجه به اینکه مراحل آزمایش بر روی موش‌های صحرایی صورت پذیرفت و راه مواجهه با سم کلرپیریفوس از طریق تزریق درون صفاقی بود، افزایش مدت زمان مواجهه با سم کلرپیریفوس و تزریق درون صفاقی به بیش از ۳۰ روز دشوار بود. به دلیل محدودیت مالی محققین مطالعه حاضر نتوانستند سایر شاخص‌های بیوشیمیایی از جمله آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را بررسی کنند.

مقدار معنی‌دار نیست. طبق مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ جهت بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی گیاه کاکوتی<sup>۱</sup> در برابر سمیت کبدی ناشی از CPF صورت گرفت مشاهده گردید که با افزایش غلظت گیاه، تغییرات سطح گلوپروتئین نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نیست (۴۷).

در بررسی‌های هیستوپاتولوژی بافت کبد (شکل ۴) مشاهده گردید که مواجهه با سم CPF می‌تواند باعث آشفتگی در چیدمان سلول‌ها، افزایش فاصله سینوزوئیدها و نکروز گردد. که این نتایج با نتایج مطالعه محامد همخوانی دارد (۴۸). در مطالعه‌ای دیگر که به منظور بررسی اثر CPF بر روی بافت کبد ماهی انجام شد مشاهده گردید که این سم می‌تواند باعث نکروز و ادم در بافت کبد شود (۴۹). عصاره رزماری در گروه مواجهه همزمان با CPF و رزماری با غلظت ۲۰۰ mg/kg از آسیب بافت کبد جلوگیری کرده و آن را در حد کنترل نگه می‌دارد در پژوهش دیگری که به منظور بررسی اثر حفاظتی این گیاه در برابر آسیب کبدی ناشی از کربن تتراکلرید انجام گرفت مشاهده گردید که عصاره رزماری می‌تواند باعث جلوگیری از فرایند آسیب سلولی شود (۵۰). که این جلوگیری می‌تواند به دلیل ویژگی آنتی‌اکسیدانی نیرومند عصاره رزماری باشد که به دلیل بالا بودن درصد بالای از پلی فنول‌ها باعث مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش سمیت کبدی ناشی از کلرپیریفوس می‌گردد.

با توجه به این نکته که افزایش و یا کاهش غیرطبیعی وزن می‌تواند به‌عنوان یکی از نشانه‌های سمیت در نظر گرفته شود (۵۱) در این مطالعه تغییرات وزنی قبل و بعد از مواجهه طبق شکل ۵ به دست آمد که با توجه به مقادیر به دست آمده مشاهده گردید حیواناتی که با CPF مواجهه

- H. Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and biomolecular studies on chlorpyrifos and carbaryl. *Toxicology and applied pharmacology*. 2015;288(3):429-38.
7. Yanai J, Brick-Turin Y, Dotan S, Langford R, Pinkas A, Slotkin TA. A mechanism-based complementary screening approach for the amelioration and reversal of neurobehavioral teratogenicity. *Neurotoxicology and teratology*. 2010;32(1):109-13.
  8. Alaa-Eldin EA, El-Shafei DA, Abouhashem NS. Individual and combined effect of chlorpyrifos and cypermethrin on reproductive system of adult male albino rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017;24(2):1532-43.
  9. Ventura C, Zappia C, Lasagna M, Pavicic W, Richard S, Bolzan A, et al. Effects of the pesticide chlorpyrifos on breast cancer disease. Implication of epigenetic mechanisms. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2018.
  10. Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, et al. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical reviews in toxicology*. 2008;38(sup2):1-125.
  11. Gündüz E, Ülger BV, İbiloğlu İ, Ekinçi A, Dursun R, Zengin Y, et al. Glutamine provides effective protection against deltamethrin-induced acute hepatotoxicity in rats but not against nephrotoxicity. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2015;21:1107.
  12. Avci B, Bilge SS, Arslan G, Alici O, Darakci O, Baratzada T, et al. Protective effects of dietary omega-3 fatty acid supplementation on organophosphate poisoning. *Toxicology and industrial health*. 2017.
  13. Ahmed MM, Zaki NI. Assessment the ameliorative effect of pomegranate and rutin on chlorpyrifos-ethyl-induced oxidative stress in rats. *Nature and Science*. 2009;7(10):49-61.
  14. Saoudi M, Hmida IB, Kammoun W, Rebah FB, Jamoussi K, Feki AE. Protective effects of oil of *Sardinella pilchardis* against subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in female rats. *Archives of environmental & occupational health*. 2018;73(2):128-35.
  15. Kalantary S, Pourbabaki R, Jahani A, Sadeghi Yarandi M, Samiei S, Jahani R. Development of a decision support system tool to predict the pulmonary function using artificial neural network approach. *Concurrency and Computation: Practice and Experience*. e6258.
  16. Ma P, Wu Y, Zeng Q, Gan Y, Chen J, Ye X, et al. Oxidative damage induced by chlorpyrifos in the hepatic and renal tissue of Kunming mice and the antioxidant role of vitamin E. *Food and chemical toxicology*. 2013;58:177-

بنابراین برای مشخص شدن بهتر و دقیق تر اثرات تحقیقات بیشتری مورد نیاز است. بنابر محدودیت اخلاقی و قانونی جهت انجام چنین آزمایش‌هایی بر روی جمعیت انسانی، مطالعه حاضر بر روی موش صحرایی صورت گرفت.

## نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که CPF به واسطه تولید رادیکال‌های آزاد، تنش اکسیداتیو و تضعیف دفاع آنتی‌اکسیدانی باعث آسیب سلولی و تغییرات ساختاری در بافت کبد موش‌های صحرایی می‌شود. درحالی‌که عصاره رزماری به دلیل دارا بودن ترکیبات فیتوشیمیایی باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و محافظت در برابر آسیب کبدی ناشی از ماده سمی CPF می‌گردد. برای تعیین مکانیسم دقیق عصاره رزماری در بدن نمونه‌های حیوانی و انسانی انجام مطالعات بیش‌تر پیشنهاد می‌گردد. از جمله نقاط قوت این مطالعه استفاده از سم تجاری ست که در حال حاضر مورد استفاده در بازار و کشاورزی قرار دارد. از این نظر می‌توان نتایج مطالعه را به محیط کار تعمیم داد. ولی باید در نظر داشت که در این مطالعه از عصاره به صورت خالص استفاده شد، و برای استفاده در محیط کار باید تمهیداتی اندیشیده شود.

## References

1. Yahia D, Ali MF. Assessment of neurohepatic DNA damage in male Sprague-Dawley rats exposed to organophosphates and pyrethroid insecticides. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018;1-14.
2. Ramin Sabet M, Pourhossein M, Khadem M, Omidi F, Golbabaie F, J. SS. Development of dispersive liquid-liquid micro-extraction procedure for trace determination of pesticide diazinon in urine samples. *JHSW*. 2019;8(4):359-70.
3. Pourbabaki R, Khadem M, Samiei S, Hasanpour H, Shahtaheri SJ. The protective effect of rosemary in mitigating oxidative stress induced by Chlorpyrifos in rat kidney. *Journal of Health and Safety at Work*. 2020;10(2):24-9.
4. Balali-Mood M, Moshiri M, Alizadeh A. Nerve agents OP In: Balali-Mood M and Abdollahi M. *Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorous Compounds*, London Springer. 2014:177-212.
5. Ahmad MZ, Khan A, Javed MT, Hussain I. Impact of chlorpyrifos on health biomarkers of broiler chicks. *Pesticide biochemistry and physiology*. 2015;122:50-8.
6. Lee I, Eriksson P, Fredriksson A, Buratovic S, Viberg

29. Nusier MK, Bataineh HN, Daradkah HM. Adverse effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on reproductive function in adult male rats. *Experimental biology and medicine*. 2007;232(6):809-13.
30. de Almeida Gonçalves G, de Sá-Nakanishi AB, Comar JF, Bracht L, Dias MI, Barros L, et al. Water soluble compounds of *Rosmarinus officinalis* L. improve the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. *Food & function*. 2018.
31. Posadas S, Caz V, Largo C, De la Gandara B, Matallanas B, Reglero G, et al. Protective effect of supercritical fluid rosemary extract, *Rosmarinus officinalis*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Experimental gerontology*. 2009;44(6-7):383-9.
32. Hosseini N, Malekiran A, Changizi Ashtiani S, Nazemi MJSJ. Free radicals scavenging activity of essential oils and different fractions of methanol extract of *zataria multiflora*, *salvia officinalis*, *rosmarinus officinalis*, *mentha pulegium* and *cinnamomum zeylanicum*. 2012;20(1):28-38.
33. Shoja N, Dianat M, Hoseyni Nik S, Ramazani GJJBUMS. The evaluation of the protective effects of the hydroalcoholic extract of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) on ventricular arrhythmias in Rats. 2015;17(5):66-72.
34. Valimehr S, Sanjarian F, Sharafi A, Sabouni F. A reliable and efficient protocol for inducing genetically transformed roots in medicinal plant *Nepeta pogonosperma*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2014;20(3):351-6.
35. Toshio N. Nerve membrane Na<sup>+</sup> channels as targets of insecticides. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1992;13:236-41.
36. Altun S, Özdemir S, Arslan H. Histopathological effects, responses of oxidative stress, inflammation, apoptosis biomarkers and alteration of gene expressions related to apoptosis, oxidative stress, and reproductive system in chlorpyrifos-exposed common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Pollution*. 2017;230:432-43.
37. Voorhees JR, Rohlman DS, Lein PJ, Pieper AA. Neurotoxicity in preclinical models of occupational exposure to organophosphorus compounds. *Frontiers in neuroscience*. 2017;10:590.
38. Aly N, Kawther E-G, Mahmoud F, El-Sebae AK. Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2010;97(1):7-12.
39. Yu L, Perret J, Davy B, Wilson J, Melby C. Antioxidant properties of cereal products. *Journal of Food Science*. 2002;67(7):2600-3.
40. Pandey P, Doerksen RJ. New drugs from natural products around the world. *Pharm Sci*. 2016;22:215-6.
- 83.
17. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free radical biology and medicine*. 2012;52(1):59-69.
18. Brent J, Burkhart K, Dargan P, Hatten B, Megarbane B, Palmer R, et al. *Critical care toxicology: diagnosis and management of the critically poisoned patient*: Springer; 2017.
19. Robertson V. The assessment of potential insecticidal plants for local use in rural highland Ecuador: University of British Columbia; 2010.
20. Mansour SA, Mossa A-TH. Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2010;96(1):14-23.
21. Tripathi S, Srivastav AK. Liver profile of rats after long-term ingestion of different doses of chlorpyrifos. *Pesticide biochemistry and physiology*. 2010;97(1):60-5.
22. El-Hossary GG, Mansour SM, Mohamed AS. Neurotoxic effects of chlorpyrifos and the possible protective role of antioxidant supplements: an experimental study. *Journal of Applied Sciences Research*. 2009(September):1218-22.
23. Raina R, Verma P, Pankaj N, Kant V, Prawez S. Protective effect of ascorbic acid on oxidative stress induced by repeated dermal application of cypermethrin. *Toxicol Environ Chem*. 2010;92:947-53.
24. Raina R, Baba NA, Verma PK, Sultana M, Singh M. Hepatotoxicity induced by subchronic exposure of fluoride and chlorpyrifos in Wistar rats: Mitigating effect of ascorbic acid. *Biological trace element research*. 2015;166(2):157-62.
25. Sepand MR, Soodi M, Hajimehdipoor H, Soleimani M, Sahraei E. Comparison of neuroprotective effects of *Melissa officinalis* total extract and its acidic and non-acidic fractions against a  $\beta$ -induced toxicity. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. 2013;12(2):415.
26. Hassani S, Sepand M, Jafari A, Jaafari J, Rezaee R, Zeinali M, et al. Protective effects of curcumin and vitamin E against chlorpyrifos-induced lung oxidative damage. *Human & experimental toxicology*. 2015;34(6):668-76.
27. Kalantary S, Jahani A, Pourbabaki R, Beigzadeh Z. Application of ANN modeling techniques in the prediction of the diameter of PCL/gelatin nanofibers in environmental and medical studies. *RSC advances*. 2019;9(43):24858-74.
28. Grissa I, Ezzi L, Chakroun S, Mabrouk A, Saleh AB, Braham H, et al. *Rosmarinus officinalis* L. ameliorates titanium dioxide nanoparticles and induced some toxic effects in rats' blood. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017;24(13):12474-83.

- to chlorpyrifos induces reversible changes in health parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic toxicology*. 2018;197:47-59.
50. Botsoglou N, Taitzoglou I, Zervos I, Botsoglou E, Tsantarliotou M, Chatzopoulou P. Potential of long-term dietary administration of rosemary in improving the antioxidant status of rat tissues following carbon tetrachloride intoxication. *Food and chemical toxicology*. 2010;48(3):944-50.
51. Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK, Maronpot RR, Prater DA, Riley JH, et al. Best practices guideline: toxicologic histopathology. *Toxicologic Pathology*. 2004;32(1):126-31.
52. Mansour SA-K, Gamet-Payrastre L. Ameliorative effect of vitamin E to mouse dams and their pups following exposure of mothers to chlorpyrifos during gestation and lactation periods. *Toxicology and industrial health*. 2016;32(7):1179-96.
53. Acker CI, Souza ACG, dos Santos MP, Mazzanti CM, Nogueira CW. Diphenyl diselenide attenuates hepatic and hematologic toxicity induced by chlorpyrifos acute exposure in rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2012;19(8):3481-90.
54. Akhtar N, Srivastava M, Raizada R. Assessment of chlorpyrifos toxicity on certain organs in rat, *Rattus norvegicus*. *J Environ Biol*. 2009;30(6):1047-53.
55. Anadon A, Martinez-Larranaga MR, Martinez MA, Ares I, Garcia-Risco MR, Senorans FJ, et al. Acute oral safety study of rosemary extracts in rats. *Journal of food protection*. 2008;71(4):790-5.
56. Uchendu C, Ambali SF, Ayo JO, Esievo KA. The protective role of alpha-lipoic acid on long-term exposure of rats to the combination of chlorpyrifos and deltamethrin pesticides. *Toxicology and industrial health*. 2017;33(2):159-70.
41. Karami Z, Mirzaei H, Emam-Djomeh Z, Mahoonak AS, Khomeiri M. Effect of harvest time on antioxidant activity of *Glycyrrhiza glabra* root extract and evaluation of its antibacterial activity. *International Food Research Journal*. 2013;20(5):2951.
42. ElMazoudy RH, Attia AA, El-Shenawy NS. Protective role of propolis against reproductive toxicity of chlorpyrifos in male rats. *Pesticide biochemistry and physiology*. 2011;101(3):175-81.
43. Vurmaz A, Duman R, Sabaner MC, Ertekin T, Bilir A. Antioxidant Effects of Piperine In In-vivo Chick Embryo Cataract Model Induced by Steroids. *Cutaneous and ocular toxicology*. 2019(just-accepted):1-26.
44. Yonar ME. Chlorpyrifos-induced biochemical changes in *Cyprinus carpio*: Ameliorative effect of curcumin. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2018;151:49-54.
45. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*. 2008;4(2):89.
46. Yahia D AM. Assessment of neurohepatic DNA damage in male Sprague-Dawley rats exposed to organophosphates and pyrethroid insecticides. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018 1-4.
47. Yazdinezhad A, Abbasian M, Hojjat Hosseini S, Naserzadeh P, Agh-Atabay AH, Hosseini MJ. Protective effects of *Ziziphora tenuior* extract against chlorpyrifos induced liver and lung toxicity in rat: Mechanistic approaches in subchronic study. *Environmental toxicology*. 2017;32(9):2191-202.
48. Mohamed WR, Mehany AB, Hussein RMJEt, pharmacology. Alpha lipoic acid protects against chlorpyrifos-induced toxicity in Wistar rats via modulating the apoptotic pathway. 2018;59:17-23.
49. Zahran E, Risha E, Awadin W, Palić D. Acute exposure