

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات عصاره برگ گردو در پیشگیری از آسیب‌های مولکولی، بافتی و تغییرات آنزیمی القاء شده با ccl4 در کبد جوجه

نازیلا وحیدی ایریسفلی^۱، ویدا حجتی^{۱*}، محمد رضا یزدیان^۲، مرتضی زنده دل^۳، هومن شجیعی^۱

^۱ گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

^۲ گروه فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

^۳ گروه آموزشی علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

* Email: vida.hojati@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۳۱

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۰۹

چکیده

مقدمه: از آنجایی که مصرف افزودنی‌ها جهت افزایش راندمان تولید در پرورش جوجه‌ها دارای عوارض جانبی همچون آسیب کبدی می‌باشند، اهمیت استفاده از گیاهان دارویی از جمله برگ گردو به دلیل داشتن آنتی‌اکسیدان‌ها مورد توجه است. مواد و روش‌ها: ۵۰ عدد جوجه به ۳ گروه آزمایشی و ۲ گروه کنترل (سالم و سمی) تقسیم شدند. سه گروه آزمایشی از روز ۲۱ دوره به مدت ۱۴ روز به میزان ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم عصاره آبی برگ گردو به ازای هر کیلوگرم وزن بدن را دریافت کردند. در انتهای دوره گروه‌های تیماری و گروه کنترل سمی یک میلی لیتر تترا کلرید کربن را به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند و گروه کنترل سالم تزریقی نداشت. خونگیری و نمونه برداری بافت کبد انجام گرفت. نتایج: یافته‌ها نشان داد که دوزهای ۰/۵ و ۱ موجب تخریب سینوزوئید و بهم ریختگی سلولی در بافت کبد می‌گردد در صورتی که در دوز ۱/۵، عروق و مجاری صفراوی سالم بوده، سلول‌ها بطور منظم قرار گرفته و آنزیم‌های کبدی نسبت به دوزهای پایین‌تر و کنترل سمی کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان دادند ($P < 0.05$). کاهش بیان BID در دوز ۱ و ۱/۵ و افزایش بیان Bcl2 در دوز ۱ و ۱/۵ در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان داد. ($P < 0.001$) نتیجه‌گیری: عصاره برگ گردو در دوز بالا با افزایش ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 و کاهش بیان ژن آپوپتیک BID، مانع از ایجاد آپپتوز و آسیب بافتی و افزایش آنزیم‌های کبدی شده بود که نشان دهنده مقاومت کبد در برابر سمیت ccl4 می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: کبد، جوجه، پیشگیری، ccl4، گردو.

مقدمه

امروزه استفاده از افزودنی‌ها و محرک های رشد و سلامت جهت افزایش راندمان تولید و بهره‌وری بیشتر در پرورش جوجه‌های گوشتی امری اجتناب ناپذیر است. در این رابطه می‌توان به استفاده از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها اشاره کرد. از آنجایی که مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها دارای عوارض جانبی همچون مقاومت دارویی و ایجاد آلرژی می‌باشد، لذا اهمیت استفاده از گیاهان دارویی و فراورده‌های آن جهت تولید غذای سالم بیشتر مورد توجه قرار گرفته است [آندرولی و دیگران، ۲۰۰۷، ص ۲۳، بل و دیگران، ۲۰۰۱، ص ۱۲۱-۱۱۱].

کبد بزرگ‌ترین غدد داخلی بدن است که داروها، مواد شیمیایی، مواد سمی، ویروس‌ها و انگل‌ها می‌توانند صدمات شدیدی به آن وارد کنند و در بسیاری از موارد مکانیسم بیماری زایی مشخص نیست. نقش کبد در سم‌زدایی، سنتز پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، ذخیره گلیکوژن و بعضی از املاح و ویتامین‌ها به خوبی شناخته شده است [پاول و نش، ۱۹۹۷، ص ۷، لی و دیگران، ۲۰۰۳، ص ۳۹۹-۳۹۴].

مطالعات نشان داده است که تمایل زیاد به استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌ها به علت عوارض پائین‌تر این داروها نسبت به داروهای شیمیایی می‌باشد. برخی از این گیاهان به دلیل داشتن آنتی‌اکسیدان‌ها تاثیر مثبتی بر فعالیت سیستم‌های مختلف بدن دارند [کتل، ۱۹۹۶، ص ۴۳-۳۵، بیسیگناتو و دیگران، ۱۹۹۹، ص ۹۷۴-۹۷۱]، از جمله این گیاهان دارویی می‌توان به برگ گردو اشاره کرد. برگ گردو به طور گسترده در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مزمن استفاده می‌گردد. همچنین دارای خاصیت ضدسرطانی، تصفیه‌کنندگی خون و

آنتی‌اکسیدانی است. برگ گردو دارای دو گروه عمده ترکیب‌های فنلی کافئوتیلوینیک اسید و کوماروتیلوکوینیک اسید می‌باشد [آندرسون و دیگران، ۲۰۰۱، ص ۴۲-۳۷، ویلمس و دیگران، ۲۰۰۵، ص ۶۲-۵۵، پلزونت و دیگران، ۲۰۰۴، ص ۱۵-۱۱].

تتراکلرید کربن (CCl_4) حلالی است که در شیمی و صنعت کاربرد دارد و به‌عنوان ماده سمی برای کبد محسوب می‌گردد. در طی متابولیسم تتراکلرید کربن دو ترکیب سمی شامل تری کلرومتیل (CCl_3) و پراکسی تتراکلرومتیل ($OOCCL_3$) تولید می‌شوند که صدمات حاد کبدی از جمله سیروز و نکروز را منجر می‌شوند (جانباز و دیگران، ۲۰۰۲، ص ۶۴-۵۷، بناونته و دیگران، ۲۰۰۰، ص ۴۶۲-۴۵۷).

پروتئین BID از پروتئین‌های مسیر آپوپتوز است که در میان کنش با سایر پروتئین‌ها از جمله پروتئین BCL2 منجر به تشکیل منافذ اولیگومریک در غشای خارجی میتوکندری و آزاد شدن سیتوکروم C و سایر فاکتورهای پروآپوپتیک از میتوکندری می‌شود و در ادامه با فعال شدن آبشاری از آنزیم‌های کاسپاز منجر به مرگ سلول می‌شود. از این رو هرگونه عاملی که بتواند بر روی بیان این ژن تاثیرگذار باشد، می‌تواند مسیر آپوپتوز را افزایش و یا کاهش دهد [نیکلسون و تورنبری، ۲۰۰۳، ص ۵-۴، چن و دیگران، ۲۰۰۷، ص ۲۱-۱۴].

هدف از این مطالعه پیشگیری از آسیب‌های کبدی ناشی از آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر عوامل با استفاده از عصاره برگ گردو می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

جوجه‌ها و گروه‌بندی

۵۰ عدد جوجه گوشتی یک روزه سویه تجاری

اساس توصیه انجمن ملی تحقیقات (NRC, 1994) برای همه تیمارهای آزمایشی استفاده شد. جیره آغازین (از صفر تا ۲۱ روزگی) حاوی ۲۹۰۰ کیلو کالری انرژی قابل متابولیسم و ۲۰/۸۴ درصد پروتئین خام و جیره پایانی (از ۲۲ روزگی تا آخر دوره) حاوی ۳۰۰۰ کیلو کالری انرژی قابل متابولیسم و ۱۸/۷۵ درصد پروتئین خام بود.

تجویز عصاره آبی

بدین منظور روزانه ۱/۵، ۰ و ۱،۵ گرم عصاره گیاه ذکر شده به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در ۲ سی سی آب مقطر حل شده و سپس توسط سرنگ گاواژ مخصوص به صورت دهانی و به مدت ۱۴ روز (۲۲ روزگی تا ۳۵ روزگی) مستقیم به گروه‌های تیمار خوراندند.

تزریق تراکلرید کربن (Ccl4)

با توجه به ساختمان غیر قطبی Ccl4، این ماده به خوبی در انواع حلال‌های روغنی شامل روغن‌های معدنی و گیاهی حل می‌شود. لذا در این تحقیق از روغن زیتون به عنوان حلال Ccl4 استفاده شد. ۲ ساعت پس از تجویز آخرین روز عصاره در سن ۳۵ روزگی، یک سی سی تراکلرید کربن به نسبت ۱ : ۱ در روغن زیتون حل و به صورت درون صفاقی به جوجه‌ها تزریق گردید. نمونه‌های خونی به فاصله ۱، ۶، ۱۲، ۲۴ ساعت پس از تزریق Ccl4 از سیاهرگ بال جوجه‌ها گرفته شد.

تعیین ترکیبات بیوشیمیایی سرم خون

به منظور تعیین پارامترهای خونی در ۳۵ روزگی در ۳ نوبت و در ۳۶ روزگی در یک نوبت با استفاده

راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۵ قفس توزیع گشتند که شامل ۳ گروه آزمایشی و دو گروه کنترل (سالم و سمی) بودند. هر جوجه به‌عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد و در طول آزمایش روشنایی به صورت ۲۴ ساعته و آب و غذا به صورت آزاد در اختیار جوجه‌ها قرار داشت. درجه حرارت در هفته اول پرورش حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود و به تدریج هر ۳ روز ۱ درجه سانتی‌گراد کاهش داده می‌شود تا به دمای ۲۴-۲۳ درجه سانتی‌گراد رسید. تیمارهای آزمایشی از روز ۲۱ دوره آزمایش اعمال گردید که شامل گروه‌های آزمایشی که میزان ۰،۰/۵ و ۱/۵ گرم عصاره آبی برگ گردو به ازای هر کیلوگرم وزن بدن را به مدت ۱۴ روز توسط گاواژ دریافت کردند و دو گروه کنترل هیچ عصاره‌ای را دریافت نکردند. در انتهای دوره گروه‌های تیماری و گروه کنترل سمی یک میلی‌لیتر تراکلرید کربن را به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند و گروه کنترل سالم تزریقی نداشت.

برنامه واکسیناسیون

برنامه واکسیناسیون بر اساس استانداردهای جهانی طبق جدول ۱ انجام گرفت.

جدول ۱. برنامه واکسیناسیون بر اساس استانداردهای جهانی

سن (روز)	نوع واکسن	روش واکسیناسیون
۶	آنفلانزا- نیوکسل	ناحیه گردن
۶	برونشیت عفونی	قطره چشمی
۱۴	نیوکسل	آشامیدنی
۱۷	گامبورو	آشامیدنی

جیره‌های آزمایشی

در این طرح از ۲ جیره پایه (آغازین و پایانی) بر

بررسی کمی بیان ژن با استفاده از روش - Real Time PCR

برای بررسی بیان ژن های BID و BCL2 از بافت کبد جوجه استفاده شد. از هر گروه به مقدار 25 mg بافت کبد جدا و در ازت مایع هموژنیزه شد. سپس کل بافت با استفاده از کیت GeneAll و بر طبق پروتکل استخراج و با استفاده از اسپکتروفتومتر مقدار خلوص RNA کل و نسبت جذب نوری طول موج های 260 نانومتر به 280 نانومتر سنجیده شد. در این مطالعه از نمونه هایی که نسبت OD 260/280 نانومتر آنها بین 1/8 تا 2/2 بود برای سنتز cDNA استفاده شد. سپس مقدار یک میکروگرم از RNA با استفاده از کیت HyperScript™ RT premix (with Random hexamer) شرکت GeneAll طبق پروتکل به cDNA تبدیل شد. واکنش کلی در دمای 25 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه و سپس یک مرحله انکوباسیون در دمای 55 درجه سانتی گراد و 55 دقیقه و یک مرحله انکوباسیون در دمای 95 درجه و 5 دقیقه انجام شد. پس از سنتز cDNA، واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام شد.

واکنش Real Time PCR (SYBER Green)

تمامی واکنش ها در دستگاه Rotorgen 6000 (corbet) انجام شد. پرایمرهای ژن های BID، BCL2 و GAPDH (ژن رفرنس) در جدول ۲ آمده است.

از سرنگ 5 سی سی و سوزن شماره ۲۱ گرفته شد (در ۱، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق CCL4). سپس نمونه ها به مدت ۷ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم آن ها جدا گردیده و تا زمان آزمایشات مربوطه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. غلظت آنزیم های کبدی مانند SGOT, SGPT, آلکالین فسفات و GGT همچنین بیلی روبین تام و مستقیم توسط کیت های تجاری شرکت بیونیک و با استفاده از روش اسپکتروفتومتری طبق توصیه های شرکت سازنده با دستگاه BT1500 اندازه گیری شدند.

بررسی های هیستولوژیک نمونه های کبدی

پس از اتمام دوره، جوجه ها ذبح شده و نمونه برداری از بافت کبد به عمل آمد. نمونه های بافتی در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت و سپس در پارافین قالب گیری شدند. برش هایی از بلوک های پارافینی با استفاده از دستگاه میکروتوم (Slee mainz, model: Cut 4055) در مقاطع ۳-۵ میکرونی تهیه و پس از قرار دادن برش ها بر روی اسلایدهای شیشه ای، مراحل پارافین زدایی، آبگیری و نهایتا رنگ آمیزی توسط هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) انجام شد. بهترین برش ها برای عکسبرداری و آنالیز هیستولوژیک با درشت نمایی ۴۰۰X در نظر گرفته شدند.

جدول ۲- توالی، اندازه و دمای اتصال پرایمرهای استفاده شده

نام	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)	Annealing درجه سانتی گراد
BID	F: GCTATGAGTTACTGCGTTTCG R: CTCTTTGAACTCACAGCCAG	۱۸۲	۵۷
BCL2	F: ATTTTATTACCGTTGGCTG R: CTGCGAGAGTTTATAGTGGA	۱۶۷	۵۶
GAPDH	F: GCAGGAACACTATAAAGGCG R: CCCTTGAAGTGTCCTGTG	۱۸۹	۵۵

منحنی استاندارد و تجزیه و تحلیل منحنی ذوب

پس از ترسیم منحنی استاندارد برای ژن مرجع (GAPDH) و ژن‌های Bcl2 و BID شیب منحنی استاندارد برای هر کدام از این ژن‌ها به ترتیب -3/325، -3/120 و -3/176 محاسبه شد. میزان بازده واکنش با استفاده از شیب منحنی استاندارد برای هر یک از این ژن‌ها به ترتیب ۱۰۳ درصد، ۹۸ درصد و ۱۰۴ درصد به دست آمد. همچنین نمودارهای به دست آمده از منحنی ذوب تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن پرایمرها و عدم تکثیر غیراختصاصی برای هر ژن را نشان داد.

نتایج:

نتایج مربوط به تغییرات بافت‌های کبدی:

در نتایج به دست آمده از بافت‌شناسی نشان داده شد که در گروه شاهد که هیچگونه عصاره‌ای دریافت نکرده بودند، سلول‌های کبدی کاملاً سالم و مجاری صفراوی و عروق خونی بطور طبیعی قرار گرفته بودند. در گروه CCL4 که هیچ عصاره‌ای دریافت نکرده بودند ولی تزریق اسید را داشتند، بهم ریختگی سلولی و وجود سلول در مجاری صفراوی مشاهده گردید. همچنین در گروه‌هایی که عصاره گردو را به میزان ۰/۵ و ۱ دریافت کرده بودند، تخریب سینوزوئیدی و بهم ریختگی سلولی مشاهده شد در صورتی‌که در دوز ۱/۵ عروق و مجاری صفراوی سالم و سلول‌ها بطور مرتب دیده شدند.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری تست‌های عملکردی

خونی

گروه‌های نمایش داده شده بر روی نمودار به ترتیب از شماره ۱ تا ۳، گروه‌های عصاره برگ گردو

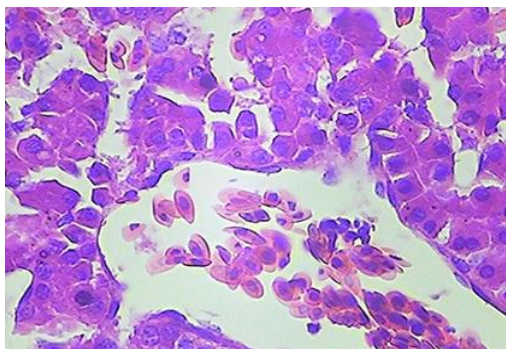
برنامه زمانی - دمایی دستگاه در سه مرحله تنظیم گردید:

مرحله اول: واسرشتگی (denaturation) ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ دقیقه. مرحله دوم: جفت شدن (annealing) ۳۵ ثانیه در دماهای مختلف اتصال که در جدول ۲ آمده است. مرحله سوم: سنتز (extension) ۲۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

برای تایید تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیراختصاصی و جفت شدن پرایمرها در مطالعات ابتدایی از الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد و به صورت روتین از منحنی ذوب (Melting curve) استفاده شد. برای ترسیم منحنی ذوب، دما در هر تکرار از ۵۰ تا ۹۹ درجه سانتی‌گراد هر ۵ ثانیه یک درجه افزایش یافت.

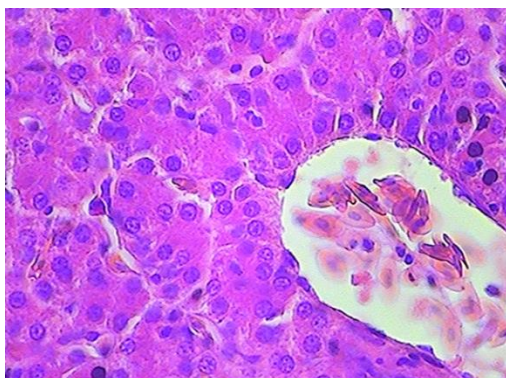
رسم منحنی استاندارد

یکی از cDNAهای کنترل دارای غلظت مناسب، انتخاب شد و سپس رقت‌های متوالی از آن را برای رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. منحنی استاندارد براساس لگاریتم غلظت cDNA (محور افقی) و سیکل آستانه (Ct1) (محور عمودی) برای هر ژن ترسیم شد. میزان بازده PCR (PCR efficiency) براساس منحنی استاندارد برای هر ژن تعیین گردید. از نمونه فاقد cDNA الگو به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای هر واکنش PCR یک منحنی تکثیر (Amplification Curve) رسم شد. تجزیه و تحلیل براساس مقایسه سیکل‌های آستانه (Ct Value) نمونه‌های مختلف و گروه کنترل صورت گرفت. بررسی بیان نسبی ژن‌ها براساس مقایسه سیکل‌های آستانه نمونه‌های هر سه گروه با روش (Livak) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد.



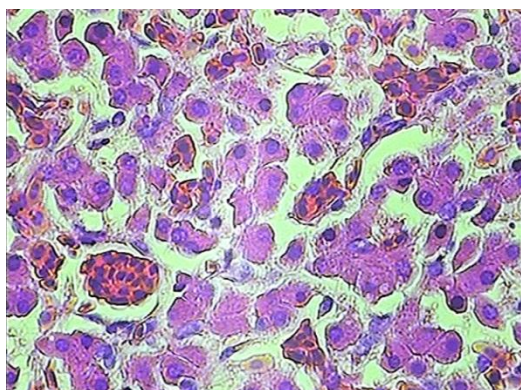
شکل ۳. فتو میکروگراف از کبد جوجه در گروه گردو ۱:

تخریب سلول ها و نظم و ترتیب سینوزوئیدها و بهم ریختگی سلول ها مشاهده می شود. رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین، بزرگنمایی ۴۰۰



شکل ۴. فتو میکروگراف از کبد جوجه در گروه گردو ۱.۵: رگ

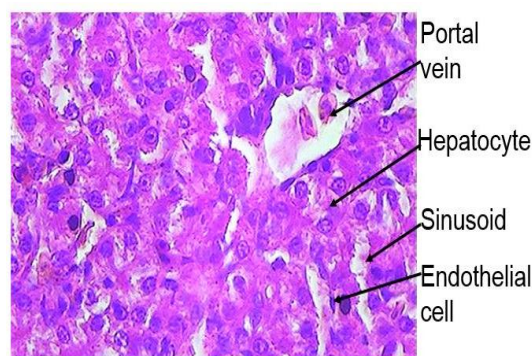
خونی سالم، سلول های اندوتلیال سالم، عروق مجاری صفراوی بدون تغییر هستند. رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین، بزرگنمایی ۴۰۰



شکل ۵. فتو میکروگراف از کبد جوجه در گروه CCL4: بهم

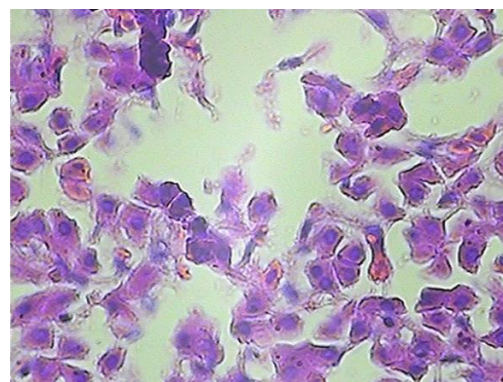
ریختگی شدید سلول های کبدی و همچنین وجود سلول در مجرای صفراوی دیده می شوند. رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین، بزرگنمایی ۴۰۰

گرفته به میزان ۰،۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در کیلوگرم وزن و گروه ۴ و ۵ بترتیب گروه های کنترل سمی و کنترل سالم می باشند. الگوهای مشخص شده در نمودارها نشان دهنده ساعات های تزریق می باشند. بررسی تحلیل داده ها، ۲۴ ساعت بعد از تزریق پس از مشاهده بیشترین میزان اثرگذاری ccl4، انجام گرفت.



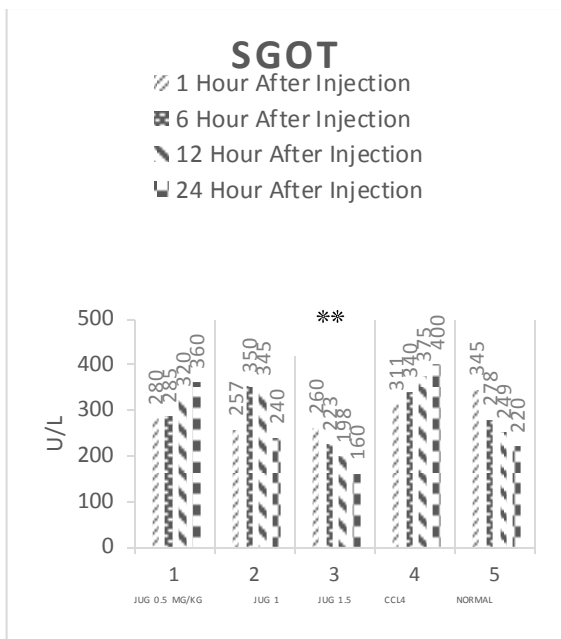
شکل ۱. فتو میکروگراف از کبد جوجه در گروه شاهد:

ریدیف های سلول های کبدی سالم، مجاری صفراوی بدون تخریب، سینوزوئیدها و عروق خونی بدون تغییر هستند. رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین، بزرگنمایی ۴۰۰

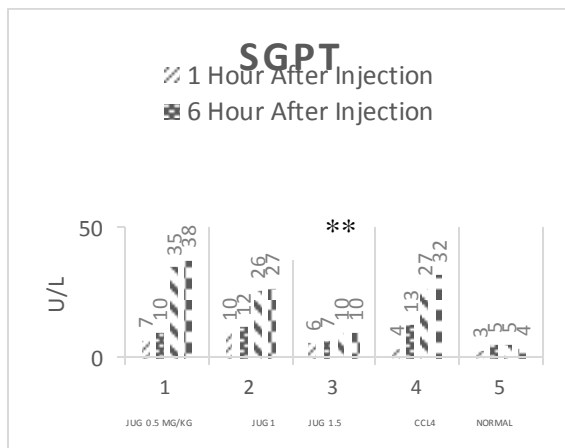


شکل ۲. فتو میکروگراف از کبد جوجه در گروه گردو ۰،۵:

ارتباط سلول ها بهم خورده، سینوزوئیدها کلا تخریب شده، رگ های خونی تغییر چندانی ندارد، بافت اندوتلیال برخی عروق تخریب شده، مجاری صفراوی محدود شده و همچنین مجاری صفراوی بزرگ و تخریب شده است. رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین، بزرگنمایی ۴۰۰



نمودار ۱) مقایسه میانگین SGOT در گروه‌های مختلف. گروه‌ها از ۱ تا ۳ به ترتیب: دریافت کننده عصاره برگ گردو به میزان ۰/۵، ۱/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن و گروه‌های ۴ و ۵، بترتیب کنترل سمی و کنترل سالم می‌باشند. این آنزیم در گروه عصاره برگ گردو به میزان ۱/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن، کاهش معناداری را نسبت به کنترل سمی نشان داد (**: P<0/05).



نمودار ۲) مقایسه میانگین SGPT در گروه‌های مختلف. گروه‌ها از ۱ تا ۳ به ترتیب: دریافت کننده عصاره برگ گردو به میزان ۰/۵، ۱/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن و گروه‌های ۴ و ۵، بترتیب کنترل سمی و کنترل سالم می‌باشند. گروه دریافت کننده عصاره برگ گردو به میزان ۱/۵

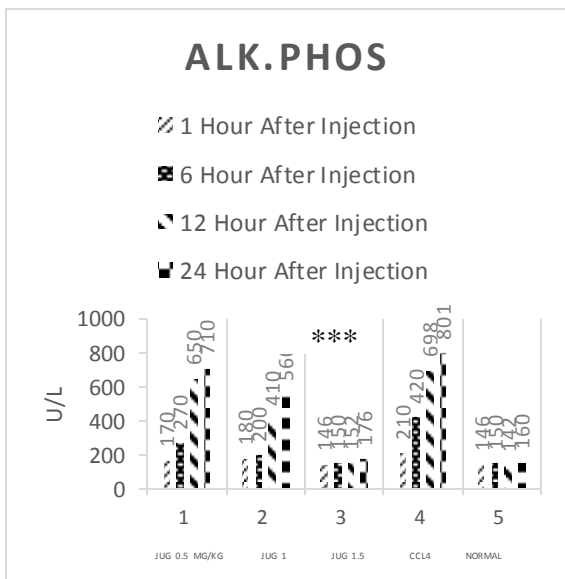
نتایج مربوط به آنزیم SGOT و SGPT:

در اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی، میزان آنزیم SGOT در گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. میزان این آنزیم در گروهی که برگ گردو را با دوز ۰/۵ mg/kg استفاده کرده بودند با افزایش زمان افزایش یافته و بیشترین تاثیر عصاره مربوط به بالاترین زمان ممکن یعنی ۲۴ ساعت پس از تزریق عصاره مشاهده گردید. بنابر این می‌توان گفت که عصاره با این دوز کاملاً بی‌تاثیر بوده است. دوز ۱ mg/kg از عصاره برگ گردو نیز افزایش تاثیر عصاره را در این گروه، ۶ و ۱۲ ساعت پس از تجویز نشان داد در صورتی‌که ۲۴ ساعت پس از تزریق عصاره تا حدی از بالا رفتن آنزیم جلوگیری کرده بود. در گروهی که برگ گردو را با دوز ۱/۵mg/kg دریافت کرده بودند، میزان آنزیم SGOT در هر ۴ زمان ممکن پس از تزریق (۱، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت) کاهش قابل ملاحظه ای را نسبت به گروه کنترل سمی نشان داد و تا حدودی به گروه کنترل سالم نزدیک شد. این امر می‌تواند نشانگر اثر بخشی معنا دار عصاره باشد (P<0/05).

با توجه به بررسی‌های به عمل آمده در گروه‌های مختلف، بیشترین تاثیر در میزان آنزیم SGPT در گروهی که عصاره برگ گردو به میزان ۰/۵ mg/kg دریافت کرده بودند، در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت دیده شد. تاثیر دوز ۱ mg/kg از عصاره برگ گردو نیز همانند دوز قبل بوده با این تفاوت که میزان این افزایش کمتر گزارش دیده شد. در دوز ۱/۵ mg/kg میزان آنزیم ها در ساعات مختلف کاهش پیدا کرده و تا حدودی با گروه کنترل همسان شده بودند که نشان دهنده اثر بخشی معنا دار عصاره است (P<0/05).

در صورتیکه میزان آن در زمان های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق ccl4 نسبت به گروه کنترل سالم افزایش چشمگیری را نشان داد. میزان این آنزیم در گروهی که عصاره برگ گردو را با دوز ۱ mg/kg دریافت کرده بودند، یک ساعت پس از تزریق ccl4، هیچ گونه تغییری را نسبت به گروه کنترل نشان نداد در صورتی که در ساعات بعدی این میزان افزایش یافت. در گروهی که این عصاره را با بالاترین دوز ممکن یعنی ۱/۵ mg/kg دریافت کرده اند، میزان آنزیم بیلیروبین کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل نشان داد (P<0/05).

اندازه گیری آنزیم بیلی روبین دایرکت نشان داد که میزان این آنزیم در هیچ یک از گروهها تغییر قابل ملاحظه ای نداشته است.



نمودار ۳) مقایسه میانگین ALK.Ph در گروههای مختلف. گروهها از ۱ تا ۳ به ترتیب: دریافت کننده عصاره برگ گردو به میزان ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن و گروههای ۴ و ۵، بترتیب کنترل سمی و کنترل سالم می باشند. گروه عصاره برگ گردو به میزان ۱/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن، کاهش معناداری را نسبت به گروه کنترل سمی نشان می دهد (***:P<0/001).

میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن، کاهش معناداری را نسبت به کنترل سمی نشان می دهد (***:P<0/05).

نتایج مربوط به آنزیم Alkaline phosphatase و Gamma GT

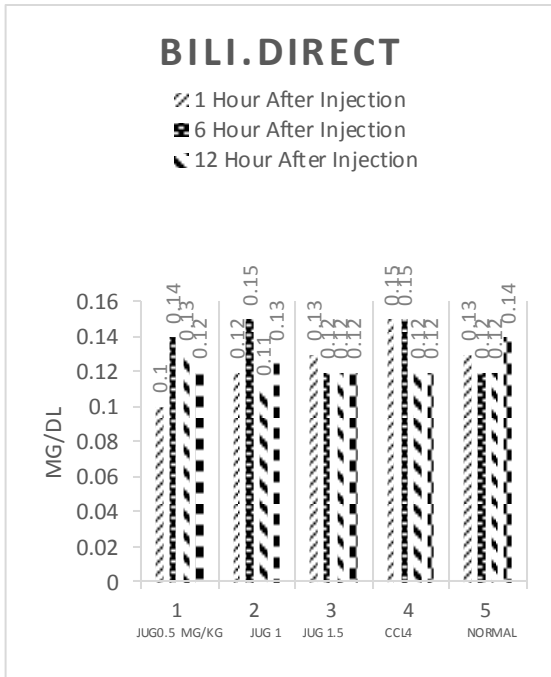
نتایج بدست آمده از بررسی میزان این آنزیم در گروههای مختلف نشان داد که عصاره برگ گردو در گروهی که آن را به میزان ۰/۵ و ۱ mg/kg دریافت کرده بودند، تاثیر چندانی بر سمیت ccl4 تزریقی نداشته است. در صورتی که در گروهی که عصاره برگ گردو را با دوز ۱/۵ mg/kg دریافت کرده بودند، میزان Alkaline phosphatase به حالت نرمال رسیده و کاهش قابل قبولی را نسبت به دو گروه قبل نشان داده است. (P<0/001).

نتایج بدست آمده از آنزیم Gamma GT در گروههای مختلف نشان داد که این آنزیم در گروههای با دوز ۰/۵ و ۱ mg/kg عصاره برگ گردو، به بالاترین میزان خود بعد از ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق ccl4 رسیده است. در صورتی که میزان این آنزیم در گروهی که عصاره را با دوز ۱/۵ mg/kg دریافت کرده بودند، تغییرات چندانی را نسبت به گروه کنترل سالم نشان نداد ولی نسبت به گروه کنترل سمی کاهش معناداری داشته است (P<0/05).

نتایج مربوط به آنزیم Bilirubin Direct و Bilirubin Total

نتایج بدست آمده از اندازه گیری آنزیم بیلی روبین توتال در گروههای مختلف نشان داد که میزان این آنزیم یک ساعت پس از تزریق ccl4 در گروهی که عصاره برگ گردو را به میزان ۰/۵ mg/kg دریافت کرده اند، هیچ گونه تغییری نسبت به گروه کنترل نداشته

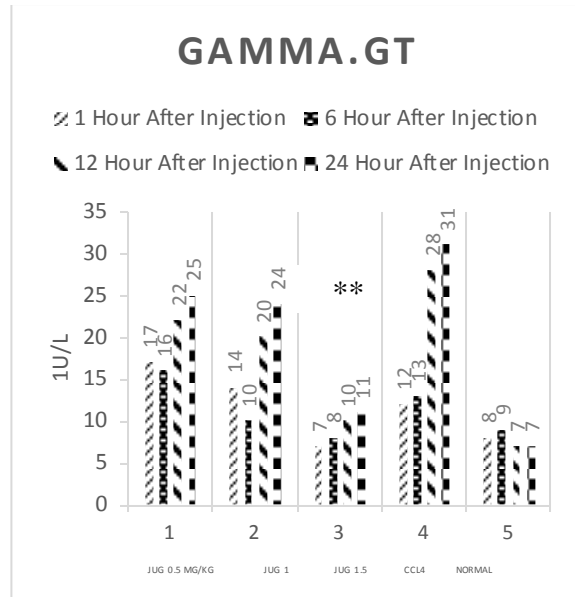
وزن، کاهش معناداری را نسبت به کنترل سمی نشان می دهد (**:P<0/05).



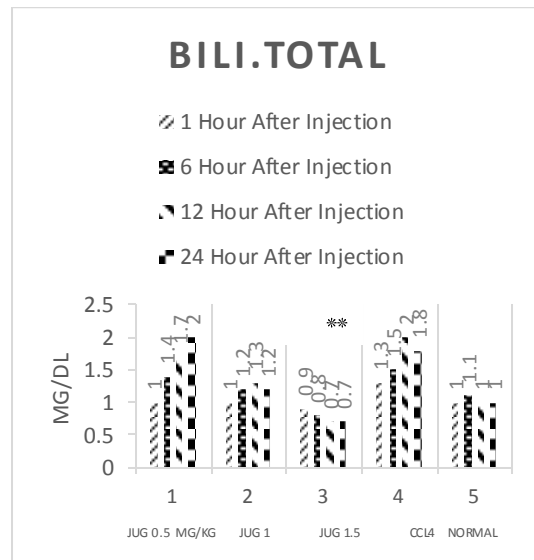
نمودار ۶) مقایسه میانگین B.D در گروه های مختلف. گروه ها از ۱ تا ۳ به ترتیب: دریافت کننده عصاره برگ گردو به میزان ۰/۵، ۱/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن و گروه های ۴ و ۵، بترتیب کنترل سمی و کنترل سالم می باشند میزان این آنزیم در هیچ یک از گروه ها تغییر معنادار پیدا نکرد.

نتایج بخش مولکولی:

نتایج بدست آمده از میزان بیان ژن BID در گروه های آزمایشی نشان داد که بیان این ژن در مقایسه با گروه کنترل سمی با افزایش دوز عصاره برگ گردو کاهش معناداری پیدا کرده بود بطوری که این تفاوت در دوزهای ۱ و ۱/۵ در مقایسه با گروه کنترل سمی معنی دار بود (P<0/001) همچنین سطح بیان ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl2 نیز در مقایسه با گروه کنترل سمی با افزایش دوز عصاره برگ گردو افزایش پیدا کرده بود بطوری که این تفاوت در دوز ۱ و ۱/۵ با گروه کنترل سمی معنی دار بود (P<0/001). بنابر این می توان نتیجه



نمودار ۴) مقایسه میانگین GGT در گروه های مختلف. گروه ها از ۱ تا ۳ به ترتیب: دریافت کننده عصاره برگ گردو به میزان ۰/۵، ۱/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن و گروه های ۴ و ۵، بترتیب کنترل سمی و کنترل سالم می باشند. گروه عصاره برگ گردو به میزان ۱/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن، کاهش معناداری را نسبت به گروه کنترل سمی نشان می دهد (**:P<0/05).



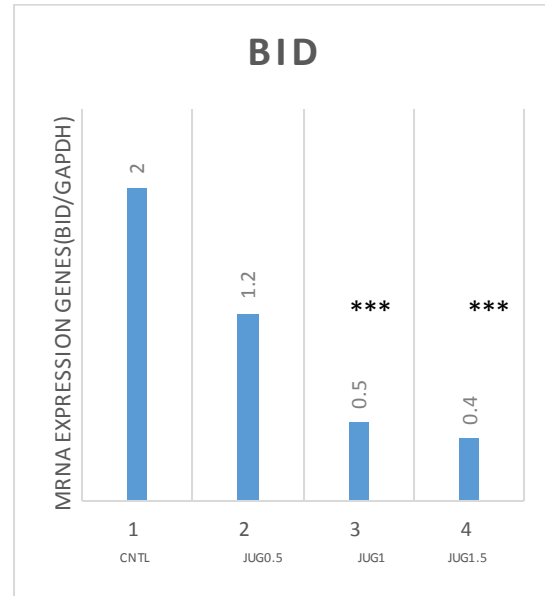
نمودار ۵) مقایسه میانگین B.T در گروه های مختلف. گروه ها از ۱ تا ۳ به ترتیب: دریافت کننده عصاره برگ گردو به میزان ۰/۵، ۱/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن و گروه های ۴ و ۵، بترتیب کنترل سمی و کنترل سالم می باشند. گروه عصاره برگ گردو به میزان ۱/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم

نمودار ۸) نشان دهنده بیان ژن BCL2 در گروه های آزمایشی کنترل سمی، دوز های ۰/۵، ۱ و ۱،۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن عصاره برگ گردو می باشد. بیان ژن BCL2 در گروه های با دوز ۱ و ۱/۵ افزایش معناداری را نسبت به گروه کنترل سمی نشان داد (***:P<0/001).

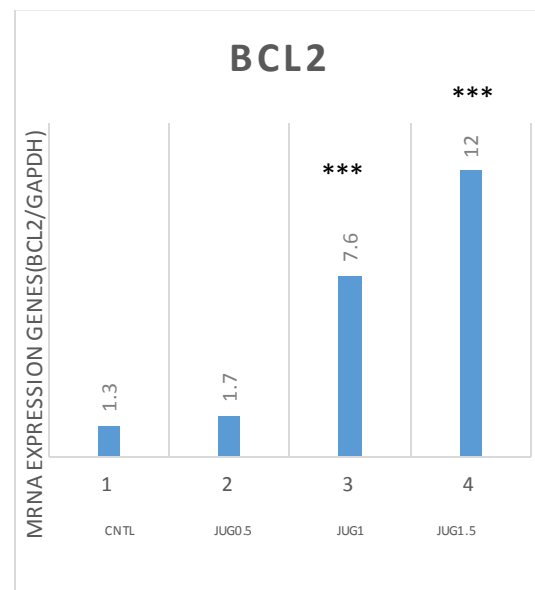
بحث:

در مسمومیت با تتراکلرید کربن، چربی از بافت چربی محیطی به کبد و کلیه ها انتقال یافته و منجر به تجمع چربی در آن ها می گردد که در نهایت منجر به آسیب های بافتی می شود [کمپیل و کول، ۱۹۸۶]. افزایش فعالیت آنزیم های کبدی در سرم خون از شاخص های اصلی آسیب کبدی ناشی از تاثیر توکسین ها می باشد [هتروگ و دیگران، ۱۹۹۸، ص ۷۱-۷۳]. Ccl₄ پس از ورود به بدن توسط سیستم آنزیمی NADPH- سیتوکروم P-450 موجود در رتیلولوم اندوپلاسمیک سلول های کبدی به تری کلرومتیل (Ccl₃) که یک رادیکال آزاد بسیار واکنش پذیر است تبدیل می شود. سپس این رادیکال آزاد با اکسیژن واکنش داده و به پراکسی کلرو متیل (Ccl₃OO) تبدیل می شود که به غشا رتیلولوم اندوپلاسمیک حمله کرده و سبب پراکسیداسیون لیپید، از دست دادن کلسیم سلولی، کاهش سنتز پروتئین، افزایش آنزیم های کبدی و در نهایت منجر به تخریب سلول های کبدی می گردد [کلاسون، ۱۹۹۸، ص ۱۱۲-۱۰۴، پانوسکا، ۲۰۰۷، ص ۲۴۸-۲۴۱]. مطالعات نشان داده است که تجویز عصاره کنگر فرنگی به موش ها سبب کاهش معنی داری در میزان آنزیم های کبدی در مقایسه با گروه مسموم شده با تتراکلرید کربن می گردد [فلاح و دیگران، ۲۰۱۱، ص ۴۰-۳۳]. مصرف عصاره اتانولی کنگر فرنگی در موش هایی که با تترا کلرید کربن مسموم شده بودند از

گرفت که دوزهای ۱ و ۱/۵ عصاره برگ گردو قادر به افزایش بیان ژن آنتی آپوپتوتیک BCL2 و از طرفی کاهش بیان ژن BID در مقایسه با گروه کنترل سمی می باشد.



نمودار ۷) نشان دهنده بیان ژن BID در گروه های آزمایشی کنترل سمی، دوزهای ۰/۵، ۱ و ۱،۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن عصاره برگ گردو می باشد. بیان ژن BID در گروه های با دوز ۱ و ۱/۵ کاهش معناداری را نسبت به گروه کنترل سمی نشان داد (***:P<0/001).



اسید و کوماروئیلکوبینیک اسید می‌باشد. مهم‌ترین فلاونوئیدهای موجود در برگ گردو ژوگلون، کوئرستین گالاکتوزید، مشتق‌های کوئرستین پنتوزید، کوئرستین آرابینوزید، کوئرستین گزیلوزید، کوئرستین رامنوزید و مشتق‌های کامپفرول پنتوزید می‌باشند [آندرسون و دیگران، ۲۰۰۱، ص ۴۲-۳۷، ویلمس و دیگران، ۲۰۰۵، ص ۶۲-۵۵، پلزوتی و دیگران، ۲۰۰۴، ص ۱۵-۱۱].

نتیجه‌گیری کلی:

نتایج بدست آمده نشان داد که پروتئین‌های خانواده Bcl-2 یکپارچگی غشاء خارجی میتوکندری را حفظ کرده و آزاد شدن سیتوکروم C به درون سیتوزول و در نتیجه فعال شدن، caspase-3 را تنظیم می‌کنند. در مطالعه حاضر نیز با افزایش بیان ژن BCL2 و از طرفی کاهش بیان ژن BID بعد از تزریق دوزهای مختلف عصاره برگ گردو ناپایداری غشاء میتوکندری کاهش یافته و در نتیجه نفوذپذیری آن نسبت به سیتوکروم C کم می‌شود. لذا میتوان نتیجه گرفت که برگ‌های گردو باعث بهبود غشاء میتوکندری و در نتیجه مانع از ایجاد آپوپتوز از طریق مسیر داخلی در کبد جوجه می‌گردد. هرچند که مطالعات بعدی برای یافتن سایر مسیرهایی که برگ‌های گردودر مکانیسم آنها دخیل می‌باشند؛ مورد نیاز است. عصاره برگ گردو مانع از بهم ریختگی سلول‌های کبدی، تخریب سینوزوئیدها، رگ‌های خونی و افزایش آنزیم‌های کبدی و در نتیجه مقاومت کبد در برابر سمیت CCl_4 می‌گردد. با توجه به در دسترس بودن و کم هزینه بودن این گیاه، استفاده از برگ گردو در جیره غذایی جوجه‌ها برای جلوگیری از آسیب‌های کبدی توصیه می‌شود. هم‌چنین با مطالعات بعدی می‌توان مواد موثر آنرا استخراج و مورد مصرف حیوانی و انسانی قرار داد.

افزایش آنزیم‌های کبدی ALT و AST در سرم خون جلوگیری می‌کند [آکتای و دیگران، ۲۰۰۰، ص ۱۲۹-۱۲۱]. استفاده از عصاره‌های گیاهی در تغذیه طیور سبب تحریک سیستم‌های گوارشی، بهبود نقش کبد و افزایش آنزیم‌های گوارشی لوزالمعده می‌گردد [مادرید و دیگران، ۲۰۰۳، ص ۱۸۷]. اثر مهارکنندگی عصاره‌ی گیاه خرفه در واکنش‌های پراکسیداسیون لیپیدی و نیتریک اکسید در کبد، کلیه و بیضه موش صحرائی بالغ نر نژاد ویستار ثابت شده است. این تاثیر از طریق فلاونوئیدهایی است که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. در این تحقیق گیاهان مورد بررسی نیز حاوی فلاونوئید بوده و با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود قادر به کاهش فعالیت آنزیم‌های کبدی بودند [دخیل و احمد، ۲۰۱۰، ص ۱۵۹۳-۱۵۸۹]. در سیستم‌های پزشکی هند در درمان بیماری‌های کبدی از اثر متانولی دانه‌های کرفس و هیگروفیلیا استفاده کرده و اثر کاهش آنزیم‌های کبدی را که در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدهای موجود در این دو گیاه می‌باشد، ثابت نمودند [سینک و هند، ۱۹۹۵، ص ۲۶-۱۹]. مواد مؤثره گیاهان شوید و کرفس احتمالاً با اثر آنتی‌اکسیدانی یا کاهش تولید رادیکال‌های آزاد سبب تثبیت غشاء سلول‌های کبدی و کاهش آزادسازی آنزیم به خون می‌گردد [ظاهر و دیگران، ۲۰۰۷، ص ۱۲-۸]. مطالعات متعدد نشان داده زمانی که تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها بهم می‌خورد، استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد و باعث مرگ سلولی می‌شود در نتیجه هر عاملی که بتواند موجب افزایش آنتی‌اکسیدان در بدن شود قادر است از این فرآیند جلوگیری کند [دالتون و دیگران، ۱۹۹۹، ص ۱۰۱-۶۷، اسکاندالیوس، ۲۰۰۶]. برگ گردو دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و دارای دو گروه عمده ترکیب‌های فنلی کافئوتیلوبینیک

منابع:

- quercetin. European Journal of Clinical Nutrition. 50: 63-71
14. Janbaz K.H, Saeed S, Gilani A.H. Protective effect of rutin on Paracetamol and CCl4-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia* 2002; 73: 557-64.
 15. Lee, K. W., H. Everts, H. J. Kappert, K. H. Yeom, and A. C. Beynen. 2003. Dietary carvacrol lowers body weight gain but improves feed conversion in female broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.* 12: 394-399.
 16. Madrid, J, Hernandez, F. Garcia, V. Orengo, J. Megias, M. D and Sevilla, V. 2003. Effects of plant extracts on ileal apparent digestibility and carcass yield in broilers at level of farm. In Proc. 14th European Symp. Poult. Nutr. Aug. Lill. Nor. PP. 187.
 17. Mohamed A.Dkhil, Ahmed E. .2011. Antioxidant effect of purslane and its mechanism of action, *journal of medical plants Reaserch.*5 (9). pp: 1589-1593.
 18. Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis. Life and death decisions. *Science.* 2003 Jan; 299(5604):214-5.
 19. Panovska, T. K., Kulevanova, S., Gjorgoski, I., Bogdanova, M., and Petrushevska, G. 2007. Hepatoprotective effect of the ethyl acetate extract of *Teucrium polium* L. against carbontetrachloride-induced hepatic injury in rats. *Acta Pharmaceutica.* 57: 241-248.
 20. Paul, S. & D. C. Nash. 1997. Herbal health report: Olive leaf extract regains interest as a superb anti- microbial agent. *Dynamic Chiropractic*, 15(15) 1-7.
 21. Polzonetti, V., D. Egidi, & A. Vita. 2004. Involvement of oleuropein in (some) digestive metabolic pathways. *Food Chemistry*, 88 (1):11- 15
 22. Scandalios JG. 2006. Genomic responses to oxidative stress. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine.*
 23. Singh A, Hand ass. 1995. Hepatoprotective activity of *Apium graveolens* and *Hygrophila auriculata* against paracetamol and thioacetamide intoxication in rats. University Institute of Pharmaceutical Sciences, Panjab University, Chandigarh, India. *Journal of ethnopharmacology* , pg 119-26.
 24. Taher M, Ghannadi A, Karmiyan R. 2007. Effects of volatile oil extracts of *Anethum graveolens* L. and *Apium graveolens* L. seeds on activity of liver enzymes in rat. *J Qazvin Univ Med Sci.*; 11 (2):8-12.
 25. Wilms LC, Hollman PC, Boots AW, Kleinjans JC. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutat Res* 2005; 582: 155-62.
 1. Aktay, G, Deliorman, D., Ergun, F., Yesiladan, E., and Cevik, C. 2000. Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury. *Ethnopharmacology.* 73: 121-129.
 2. Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM. Walnut polyphenolics inhibit *in vitro* human plasma and LDL oxidation. *J Nutr* 2001; 131: 2837-42.
 3. Androli, T., Carpenter, C., Griggs, R., Benjamin, I. 2007. Diseases of the Liver and Biliary System. In: Cecil's Essentials of Medicine. 7th Ed. USA: WB Saunders Company. 23.
 4. Benavente-Garcia, O., J. Castillo, J. Lorente, A. Ortuno, & J. Del Rio, 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68:457-462.
 5. Bisignano, G., A. Tomaino, R. Lo Cascio, G. Crisafi, N. Eccella, & A. Saija. 1999. on the *in vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxy tyrosol. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8): 971-974.
 6. Boll, M., Weber, L. W. D., Becker, L. E., and Stampfl, A. 2001. Pathogenesis of carbon tetrachloride in hepatocyte injury. Bioactivation of CCl4 by cytochrome P450 and effects on lipid homeostasis. *Z Naturforsch.* 56: 111.
 7. Campbell, T. W., and Coles, E. H. 1986. Avian Clinical Pathology. In: *Veterinary Clinical Pathology.* Edited by E.H. Coles. 4th Ed. W. B. Saunders Co. Philadelphia.
 8. Chen B, Peng X, Pentassuglia L, Lim CC, Sawyer DB. Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol.* 2007; 7 (2):114-21.
 9. Clawson, G. A. 1998. Mechanism of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pathology and Immunopathology Research.* 8: 104-112.
 10. Cotellet, N. 1996. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine.* 20: 35-43.
 11. Dalton TP, Shertzer. HG, Puga. A. April 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* Vol. 39:67-101.
 12. Fallah Huseini, H., Zareei Mahmoudabady, A., Ziai, S. A., Mehrazma, M., Alavian, S. M., Mehdizadeh, M., and Radjabian, T. 2011. The effects of *Cynara scolymus* L. leaf and *Cichorium intybus* L. root extracts on carbon tetrachloride induced liver toxicity in rats. *Medicinal Plants.* 10: 33-40.
 13. Hetrog, M. G. L., and Hollmann, P. C. H. 1998. Potential health effects of the dietary flavonol

The Effects of Juglans Leaf Extract on Prevention of Molecular and Tissue Damages and Enzymatic changes in Chicken Liver Induced by CCl₄

Vahidi-Eyrisofla N.¹, Hojati V.^{1*}, Yazdian M. R.², Zendehdel M.³, Shajiee H.¹

¹ Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

² Department of Physiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

³ Department of Basic sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

* Email: vida.hojati@gmail.com

Received: 30 June 2018

Accepted: 22 September 2018

Abstract

Today, the use of additives such as antibiotics and growth hormone and etc which increasing production efficiency in breeding broiler chickens is inevitable and has side effects such as liver damage. Oxidative stress occurs due to imbalance between oxidant and antioxidants. Studies have shown juglans leaves have an antioxidant effect on free radicals. The aim of the present study is to evaluate the possible effect of juglans leaf extract on CCl₄- induced liver damages (molecular and tissue) and enzymes changes in chicken. 50 chickens were used and classified in 5. Treatment groups received 0.5, 1 and 1.5 mg/kg of juglans leaf extract from day 21 of the experiment. Healthy and poisoned groups were without any extracts receive. On the 35th day of the experiment, 1 cc of CCl₄ injected intra peritoneally into the poison control and experimental groups. Blood and liver tissue sampling was done. At high doses of juglans leaf extract, the histopathology results showed that the cells and vessels were regularly curable and sinusoids were healthy. Expression of BCL2 increased and BID expression reduced. Enzymatic tests including SGOT, SGPT, ALK.PHOS, GGT showed reducing in compare with control (P<0/05). It showed that juglans leaves extract boosts the BCL2 (anti-apoptotic gene) and reduces BID (apoptosis gene) in liver of chicken (P<0/001). It prevents the liver cells from disintegrating and destroys sinusoids and liver blood vessels. The high doses of juglans leaf extract cause liver resistance to ccl4 toxicity in chicken.

Keywords: Juglans, ccl4, liver, chicken, prevention.