

اثر اسانس‌های رازیانه و زنیان بر متابولیت‌های خون و آسیب‌شناسی بافت کبد و کلیه در موش

صحرائی ویستار تحت شرایط تنش القایی دگزامتازون

احمد ریاسی^{۱*}، ربابه عباسی^۲، امیرحسین مهدوی^۳، اردشیر طالبی^۴، سعیده عبدالله زاده^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۳

چکیده

در شرایط تنش، غلظت کورتیکوئیدهای خون افزایش می‌یابد که می‌تواند بر سلامت عمومی بدن و عملکرد اندام‌های حیاتی از جمله کبد و کلیه‌ها تاثیر گذارد. مصرف برخی آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی احتمالاً می‌تواند بر آسیب‌های متابولیکی ناشی از تنش تاثیر داشته باشد. هدف این پژوهش بررسی اثر اسانس‌های رازیانه و زنیان بر متابولیت‌های خون و آسیب‌های بافتی ناشی از تنش القایی در موش صحرائی بود. از ۴۰ سر موش صحرائی نر بالغ ویستار در پنج تیمار استفاده شد: ۱- بدون تنش، بدون مصرف مکمل، ۲- تنش بدون مصرف مکمل، ۳- تنش با مصرف اسانس رازیانه، ۴- تنش با مصرف اسانس زنیان، ۵- تنش با مصرف مخلوط اسانس‌های رازیانه و زنیان. برای القای تنش، دگزامتازون تزریق شد (داخل ماهیچه‌ی ران، ۱ میلی گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و اسانس‌های رازیانه، زنیان و مخلوط آن‌ها گاوژ شدند. در پایان، نمونه خون موش‌های صحرائی گرفته شد و سپس از کبد و کلیه‌ها نمونه‌برداری انجام شد. القای تنش، فعالیت ALT و AST خون را افزایش داد، اما مصرف هر یک از اسانس‌ها و مخلوط آنها فعالیت این آنزیم‌ها را کاهش داد. با مصرف اسانس رازیانه، واکنش‌های بافت کبد بشدت کاهش یافت و ادم و تجمع چربی کمتر شد. در گروه تنش آثار دژنره شدن هیدروپیک در سیتوپلاسم سلول‌های جدار توپول‌ها مشاهده شد. اما، در گروه مصرف‌کننده‌ی اسانس رازیانه گلمرول‌ها ظاهر طبیعی داشتند و ادم سلولی کاهش یافت. مصرف اسانس‌های گیاهی (بوژه رازیانه) بر بهبود سلامت کبد و کلیه‌ها و رفع آسیب‌های بافتی ناشی از تنش در موش صحرائی اثر مثبت داشت.

واژه‌های کلیدی: ادم بافتی، دژنره شدن هیدروپیک، رازیانه، زنیان، موش صحرائی

۱-استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

* (نویسنده مسئول: ariasi@iut.ac.ir)

۲-دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳-دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۴-دانشیار، گروه آسیب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۵- دانشجوی دکتری فیزیولوژی دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

تنش به شرایطی گفته می‌شود که موجب ایجاد ناراحتی و عدم آسایش فرد یا حیوان شود. بروز تنش به‌طور معمول موجب آغاز فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال می‌شود که نتیجه آن افزایش ترشح گلیکوکورتیکوئیدها از غدد آدرنال است. به‌خوبی مشخص شده است که گلیکوکورتیکوئیدها (کورتیزول در انسان و کورتیکوسترون در جوندگان) یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی انرژی در سلول‌های چربی بدن هستند. گزارش شده است که گلیکوکورتیکوئیدها موجب تغییر در الگوی مصرف خوراک، مصرف انرژی، تجمع چربی و مقاومت انسولینی می‌شوند (Peckett *et al.*, 2011). ساتو و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که افزایش سطح کورتیکوسترون در سرم خون موش‌های صحرایی موجب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و آسیب‌های اکسیداتیو در مغز آنها شد (Sato *et al.*, 2010).

کبد یک عضو حیاتی است که در متابولیسم و حفظ هموستازی بدن، حذف بیلی‌روبین و تنظیم سطح گلوکز خون نقش دارد. گزارش شده است که تنش اکسیداتیو موجب شروع و پیشرفت آسیب‌های کبدی می‌شود، تغییراتی در بافت و عملکرد کلیه‌ها ایجاد می‌کند و سبب بروز فیبروز کلیوی می‌شود (Li *et al.*, 2015; Robbins *et al.* 2002). مصرف آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و سنتتیک همواره به‌عنوان یک استراتژی پیشگیری یا درمانی در بروز آسیب‌های ناشی از تنش مطرح است. در این ارتباط استفاده از گیاهان دارویی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است و معتقدند که وجود ترکیبات پلی‌فنولیک در گیاهان دارویی به‌دلیل خاصیت احیاکنندگی می‌تواند نقش مهمی در غیر فعال کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن داشته باشد (Chatterjee *et al.* 2012; Yoshikawa *et al.* 2003).

رازبانه با نام علمی *Foeniculum vulgare* گیاهی دو یا چند ساله از خانواده‌ی چتریان است که در آسیا و اروپا کشت می‌شود و دانه‌ی این گیاه به‌عنوان یک ترکیب معطر و دارویی از گذشته مورد استفاده بوده است. گزارش شده است که رازبانه دارای خواص فارماکولوژیکی متعدد از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی است (Al-Amoudi, 2017; Kooti *et al.*, 2015). همچنین گزارش شده است مصرف عصاره‌ی دانه‌ی رازبانه موجب کاهش قند خون، کاهش چربی و کاهش فعالیت‌های اکسیداتیو در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوسین^۱ شد و مشکلات کبدی ناشی از دیابت نیز برطرف شد (Parsaeyan, 2016). نتایج یک تحقیق دیگر نشان داد که مصرف روغن رازبانه موجب بهبود عملکرد کبد و کلیه‌ها در موش‌های آلبینو مسموم شده با سدیم‌والپوریک^۲ شد (Al-Amoudi, 2017). زنیان با نام علمی *Trachyspermum ammi* در طب سنتی ایرانیان یک گیاه شناخته شده با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. نتایج یک آزمایش نشان داد که مصرف عصاره دانه زنیان در موش‌های صحرایی مبتلا به

¹ Streptozotocin

² Sodium-Valporic

مسمومیت کبدی موجب از بین رفتن رادیکال‌های آزاد شد و از پراکسیداسیون لیپیدهای غشای هپاتوسیت‌ها جلوگیری کرد (Anilakumar *et al.*, 2009).

با توجه به اینکه در شرایط تنش آسیب‌های بافتی اتفاق می‌افتد، هدف از اجرای این آزمایش بررسی اثر مصرف اسانس رازیانه و (یا) زنیان بر فراسنجه‌های متابولیکی و آنتی‌اکسیدانی خون و همچنین آسیب شناسی بافت کبد و کلیه‌ها در موش‌های صحرایی نر ویستار به‌عنوان یک مدل پستاندار در شرایط تنش القایی ناشی از تزریق دگزامتازون بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات و شرایط نگهداری آنها

این مطالعه‌ی تجربی در ساختمان پژوهشی گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شد. برای این منظور ۵۰ سر موش صحرایی نر ویستار با وزن ۲۵۰ تا ۳۳۰ گرم و سن دو تا سه ماه از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی ایران (حصارک، کرج) تهیه شد. موش‌های صحرایی در مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی که دارای تجهیزات لازم و استاندارد بود، در قفس‌های انفرادی ساخته شده از پلی‌کربنات شفاف نگهداری شدند. در تمام مدت چرخه‌ی نور-تاریکی ۱۲ ساعته، محدوده دمایی 23 ± 2 درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۴۵ تا ۵۵ درصد حفظ شد. حیوانات محدودیتی در استفاده از آب و خوراک نداشتند و اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی به‌طور کامل رعایت شد. از آب‌خوری‌های نیپلی برای تامین آب تمیز و تازه استفاده شد و خوراک روزانه به‌صورت پلت و بدون محدودیت در اختیار موش‌های صحرایی قرار گرفت. پس از دو هفته دوره عادت‌پذیری به محیط نگهداری و همچنین عملیات گاوآژ، موش‌های صحرایی که شرایط مناسب‌تری از نظر سلامتی داشتند به طرح وارد شدند.

تیمارهای آزمایشی

موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی به ۵ تیمار آزمایشی تقسیم شدند و در هر تیمار ۸ حیوان قرار گرفتند، به‌طوری‌که میانگین وزن هر تیمار مشابه (294 ± 31) بود. گروه‌های آزمایشی عبارت بودند از: ۱- بدون تنش و بدون مصرف مکمل (CON)، ۲- تنش بدون مصرف مکمل (ST)، ۳- تنش با مصرف اسانس رازیانه (ST+FE)، ۴- تنش با مصرف اسانس زنیان (ST+AJ) و ۵- تنش با مصرف مخلوط اسانس‌های رازیانه و زنیان (ST+FE+AJ).

ایجاد تنش القایی

برای ایجاد شرایط تنش القایی، تزریق دگزامتازون داخل ماهیچه‌ی ران (۱ میلی گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) صورت گرفت (Gholap & Kar, 2003). در گروه کنترل نیز به‌منظور شبیه‌سازی شرایط تزریق، روزانه ۰/۲ میلی لیتر آب مقطر داخل ماهیچه هر حیوان تزریق شد. پس از دو هفته القای تنش، تمام موش‌های صحرایی در ساعت ۱۱ تا ۱۲ هر روز صبح گاوآژ

شدند و اینکار تا سه هفته ادامه یافت. گاوژ در گروه‌های ۳ و ۴ و ۵ به ترتیب با اسانس رازیانه، اسانس زنیان و مخلوط اسانس‌های رازیانه و زنیان (۵۰:۵۰) به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن انجام شد (Manna et al., 2015). به منظور یکنواختی شرایط آزمایش، در گروه‌های ۱ و ۲ نیز عملیات گاوژ با خوردن آب مقطر شبیه‌سازی شد. تزریق روزانه دگزامتازون در تمام مدت گاوژ ادامه یافت (Jatwa et al., 2007).

تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی

برای تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها، از روش مهار رادیکال آزاد دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده شد و پس از اندازه‌گیری میزان جذب نوری درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \text{ (جذب شاهد/جذب نمونه - جذب شاهد)} = \text{درصد مهار رادیکال‌های آزاد}$$

در این فرمول جذب شاهد، جذب نوری کنترل که فاقد اسانس می‌باشد را نشان می‌دهد و در حقیقت همان DPPH محلول در متانول است. جذب نمونه، میزان جذب نوری غلظت‌های مختلف اسانس (۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) را در طول موج ۵۲۰ نانومتر بیان می‌کند. در آزمایش ما از اسید آسکوربیک (به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی استاندارد) استفاده شد.

نمونه‌گیری‌ها

مصرف روزانه خوراک موش‌های صحرایی در هر گروه آزمایشی به‌طور دقیق ثبت شد. همچنین وزن بدن هر حیوان قبل از شروع آزمایش و پس از آن به‌طور هفتگی تعیین و ثبت شد. در انتهای آزمایش نیز طول بدن موش‌های صحرایی (از نوک بینی تا مقعد) با خط کش اندازه‌گیری شد و شاخص توده‌ی بدنی طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{طول بدن (سانتی متر مربع)} / \text{وزن بدن (گرم)} = \text{شاخص توده‌ی بدنی}$$

در روز انتهایی آزمایش (روز ۳۵) پس از ۱۲ ساعت گرسنگی شبانه، موش‌های صحرایی با استنشاق کلروفرم بیهوش و سپس کشته شدند. بلافاصله نمونه خون از قلب آنها گرفته شد و سرم جدا شده از خون تا قبل از انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد (Jatwa et al., 2007). فراسنجه‌های سرم شامل آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP)، کلسترول، تری‌گلیسرید، اوره، کراتینین، آلومین، پروتئین (کیت های تجاری پارس آزمون)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (کیت تجاری راندوکس، انگلستان) و مالون‌دی‌آلدئید (Wullepit et al., 2012) اندازه‌گیری شد.

پس از خونگیری، لاشه‌ی حیوانات از ناحیه شکم باز شد و کبد و کلیه‌ها بطور کامل از لاشه جدا و وزن آنها تعیین شد. سپس هر اندام (کبد، کلیه‌ها) بطور تصادفی به ۱۰ قطعه تقسیم شد و قطعات بافتی پس از شستشو با سرم نمکی داخل محلول فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت گذاشته شدند. آماده‌سازی نمونه‌های بافت با دستگاه تمام اتوماتیک Tissue processor انجام شد. بلوک‌های پارافینه با استفاده از میکروتوم با ضخامت ۵ میکرومتر برش داده شدند و پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین-ئوزین (H&E)، لام دائمی نمونه‌ها برای مطالعات بافت‌شناسی آماده شد. پارامترهای مورفولوژیکی (شامل یکنواختی بافت، تجمع آب و چربی، دژنره شدن سلولها و ...) بافت‌های مورد نظر در نمونه‌های بافتی که بطور مناسب برش خورده و رنگ‌آمیزی شده بودند در زیر میکروسکوپ نوری قرار داده شد.

آنالیز آماری داده‌ها

داده‌های به دست آمده از این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه‌ی آماری قرار گرفت و از آزمون توکی، رویه‌ی میکس برای مقایسه‌ی میانگین‌ها استفاده شد و سطح معنی‌داری ۵ درصد برای مقایسه‌ی میانگین‌ها در نظر گرفته شد. به منظور کاهش اثر خطاهای ناشی از ویژگی‌های فردی برای هر صفت، از متغیرهای کمکی در مدل استفاده شد.

نتایج و بحث

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها

در این آزمایش ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی اسانس رازیانه و زنیان و مخلوط آنها با روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH تعیین شد و داده‌های حاصل با اسید آسکوربیک به عنوان استاندارد مقایسه شد (جدول ۱). نتایج نشان داد که اسانس رازیانه، زنیان و مخلوط آنها با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تا حدود ۶۹ درصد قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد را داشتند که کمتر از اسید آسکوربیک بود. اما، بین دو اسانس و مخلوط آنها از این نظر تفاوتی مشاهده نشد. به‌خوبی مشخص شده است که آنتی-اکسیدان‌ها با دخالت در مراحل اکسیداتیو موجب مهار رادیکال‌های آزاد می‌شوند (Li *et al.*, 2015). در توافقی با یافته‌های قبلی، اسانس‌های رازیانه و زنیان دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بودند (Gandomi *et al.*, 2014). چاترجی و همکاران (۲۰۱۲) با روش مهار DPPH قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی و متانولی رازیانه را به‌ترتیب ۷۲/۲۷ و ۷۸/۴۵ درصد و زنیان را ۸۲/۸۷ و ۸۳/۴۲ درصد، تعیین کردند که اندکی بیشتر از اعداد به دست آمده در این آزمایش بود (Chatterjee *et al.*, 2012). به‌طور کلی معتقدند که وجود ترکیبات پلی‌فنولیک از جمله تیمول، عامل اصلی ایجاد‌کننده‌ی خاصیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌ی گیاهان دارویی است (Gandomi *et al.*, 2014).

جدول ۱: مقایسه مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط غلظت‌های مختلف اسانس‌های رازیانه، زنیان و مخلوط آن‌ها با اسید آسکوربیک

ماده مورد بررسی	غلظت (میلی گرم در میلی لیتر)					
	۳۰	۲۵	۲۰	۱۵	۱۰	۵
اسانس رازیانه	۶۹/۱ ^b	۶۰/۵ ^b	۵۳/۳ ^b	۵۰/۷ ^b	۳۹/۱ ^b	۲۵/۵ ^b
اسانس زنیان	۶۸/۳ ^b	۶۱/۳ ^b	۵۱/۷ ^b	۴۳/۱ ^c	۳۵/۹ ^c	۲۲/۴ ^b
مخلوط اسانس رازیانه و زنیان	۶۸/۱ ^b	۶۰/۱ ^b	۵۲/۱ ^b	۴۵/۳ ^c	۳۶/۷ ^{bc}	۲۳/۲ ^b
اسید آسکوربیک	۸۸/۹ ^a	۸۴/۵ ^a	۸۲/۶ ^a	۷۸/۵ ^a	۷۰/۴ ^a	۵۲/۶ ^a
میانگین خطای آزمایشی	۲/۹	۲/۴	۲/۱	۲/۰	۱/۵	۰/۷

حروف a, b, c در بالای هر عدد نشان‌دهنده تفاوت آماری بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ است و حرف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

شاخص توده بدنی، تغییر وزن بدن، مصرف خوراک و وزن نسبی کبد و کلیه‌ها

شاخص توده بدنی در گروه کنترل بیشترین ($P < 0.05$) بود و گروه‌های تحت تنش، موش‌های صحرایی که مخلوط اسانس رازیانه و زنیان دریافت کرده بودند شاخص توده‌ی بدنی بهتری در مقایسه با گروه تنش بدون مصرف مکمل داشتند ($P < 0.05$) (جدول ۲).

وزن نسبی کبد در گروه تنش به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) بیشتر از دیگر گروه‌های آزمایشی بود و گروه‌های دریافت‌کننده‌ی اسانس از این نظر با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشتند. با اعمال تنش القایی، وزن نسبی کلیه‌ها در تمام گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش ($P < 0.05$) یافت. اما، مصرف مخلوط اسانس رازیانه و زنیان تاثیری بر وزن نسبی کلیه‌ها در مقایسه با گروه کنترل نداشت. نتایج نشان داد که ایجاد تنش القایی، شاخص توده بدنی موش‌های صحرایی را به مقدار زیادی کاهش داد که می‌تواند ناشی از کاهش وزن بدن و آتروفی ماهیچه‌های اسکلتی در گروه تحت تنش باشد (نمودار ۱). بررسی‌ها نشان می‌دهد گلوکوکورتیکوئیدها سبب کاهش رشد و القای آتروفی در سلول‌های ماهیچه‌ای می‌شود (Mitch & Goldberg, 1996). گزارش شده است که تزریق دگزامتازون بیان ژن مایواستاتین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی رشد را در شرایط آزمایشگاهی افزایش داد و موجب آتروفی ماهیچه‌ای و در نهایت موجب کاهش وزن بدن در موش‌های صحرایی شد (Ma et al., 2003). مصرف اسانس‌ها بویژه مخلوط رازیانه و زنیان، اثر منفی دگزامتازون بر شاخص توده بدنی موش‌های صحرایی تحت تنش را تا حدودی خنثی کرد.

نتایج تاثیر تنش و مصرف اسانس‌ها بر تغییر وزن بدن و میانگین مصرف خوراک موش‌های صحرایی در نمودار ۱ نشان داده شده است. مشخص شد که ایجاد تنش القایی موجب کاهش شدید ($P < 0.05$) وزن بدن در مقایسه با گروه کنترل شد و مصرف اسانس‌ها این کاهش وزن را به مقدار زیادی جبران کرد. به‌طوری‌که تغییر وزن اتفاق افتاده در گروه ST+FE+AJ در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبود ($P > 0.05$) و مصرف اسانس‌ها تفاوتی از این نظر نداشت. از سوی دیگر تنش به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) موجب کاهش میانگین مصرف روزانه خوراک شد، اما اسانس‌ها بویژه مخلوط رازیانه و زنیان این کاهش را تا حدود

زیادی جبران کرد. در یک آزمایش اثر مصرف پودر رازیانه در جیره گوساله‌ها بررسی شد و نتایج به دست آمده نشان داد با مصرف ۰/۴ درصد پودر رازیانه، وزن بدن در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت و این را ناشی از اثر رازیانه بر بهبود اشتها و افزایش مصرف خوراک گوساله‌ها دانستند. مانا و همکاران (۲۰۱۵) نیز نشان دادند که در موش‌های صحرایی تحت تنش اکسیداتیو، بطور معنی داری وزن بدن کاهش و وزن نسبی کبد افزایش یافت، اما با مصرف عصاره‌ی دانه‌ی رازیانه و عصاره‌ی گل بابونه این وضعیت بهبود یافت (Manna *et al.*, 2015). در آزمایش حاضر نیز وزن نسبی کبد و کلیه‌ها تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت و تنش موجب افزایش وزن نسبی این اندام‌ها شد. مصرف اسانس‌ها بر بهبود وزن نسبی کبد تاثیر داشت اما بر وزن نسبی کلیه‌ها چندان تاثیری نداشت. به‌طور کلی، می‌توان احتمال داد که افزایش وزن نسبی کبد در نتیجه افزایش فعالیت‌های التهابی و ادم رخ داده است. منصور و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی اثر دیابت نفروپاتی و تنش اکسیداتیو ناشی از آن، نشان دادند وزن نسبی کلیه‌ها بطور معنی‌داری افزایش یافت که نتایج آزمایش حاضر را تایید می‌کند (Mansouri *et al.*, 2011).

جدول ۲- اثر اسانس رازیانه، زنیان و مخلوط آن‌ها بر شاخص توده بدنی و وزن نسبی کبد و کلیه‌ها در موش‌های صحرایی نر ویستار

SEM ^۲	گروه آزمایشی ^۱					
	ST+FE+AJ	ST+AJ	ST+FE	ST	CON	
۰/۰۱	۰/۵۳ ^b	۰/۵۰ ^{bc}	۰/۴۹ ^c	۰/۴۳ ^d	۰/۵۶ ^a	شاخص توده بدنی ^۳
۰/۰۱	۳/۷ ^b	۳/۶۶ ^b	۳/۴۷ ^b	۴/۳۱ ^a	۳/۴۶ ^b	وزن نسبی کبد ^۴
۰/۰۸	۰/۸۷ ^{ab}	۰/۹۵ ^a	۰/۹۵ ^a	۰/۹۶ ^a	۰/۸۰ ^b	وزن نسبی کلیه‌ها ^۴

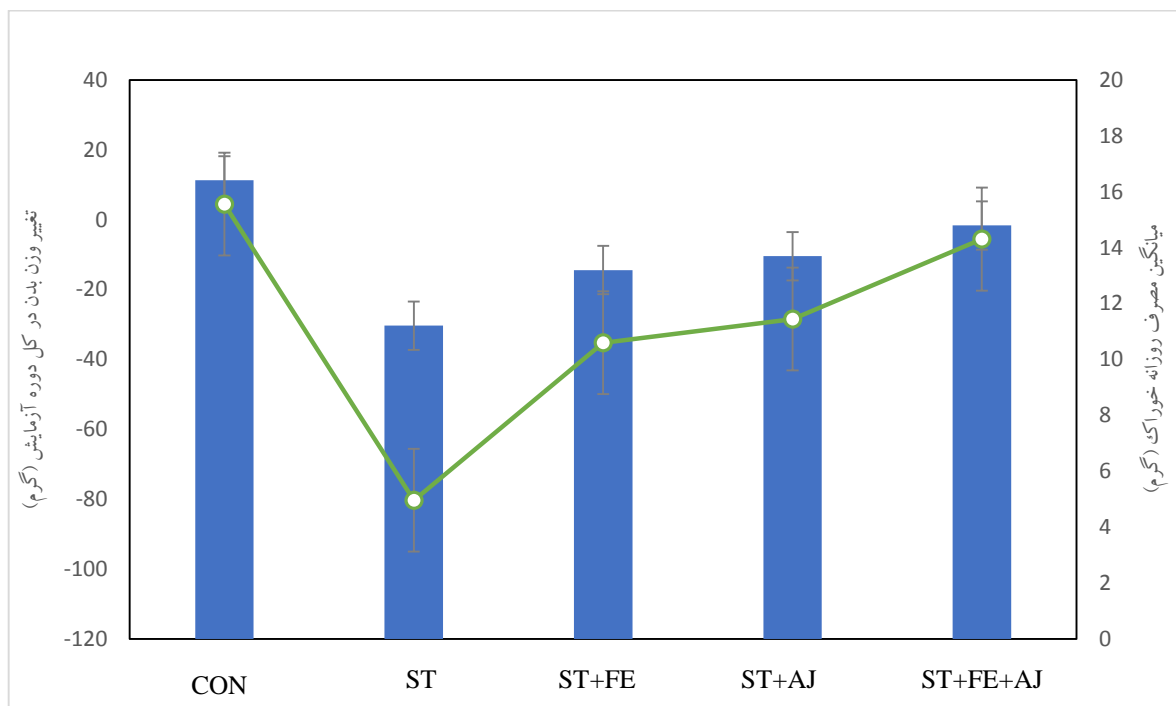
CON^۱: کنترل بدون تنش و مصرف مکمل، ST: تنش بدون مصرف مکمل، ST+FE: تنش با مصرف اسانس رازیانه، ST+AJ: تنش با مصرف اسانس زنیان و ST+FE+AJ: تنش با مصرف مخلوط اسانس‌های رازیانه و زنیان. اسانس‌ها به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز به صورت گاوآژ مصرف شدند.

^۲ میانگین خطای استاندارد

^۳ وزن بدن (گرم) تقسیم بر طول بدن (سانتی‌متر مربع)

^۴ وزن تازه هر اندام تقسیم بر وزن بدن قبل از کشتار

حروف a, b, c و d در بالای هر عدد نشان‌دهنده تفاوت آماری بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ است و حرف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار می‌باشد.



نمودار ۱: اثر اسانس رازیانه، زنیان و مخلوط آن‌ها بر تغییر وزن بدن در کل دوره آزمایش (نمودار خطی) و میانگین مصرف روزانه خوراک (نمودار میله‌ای) در موش‌های صحرائی نر ویستار.

CON: کنترل بدون تنش و مصرف مکمل، ST: تنش بدون مصرف مکمل، ST+FE: تنش با مصرف اسانس رازیانه، ST+AJ: تنش با مصرف اسانس زنیان و ST+FE+AJ: تنش با مصرف مخلوط اسانس‌های رازیانه و زنیان. اسانس‌ها به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز به صورت گاوژ مصرف شدند. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از رویه میکس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی انجام شد.

فعالیت آنزیم‌های کبدی و متابولیت‌های خون

ایجاد تنش القایی در موش‌های صحرائی موجب افزایش ($P < 0.05$) فعالیت آنزیم‌های ALT و AST خون شد (جدول ۳).

اما، در گروه‌های تحت تنش با مصرف اسانس رازیانه و (یا) زنیان، فعالیت این آنزیم‌ها کاهش یافت و از این نظر تفاوتی بین اسانس‌ها مشاهده نشد. ایجاد تنش و مصرف همزمان اسانس‌ها تاثیری بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نداشت. آنزیم‌های ALT، AST و ALP به‌طور طبیعی در هیپاتوسیت‌ها فعال هستند و انتشار آن به خون می‌تواند نشانه نکرز یا آسیب غشای سلولی به دلیل تنش اکسیداتیو و ترشح سایتوکین‌های التهابی باشد (Li et al., 2015). کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در سرم خون موش‌های صحرائی تحت تنش می‌تواند نشان‌دهنده نقش آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی این اسانس‌ها باشد (Al-Amoudi, 2017; Manna et al., 2015). متابولیت‌های سرم خون شامل کلسترول، تری‌گلیسرید، اوره، کراتینین، پروتئین کل و گلوبولین تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. آلبومین خون در گروه تحت تنش بدون مصرف اسانس (ST) در مقایسه با گروه کنترل، بطور معنی‌داری ($P < 0.05$) افزایش یافت. ولی با مصرف اسانس‌ها، غلظت آلبومین سرم خون کاهش یافت به‌طوری‌که تفاوت مشاهده شده با گروه کنترل معنی دار نشد. غلظت آنزیم مالون‌دی‌آلدئید سرم خون تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل مربوط به گروه کنترل بود که با اعمال تنش القایی به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش یافت. نتایج نشان داد که مصرف اسانس‌ها تا حدودی ظرفیت

آنتی‌اکسیدانی خون را بهبود بخشید. به‌خوبی مشخص شده است که آلبومین به‌عنوان یک پروتئین ساخته شده در کبد به‌دلیل داشتن گروه‌های تیول نقش مهمی در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی خارج سلولی دارد و در موارد بروز تنش، غلظت آن ممکن است در سرم خون افزایش یابد (Celi & Gabai, 2015). اما، این موضوع نتوانست اثر مثبتی بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل داشته باشد.

هیستوپاتولوژی کبد و کلیه‌ها

بررسی‌های هیستوپاتولوژی مشخص کرد که ایجاد شرایط تنش موجب بروز اثرات منفی بر بافت کبد (شکل ۱) شد. بطوریکه در بافت کبد موش‌های صحرایی گروه کنترل، سیاهرگ مرکزی و فضای پورتال^۱ ظاهری کاملاً طبیعی داشتند و ترشح سلول‌های التهابی در فضاهای پورت مشاهده نشد. همچنین عناصر پورت (سیاهرگ، مجرای صراوی و بافت همبند) هر کدام در جایگاه مناسب خود دیده شدند و هیپاتوسیت‌ها دارای ظاهر طبیعی (اندازه بزرگ، هسته مرکزی و سیتوپلاسم فاقد واکوئل و بافت چربی یا تجمع صفرا در سیتوپلاسم) بودند. اما، در گروه تحت تنش، هیپاتوسیت‌ها به شدت متورم شدند و در سیتوپلاسم آن‌ها به وضوح واکوئل‌ها و فضای شفاف فراوان دیده شد که می‌تواند ناشی از ادم یا تجمع چربی باشد. همچنین در بافت کبد گروه ST، نکروز سلولی به صورت موضعی و پراکنده مشاهده شد.

جدول ۳: اثر اسانس رازیانه، زنیان و مخلوط آن‌ها بر آنزیم‌های کبدی، متابولیت‌ها و فراسنجه‌های آنتی‌اکسیدانی سرم خون در موش‌های صحرایی نر ویستار

SEM ^r	گروه آزمایشی ^۱					فراسنجه
	ST+FE+AJ	ST+AJ	ST+FE	ST	CON	
۱۵/۹	۱۲۶/۲ ^b	۱۶۳/۷ ^b	۱۳۲/۱ ^b	۲۲۸/۹ ^a	۱۴۶/۳ ^b	آلانین آمینوترانسفراز (U/L)
۱۵/۴	۵۸/۵ ^b	۶۷/۲ ^b	۶۵/۲ ^b	۱۳۷/۴ ^a	۶۷/۶ ^b	آسپارات آمینوترانسفراز (U/L)
۶۲/۳	۵۲۹/۱	۶۴۳/۷	۵۳۰/۲	۶۲۱/۴	۵۹۸/۶	آلکالین فسفاتاز (U/L)
۲/۸	۵۱/۴۸	۵۲/۵۸	۴۶/۲۶	۵۲/۸۰	۴۸/۸۴	اوره (mg/dl)
۰/۰۴	۰/۲۵	۰/۱۵	۰/۲۵	۰/۲۰	۰/۲۳	کراتینین (mg/dl)
۹/۶	۸۷/۸۲	۷۹/۰۳	۷۱/۷۱	۸۸/۵۳	۵۸/۳۰	کلسترول (mg/dl)
۱۰/۱۶	۷۴/۷۱	۷۱/۹۷	۶۳/۴۵	۶۹/۴۱	۴۷/۳۴	تری‌گلیسرید (mg/dl)
۱/۱	۶/۶۸	۶/۵۶	۶/۰۳	۷/۹۰	۶/۷۸	پروتئین کل (g/dl)
۰/۷۲	۳/۲۸	۳/۲۳	۲/۹۵	۴/۲۰	۳/۷۵	گلوبولین (g/dl)
۰/۲۲	۳/۰۵ ^{ab}	۳/۰۱ ^b	۲/۸۹ ^b	۳/۶۸ ^a	۲/۹۴ ^b	آلبومین (g/dl)
۰/۲۷	۱/۹۰	۱/۴۸	۱/۹۱	۲/۰۵	۱/۹۱	مالون‌دی‌آلدئید (nmol/ml)
۰/۱۶	۱/۱۵ ^{ab}	۱/۱۰ ^{ab}	۰/۹۳ ^{ab}	۰/۸۶ ^b	۱/۲۵ ^a	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (mg/dl)

CON^۱: کنترل بدون تنش و مصرف مکمل، ST: تنش بدون مصرف مکمل، ST+FE: تنش با مصرف اسانس رازیانه، ST+AJ: تنش با مصرف اسانس زنیان و ST+FE+AJ: تنش با مصرف مخلوط اسانس‌های رازیانه و زنیان. اسانس‌ها به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز به صورت گاوآژ مصرف شدند.
^۲ میانگین خطای استاندارد

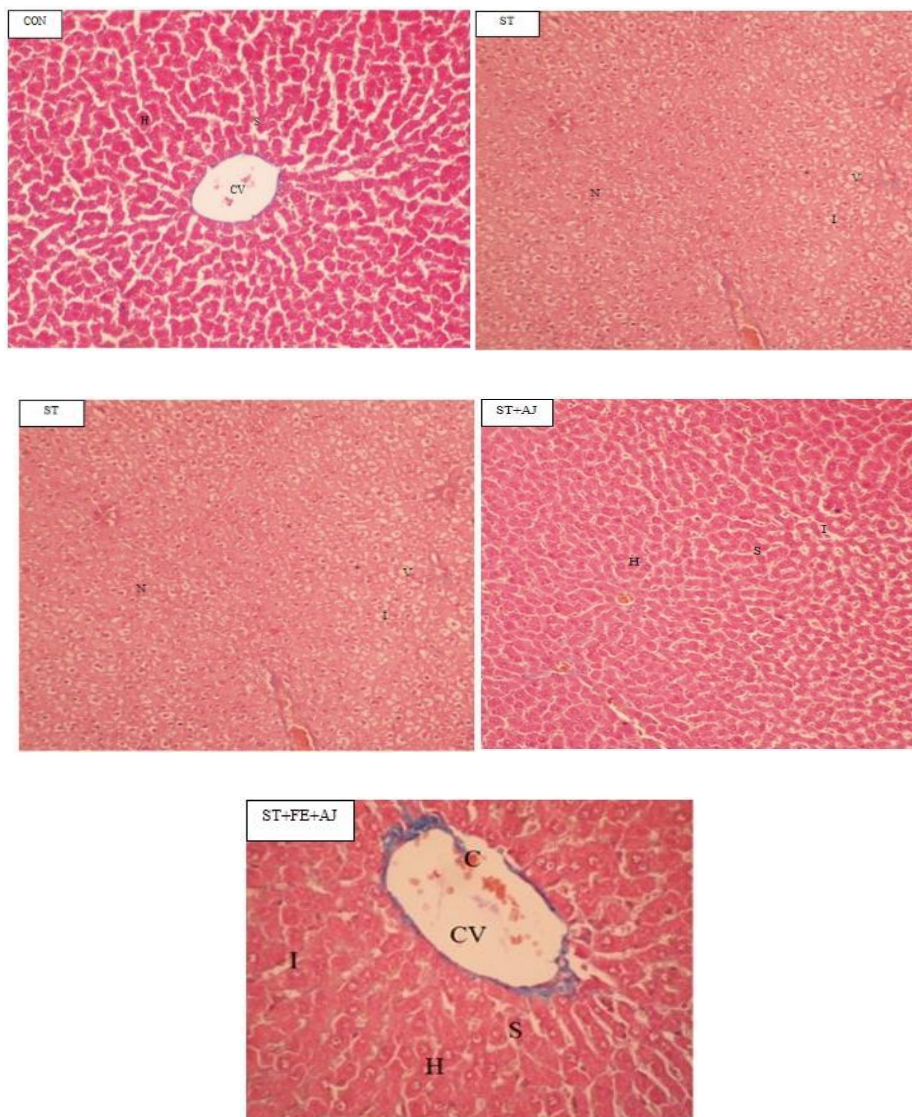
حروف a و b در بالای هر عدد نشان‌دهنده تفاوت آماری بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ است و حرف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

^۱ . Portal space

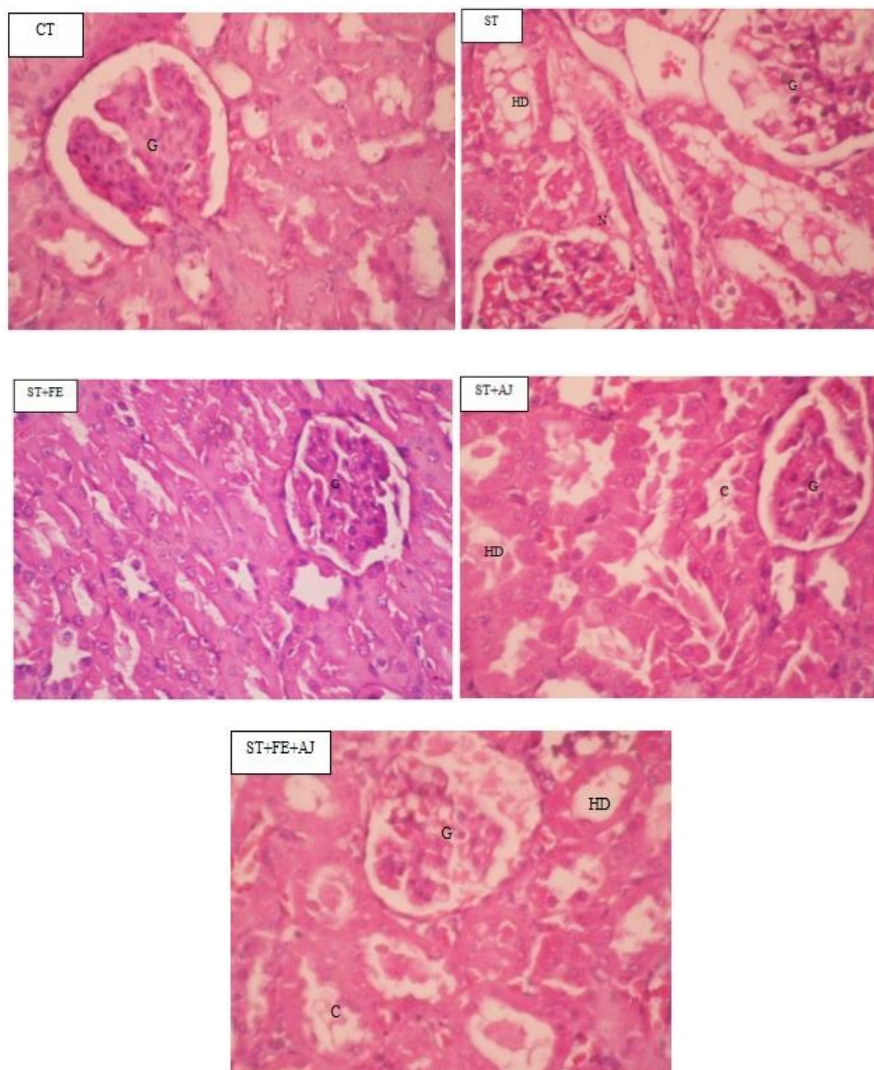
در گروه مصرف‌کننده اسانس رازیانه، واکنش‌های بافت کبد به شدت کاهش یافت و ادم و تجمع چربی نیز کمتر شد، بطوریکه هیپاتوسیت‌ها و سینوزوئیدها در جایگاه طبیعی خود قابل مشاهده بودند و تنها بقایایی از واکنش‌های نسبتاً روشن در سیتوپلاسم هیپاتوسیت‌ها دیده شد. در گروه مصرف‌کننده‌ی اسانس زنیان، گرچه هیپاتوسیت‌ها و سینوزوئیدها در جایگاه طبیعی خود قرار داشتند، اما واکنش‌های حاوی چربی نسبت به گروه رازیانه بیشتر بود و تعداد اندکی سلول‌های التهابی در سینوزوئیدها نیز مشاهده شد. در گروه مخلوط اسانس‌های رازیانه و زنیان، هیپاتوسیت‌ها و سینوزوئیدها در جایگاه طبیعی خود قرار داشتند ولی بقایایی از واکنش‌ها در داخل سیتوپلاسم هیپاتوسیت‌ها قابل مشاهده بود.

نتایج مربوط به هیستوپاتولوژی بافت کلیه‌ها (شکل ۲) نشان داد که در گروه کنترل گلوومرول‌ها نمای طبیعی داشتند، فضای کپسول بومن باز بود، در بین سلول‌های گلوومرولی افزایش مزانشیم وجود نداشت و آثار نکروز و آتروفی در جدار سلول‌ها مشاهده نشد. اما، در گروه تنش‌علیرغم ظاهر طبیعی گلوومرول‌ها، آثار دژنره شدن هیدروپیک و تجمع آب در داخل سیتوپلاسم سلول‌های جدار توبول‌ها مشاهده شد. ادم و ترشح سلول‌های التهابی و افزایش بافت همبند در بافت بینابینی در کلیه‌ها مشاهده نشد. در گروه رازیانه، گلوومرول‌ها ظاهر طبیعی داشتند و ادم داخل سلولی و دژنره شدن هیدروپیک به شدت کاهش یافت. در گروه زنیان، تعداد واکنش‌ها در جدار سلول‌های اپیتلیال در مقایسه با گروه تنش کاهش یافت، اما نسبت به گروه مصرف‌کننده اسانس رازیانه بیشتر بود. در گروه مخلوط اسانس‌های رازیانه و زنیان، به دلیل وجود واکنش‌ها در جدار سلول‌های توبولی، بهبود چندانی نسبت به گروه رازیانه مشاهده نشد.

کبد و کلیه ارگان‌هایی مهم در ذخیره‌سازی، سم‌زدایی، متابولیسم و دفع بسیاری از متابولیت‌های بدن هستند که به‌طور ویژه در معرض خطر آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشند (Aboonabi et al., 2014). نتایج آزمایش حاضر نیز بخوبی این موضوع را نشان داد و مشخص شد که تنش‌القایی با دگزامتازون می‌تواند آسیب‌های زیادی بر بافت کبد و کلیه‌ها وارد کند و در نتیجه بر عملکرد این دو اندام بسیار مهم متابولیکی بدن تاثیر می‌گذارد. گزارش شده است که ترکیبات پلی فنولیک به ویژه فلاونوئیدها دارای اثر حفاظتی برای کبد در برابر آسیب‌های ناشی از سموم و رادیکال‌های آزاد هستند (Mannaa et al., 2015). در این آزمایش نیز مشخص شد که مصرف اسانس‌ها بویژه اسانس رازیانه که دارای مقدار زیادی فلاونوئید است نقش محافظتی بسیار خوبی برای کبد و کلیه‌ها در موش‌های صحرایی تحت تنش‌القایی داشت که با نتایج مانا و همکاران (۲۰۱۵) نیز همخوانی دارد (Mannaa et al., 2015) و نتایج ما در مورد فعالیت آنزیم‌های کبدی (جدول ۳) را نیز تایید می‌کند.



شکل ۱: بافت کبد در گروه کنترل (CON)، گروه تنشی بدون مصرف مکمل (ST)، گروه تنشی با مصرف اسانس رازیانه (ST+FE)، گروه تنشی با مصرف اسانس زنیان (ST+AJ)، گروه تنشی با مصرف مخلوط اسانس‌های رازیانه و زنیان (ST+FE+AJ). سیاهرگ مرکزی (CV)، هیپاتوسیت (H)، واکوئل حاوی آب یا چربی (V)، سینوزئید (S)، نکروز (N)، ترشح سلول‌های التهابی (I)، احتقان مویرگی (C).



شکل ۲: بافت کلیه‌ها در گروه کنترل (CON)، گروه تنشی بدون مصرف مکمل (ST)، گروه تنشی با مصرف اسانس رازیانه (ST+FE)، گروه تنشی با مصرف اسانس زنیان (ST+AJ)، گروه تنشی با مصرف مخلوط اسانس‌های رازیانه و زنیان (ST+FE+AJ)، گلوبمرول (G)، نکروز (N)، احتقان (C) و دژنره شدن هیدروپیک (HD).

نتیجه‌گیری

تنش القایی با دگزامتازون اثرات منفی زیادی در موش‌های صحرایی نر ویستار ایجاد کرد، اما مصرف اسانس‌های رازیانه و زنیان با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی موجب بهبود مصرف خوراک، شاخص توده بدنی و وزن نسبی کبد شد. اغلب متابولیت‌های خون (بجز آلومین) تحت تاثیر شرایط تنش و مصرف اسانس‌ها قرار نگرفتند. مصرف اسانس‌ها (بویژه اسانس رازیانه) بر سلامت کبد و کلیه‌ها اثرات مثبتی داشت.

سپاسگزاری

از آقای دکتر فلاحی (مسئول بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی موسسه رازی کرج) بخاطر در اختیار گذاشتن موش‌های صحرایی مورد نیاز این آزمایش صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- Aboonabi, A., Rahmat, A. and Othman, F. (2014) Effect of pomegranate on histopathology of liver and kidney on generated oxidative stress diabetic induced rats. *Journal of Cytology and Histology*, 6: 294-297.
- Al-Amoudi, W.M. (2017) Protective effects of fennel oil extract against sodium valproate-induced hepatorenal damage in albino rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24: 915-924.
- Anilakumar, K., Saritha, V., Khanum, F. and Bawa, A. (2009) Ameliorative effect of ajwain extract on hexachlorocyclohexane-induced lipid peroxidation in rat liver. *Food Chemistry and Toxicology*, 47: 279-282.
- Celi, P. and Gabai, G. (2015) Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: The role of protein oxidation. *Frontiers in Veterinary Science*, 2: 1-13.
- Chatterjee, S., Goswami, N. and Bhatnagar, P. (2012) Estimation of phenolic components and in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) and ajwain (*Trachyspermum ammi*) seeds. *Advances in Bioresearch*, 3: 109-118.
- Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Jebellijavan, A. and Sharifzadeh, A. (2014) Chemical constituents, antimicrobial and antioxidative effects of trachyspermum ammi essential oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38: 1690-1695.
- Gholap, S. and Kar, A. (2003) Effects of inula racemosa root and gymnema sylvestre leaf extracts in the regulation of corticosteroid induced diabetes mellitus; involvement of thyroid hormones. *Pharmazie*, 58: 413-415.
- Jatwa, R., Parmar, H.S., Panda, S. and Kar, A. (2007) Amelioration of corticosteroid-induced type 2 diabetes mellitus by rosiglitazone is possibly mediated through stimulation of thyroid function and inhibition of tissue lipid peroxidation in mice. *Basic and Clinical Pharmacol and Toxicology*, 101: 177-180.
- Kooti, W., Moradi, M., Ali-Akbari, S., Sharafi-Ahvazi, N., Asadi-Samani, M. and Ashtary-Larky, D. (2015) Therapeutic and pharmacological potential of *Foeniculum vulgare* Mill: a review. *Journal of Herbal Medicine Pharmacology*, 4: 1-9.
- Li, S., Tan, H.Y., Wang, N., Zhang, Z.J., Lao, L., Wong, C.W. and Feng, Y. (2015) The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 6: 26087-26124.

- Ma, K., Mallidis, C., Bhasin, S., Mahabadi, V., Artaza, J., Gonzalez-Cadavid, N., Arias, J. and Salehian, B. (2003) Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 285: 363-371.
- Mannaa, F.A., Ibrahim, N.A., Ibrahim, S.S., Abdel-Wahhab, K.G., Hassan, N.S. and Mohammed, S.G. (2015) Preventive role of chamomile flowers and fennel seeds extracts against liver injury and oxidative stress induced by an immunosuppressant drug in rats. *Hepatoma Research*, 1: 125-135.
- Mansouri, E., Panahi, M., Ghaffari, M.A. and Ghorbani, A. (2011) Effects of grape seed proanthocyanidin extract on oxidative stress induced by diabetes in rat kidney. *Iranian Biomedical Journal*, 15: 100-106.
- Mitch, W.E. and Goldberg, A.L. (1996) Mechanisms of muscle wasting—the role of the ubiquitin–proteasome pathway. *The New England Journal of Medicine*, 335:1897-1905.
- Parsaeyan, N. (2016) The effect of foeniculum vulgare (Fennel) extract on lipid profile, lipid peroxidation and liver enzymes of diabetic rat. *Iranian Journal of Diabetes and Obesity*, 8: 24-29.
- Peckett, A.J., Wright, D.C. and Riddell, M.C. (2011) The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism*, 60: 1500-1510.
- Robbins, M.E., Zhao, W., Davis, C.S., Toyokuni, S. and Bonsib, S.M. (2002) Radiation-induced kidney injury: a role for chronic oxidative stress? *Micron*, 33: 133-141.
- Sato, H., Takahashi, T., Sumitani, K., Takatsu, H. and Urano, S. (2010) Glucocorticoid generates ROS to induce oxidative injury in the hippocampus, leading to impairment of cognitive function of rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 47: 224–232.
- Wullepit, N., Hostens, M., Ginneberge, C., Fievez, V., Opsomer, G., Fremaut, D. and De Smet, S. (2012) Influence of a marine algae supplementation on the oxidative status of plasma in dairy cows during the periparturient period. *Preventive Veterinary Medicine*, 103: 298–303.
- Yoshikawa, M., Xu, F., Morikawa, T., Ninomiya, K. and Matsuda, H. (2003) Anastatins A and B, new skeletal flavonoids with hepatoprotective activities from the desert plant *Anastatica hierochuntica*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13: 1045-1049.

Effect of essential oil of *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi* on blood metabolites and histopathology of liver and kidney in male Wistar rat under dexamethasone-induced stress

A. Riasi^{1*}, R. Abasi², A.H. Mahdavi³, A. Talebi⁴, S. Abdollahzadeh⁵

Received: 2020.4.6

Accepted: 2020.6.2

Abstract

In stress condition, the blood corticoides increases which can affect general health of body as well as the function of some vital organs such as liver and kidneys. Consumption of herbal antioxidants may improve metabolic defects caused by stress. The aim of this study was to evaluate the effect of *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi* essenses on blood metabolites and histopathological damages which is created by dexamethasone due to stress induction. Total of 40 mature Wistar male rats were randomly assigned to 5 treatments: 1- No stress, without supplementation, 2- Stress, whitout supplementation, 3- Stress, with receiving *Foeniculum vulgare* essence, 4- Stress, with receiving *Trachyspermum ammi* essence, 5- Stress, with receiving both of *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi* essence. Dexamethasone injection was done for stress induction and essential oils of *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi* and the mixture of them were gavaged. At the end, the blood samples were collected and then the samples of liver and kidneys were prepared. Stress induction, increased ALT and AST activities, but, feeding each essential oil and the mixture decreased activities of these enzymes. By treatment of *Foeniculum vulgare*, liver tissue vacuoles decreased significantly as well as edema and fat accumulation. In the stress group, hydropic degeneration and water accumulation were observed in cytoplasm of the tubular cells, but in *Foeniculum vulgare* treatment group kidney glomerului had normal appearance and cells edema significantly decreased. Treatment of herbal essential oils (especially *foeniculum vulgare*) had positive effect on liver and kidney health recovery and prevented from tissue damages due to stress induction in rat.

Keywords: Ajwain, Fennel, Histopathology, Hydropic degeneration, Rat, Tissue edema.

1- Professor of Animal Science Department, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

* (Corresponding Author: ariasi@iut.ac.ir)

2- MSc. Master graduate of Animal Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

3- Associated professor of Animal Science Department, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

4- Associated Professor of Pathology Department, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- PhD Student of Animal Physiology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran