

مطالعه هیستوپاتولوژی تاثیر کروسین در پیشگیری از بیماری کبد چرب در موش‌های صحرایی تغذیه شده با جیره پر چرب

داریوش مهاجری^{۱*}، علی رضایی^۲، غفور موسوی^۲، جعفر رحمانی^۲

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، تبریز، ایران

۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: mohajeri@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۰/۷/۴، پذیرش نهایی: ۹۰/۱۰/۱۰)

چکیده

بیماری کبد چرب غیر الکلی امروزه به‌عنوان شایع‌ترین بیماری کبد شناخته شده است و احتمال دارد از لحاظ موضوع سلامت به یک معضل عمومی مهم تبدیل شود. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثرات محافظتی کروسین، در برابر کبد چرب ناشی از رژیم غذایی پرچرب در مدل موش صحرایی می‌باشد. به این منظور، موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در گروه‌های آزمایشی متفاوت، توسط رژیم غذایی شاهد، رژیم غذایی صرفاً پرچرب و رژیم غذایی پرچرب به علاوه گاواژ کروسین در دزهای مختلف (۲۵ mg kg⁻¹/day، ۵۰ و ۱۰۰) تیمار شدند. در پایان دوره آزمایش، برای ارزیابی هیستوپاتولوژی کبد، هم‌زمان همه موش‌ها با ایجاد جابجایی در مهره‌های گردن به راحتی کشته شدند. نمونه‌های بافتی اخذ شده از کبد تمامی موش‌ها در فرمالین بافری ۱۰ درصد پایدار گردید. از نمونه‌های فوق با استفاده از شیوه‌های رایج پاساژ بافت و تهیه مقطع، برش‌های هیستولوژی به ضخامت ۵ میکرون تهیه گردید. سطوح سرمی آمینوترانسفرازها (ALT و AST) جهت ارزیابی آسیب کبد و آلکالین فسفاتاز (ALP) و بیلی‌روبین تام (TB) برای ارزیابی عملکرد صفراوی کبد مورد سنجش قرار گرفت. آلومین (Alb) و پروتئین تام (TP) نیز برای سنجش عملکرد ساخت‌وساز کبد اندازه‌گیری گردید. آسیب‌شناسی بافتی کبد، حاکی از بروز تغییر چربی در گروه موش‌های تغذیه شده با جیره پرچرب بود. کروسین به صورت وابسته به دز باعث کاهش تجمع چربی در هپاتوسیت‌ها گردید. در موش‌های گروه تغذیه با جیره پرچرب، سطوح سرمی آنزیم‌های ALT، AST و ALP و TB در مقایسه با گروه شاهد سالم، به‌طور معنی‌داری ($p < 0/01$) افزایش و میزان TP و Alb به‌طور معنی‌داری ($p < 0/01$) کاهش یافت. دزهای بالا (۱۰۰ mg/kg) و متوسط کروسین (۵۰ mg/kg)، سطوح افزایش یافته سرمی مارکرهای آسیب کبد در اثر رژیم پرچرب را به‌طور معنی‌دار (به ترتیب $p < 0/01$ و $p < 0/05$) کاهش و مقادیر کاهش یافته TP و Alb در اثر رژیم پرچرب را به‌طور معنی‌دار (به ترتیب $p < 0/01$ و $p < 0/05$) افزایش دادند. دز پائین کروسین (۲۵ mg/kg) نتوانست تغییر معنی‌داری در پارامترهای مذکور ایجاد کند. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که کروسین از بروز کبد چرب در موش‌های صحرایی تغذیه شده با جیره پرچرب پیشگیری می‌کند.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، دوره ۵، شماره ۳، پیاپی ۱۹، صفحات: ۱۳۰۴-۱۲۹۵.

کلید واژه‌ها: کبد چرب، جیره غذایی پرچرب، کروسین، موش صحرایی

مقدمه

بشر بوده که معمولاً با چاقی مفرط، هیپرلیپیدمی و دیابت ملیتوس نوع ۲ همراه می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که

کبد چرب غیرالکلی (Non alcoholic fatty liver disease; NAFLD) به عنوان معضلی جهانی، گریبانگیر

های آماسی، اختلالات عملکردی میتوکندری‌ها و استرس اکسیداتیو خواهد شد که خود منجر به استئاتوهپاتیت و یا فیروز می‌شود (۱۰ و ۱۱). Barbuio و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو در تبدیل استئاتوز به استئاتوهپاتیت موثر می‌باشد (۵). به هر حال، اگرچه استئاتوز ممکن است به نارسایی کامل کبد منجر شود، لکن درمان مناسب و ایده‌آلی برای آن بنا نشده است (۳). مواد بیولوژیک با منشأ گیاهی شاخه‌ای از فارماکوترابی مدرن بیماری‌ها را تشکیل می‌دهند. اگر چه عوامل دارویی متنوعی برای درمان انواع بیماری‌ها وجود دارد، لکن اغلب بیماران قادر به تحمل اثرات جانبی داروهای شیمیایی نیستند و از سوی دیگر اکثر گیاهان اثرات جانبی بسیار اندکی در روی بیماران به جای می‌گذارند. بدیهی است قبل از آن‌که دارویی جدید وارد عرصه طب شود، لازم است مطالعات متعددی در چندین مرحله روی دارو انجام شود. در اولین مرحله، دارو در محیط‌های بی‌جان (*in vitro*) و نیز روی حیوانات زنده (*in vivo*) بررسی می‌شود که در این مرحله ویژگی‌های کلی را روی مورد مطالعه (*pharmacological profile*) مورد بررسی قرار می‌دهند. بعد از این مرحله است که دارو روی انسان آزمایش می‌شود. کروسین (Crocin) به عنوان یک کاروتنوئید گلیکوزیده (*glycosylated carotenoid*) ماده‌ای است که دارای اثرات هیپوتری‌گلیسریدمیک و هیپوکلسترولمیک قوی می‌باشد (۱۶). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که کروسین دارای اثرات فارماکولوژیک متعدد از جمله اثرات محافظتی علیه بیماری‌های قلبی-عروقی (۱۶، ۳۰ و ۳۵)، جلوگیری از پرولیفراسیون سلول‌های توموری (۲۴)، محافظت از سیستم عصبی (۱ و ۲۶) و محافظت از هپاتوسیت‌ها (۳۲) را نیز دارا می‌باشد. در هر صورت، در بین مکانیسم‌های محافظتی مختلف، فعالیت آنتی-اکسیدانی کروسین مسئول اثرات فارماکولوژیک آن قلمداد شده است (۲۴).

تغذیه با جیره پرچرب منجر به استئاتوز کبد می‌گردد (۴). تری-گلیسرید و کلسترول، لیپیدهای بیولوژیک مهمی هستند که دریافت بیش از حد آنها از طریق جیره غذایی منجر به هیپوتری‌گلیسریدمی (۱۷ و ۱۹) و هیپرکلسترولمی (۳۳) می‌گردد. کبد چرب غیرالکلی با تجمع تری‌گلیسریدها در هپاتوسیت‌ها که در اثر استریفیکاسیون اسیدهای چرب آزاد و گلیسرول شکل می‌گیرند، مشخص می‌شود. افزایش اسیدهای چرب آزاد در کبد از سه منبع جداگانه یعنی لیپولیز (هیدرولیز اسید چرب و گلیسرول از تری‌گلیسرید) در بافت چربی، رژیم غذایی پر چرب و لیپوژنز مجدد (*de novo lipogenesis*) سرچشمه می‌گیرد (۲۸). در مقابل، اسیدهای چرب ممکن است از طریق بتا-اکسیداسیون (β -oxidation)، استریفیکاسیون مجدد به تری‌گلیسریدها و ذخیره به شکل قطرات چربی، یا دفع به صورت VLDL (very low density lipoprotein) مصرف شوند. بنابراین، تجمع چربی در کبد می‌تواند در اثر افزایش سنتز چربی، کاهش دفع چربی و یا کاهش اکسیداسیون آن به وقوع بپیوندد. Donnelly و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان داده‌اند که ۶۰٪ محتوای تری-گلیسرید کبد از اینفلاکس اسیدهای چرب از بافت چربی، ۲۶٪ از لیپوژنز مجدد، و ۱۵٪ از جیره غذایی منشأ می‌گیرد (۱۳). کبد چرب غیر الکلی با یکسری تغییرات هیستوپاتولوژیک که از استئاتوز تا سیروز متفاوت است، همراه می‌باشد (۳، ۹، ۱۲ و ۱۵). سابقاً عقیده بر این بود که استئاتوز پدیده‌ای ساده بوده و بدون عوارض می‌باشد. لکن، امروزه مشخص شده است که کبد چرب به عواملی همچون استرس‌های اکسیداتیو آسیب‌پذیر بوده و می‌تواند به استئاتوهپاتیت (Steatohepatit) که با نکروز، آماس، فیروز و سیروز مشخص می‌شود، منجر گردد (۱۸ و ۲۷). در پاتوژنز استئاتوهپاتیت غیر الکلی (non-alcoholic steatohepatitis (NASH) فرض بر این است که تجمع تری‌گلیسرید در کبد یا استئاتوز باعث افزایش حساسیت کبد به آسیب‌های ناشی از سیتوکائین‌ها یا لیپوکائین-

در این مطالعه کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی، مورد تأیید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز بود. مراحل مختلف مطالعه به صورت دوسو بی‌خبر انجام شد.

الف- طرح آزمایش:

در گروه‌های تغذیه با جیره پر چرب، برای ایجاد استئاتوز کبد، از امولسیون پرچرب طبق روش ارائه شده توسط Zou و همکاران در سال ۲۰۰۶ استفاده شد که شامل ۴۰۰ گرم روغن ذرت، ۱۵۰ گرم ساکاروز، ۸۰ گرم پودر کامل شیر، ۱۰۰ گرم کلسترول، ۱۰ گرم سدیم دی‌اکسی‌کولات، ۳۶/۴ گرم توئین ۸۰، ۳۱/۱ گرم پروپیلن گلیکول، ۲/۵ گرم مولتی ویتامین، ۱۰ گرم نمک، ۱/۵ گرم مواد معدنی مخلوط و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود (۳۶). به طور خلاصه، موش‌های گروه‌های ۲ تا ۶، امولسیون پرچرب را به میزان ۱۰ ml/kg، روزانه راس ساعت ۸ صبح به مدت ۴ هفته از طریق گاوژ دریافت کردند. همزمان به موش‌های گروه شاهد نیز به همان میزان (۱۰ ml/kg) نرمال سالیین گاوژ شد. گروه‌های تیمار با کروسین (گروه‌های ۴ تا ۶) نیز کروسین را به میزان ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg/day و گروه کنترل مثبت، کلوفیبرات را به میزان ۳۲۰ mg/kg/day (۳۱) از طریق گاوژ به صورت سوسپانسیون در متیل سلولز ۰/۵٪ (۲ ml/kg) دریافت کردند. به موش‌های گروه شاهد نیز به همان میزان (۲ ml/kg) متیل سلولز ۰/۵٪ گاوژ گردید.

ب) سنجش پارامترهای بیوشیمیایی سرم

در پایان دوره آزمایش جهت اندازه‌گیری برخی فاکتورهای بیوشیمیایی شامل آلانین آمینو ترانسفراز (ALT; alanine amino transaminase)، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST; aspartate amino transaminase) (۲۹)، آلکالین فسفاتاز (ALP; alkaline phosphatase) (۲۰)، آلبومین (Alb; albumin) و پروتئین تام (TP, total

با توجه به اثرات هیپولیپیدمیک و آنتی‌اکسیدانی کروسین (۳۱)، این ماده احتمالاً توانایی آن را خواهد داشت که بتواند کبد را از ابتلاء به استئاتوز و در پی آن آسیب‌های ناشی از تنش‌های اکسایشی محافظت کند. در هر صورت با توجه به بررسی منابع، مطالعه‌ای در رابطه با اثرات پیشگیری‌کنندگی کروسین از ابتلاء به استئاتوز کبد در موارد تغذیه با جیره پر چرب وجود ندارد. بنابراین، تحقیق حاضر برای اولین بار جهت ارزیابی اثرات پیشگیری‌کنندگی کروسین از استئاتوز کبد در موش‌های صحرائی تغذیه شده با جیره پر چرب اجرا گردیده است. به هر حال، با انجام این مطالعه خاصیت دارویی کروسین در پیشگیری از بروز عارضه کبد چرب در مواقع تغذیه با جیره پر چرب برای اولین بار مورد ارزیابی قرار می‌گیرد که در صورت تأیید می‌تواند به عنوان یک منبع قابل دسترس با خاصیت هیپولیپیدمیک و آنتی‌اکسیدانی جهت پیشگیری از استئاتوز و عوارض وخیم ناشی از آن مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده و در سال ۱۳۹۰ در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز انجام گردید. جامعه آماری این مطالعه شامل موش‌های صحرائی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی 180 ± 20 گرم و سن ۹ هفته بود. نمونه‌ای به حجم ۶۰ سر موش صحرائی از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز تهیه و به‌طور تصادفی به ۶ گروه مساوی شامل: ۱- گروه شاهد سالم ۲- گروه تغذیه با جیره پر چرب ۳- گروه تغذیه با جیره پر چرب + کلوفیبرات (به عنوان کنترل مثبت)، ۴ تا ۶- گروه‌های تغذیه با جیره پر چرب + کروسین (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰) تقسیم گردید. موش‌ها برای سازگاری با محیط جدید، قبل از آغاز مطالعه به مدت یک هفته در قفس‌های فایبرگلاس مخصوص در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای $23 \pm 2^\circ\text{C}$ و دسترسی آزاد به مقادیر دلخواه آب و غذای پودر شده استاندارد نگه‌داری شدند.

قرار گرفت. آزمون ناپارامتری کروسکال والیس (The Kruskal-Wallis test) و آزمون تعقیبی یو مان-ویتنی (Mann-Whitney U Test) نیز برای آنالیز درجات هیستوپاتولوژیک استئاتوز کبد مورد استفاده قرار گرفت. اختلافات در سطح $p < 0/05$ معنی دار تلقی شدند. از آزمون آماری کلموگروف-اسمیرنوف (Kolmogrov-Smirnov) که یکی از آزمون‌های نیکویی برازش است، نیز برای تعیین نرمال بودن توزیع پراکندگی داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

الف-تاثیر کروسین بر تغییر پارامترهای بیوشیمیایی آسیب کبد ناشی از تغذیه با رژیم پرچرب

در موش‌های گروه ۲ (گروه تغذیه با جیره پر چرب)، سطوح سرمی آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، اسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) و بیلی‌روبین تام سرم (TB) در مقایسه با گروه ۱ (شاهد سالم)، به‌طور معنی‌داری ($p < 0/01$) افزایش و میزان پروتئین تام (TP) و آلبومین سرم (Alb) به‌طور معنی‌داری ($p < 0/01$) کاهش یافت. در گروه ۳ (شاهد مثبت)، کلوفیرات (320 mg/kg) و در گروه ۶، دز بالای کروسین (100 mg/kg)، سطوح افزایش یافته سرمی آنزیم‌های ALT، AST و ALP و بیلی‌روبین تام سرم در اثر رژیم پرچرب را به‌طور معنی‌داری ($p < 0/01$) و تا حد طبیعی کاهش و مقادیر کاهش یافته پروتئین تام و آلبومین سرم در اثر رژیم پرچرب را به‌طور معنی‌داری ($p < 0/01$) و تا سطوح طبیعی خود افزایش دادند. در گروه ۵ نیز دز متوسط کروسین (50 mg kg^{-1}) مقادیر افزایش یافته آنزیم‌های مارکر و بیلی‌روبین تام سرم در اثر رژیم پرچرب را به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) کاهش و مقادیر کاهش یافته پروتئین تام و آلبومین سرم را به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) افزایش داد، هرچند که این مقادیر به حد طبیعی خود نرسیدند. در گروه ۴، دز پائین کروسین (25 mg kg^{-1}) نتوانست مقادیر افزایش یافته آنزیم‌های مارکر و بیلی‌روبین تام سرم در اثر رژیم پرچرب را

(protein)، (۲۳) و بیلی‌روبین تام (TB; total bilirubin) (۲۵)، نمونه خون ناشتا از سینوس پشت کره چشم (retro-orbital plexus) اخذ گردید. سرم نمونه‌های خون توسط سانتریفیوژ با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد جدا شد. جهت سنجش پارامترهای مذکور از کیت‌های تجاری موجود (Commercial analysis kits; Beijing, China) استفاده شد.

ج- هیستوپاتولوژی کبد:

آسیب‌شناسی بافتی کبد موش‌های مورد آزمایش با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) انجام شد. قسمتی از بافت کبد موش‌ها در فرمالین بافری ۱۰ درصد پایدار شد و از نمونه‌های پایدار شده با استفاده از شیوه‌های رایج پاساژ بافت و تهیه مقاطع هیستولوژی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون و رنگ آمیزی معمول هماتوکسیلین-ائوزین تهیه شد (۲۲). تغییرات هیستوپاتولوژی کبد به صورت تغییر چربی (fatty Change) هپاتوسیت‌ها بر اساس شدت ضایعه طبق روش (۶ و ۳۴)، از صفر تا ۴ (صفر: بدون استئاتوز، ۱: کمتر از ۲۵٪ هپاتوسیت‌ها دچار استئاتوز هستند، ۲: بین ۲۶ تا ۵۰٪ هپاتوسیت‌ها دچار استئاتوز هستند، ۳: بین ۵۱ تا ۷۵٪ هپاتوسیت‌ها دچار استئاتوز هستند و ۴: بیش از ۷۶٪ هپاتوسیت‌ها دچار استئاتوز هستند). رتبه‌بندی گردید. کلیه درجه‌بندی‌ها با بزرگنمایی $\times 100$ و در ۵ میدان میکروسکوپی از هر برش، به‌طور تصادفی با میکروسکوپ نوری مدل (ECLIPSE E200) Nikon ساخت کشور ژاپن انجام شد.

د) تحلیل آماری داده‌ها

برای تحلیل داده‌ها از بسته نرم‌افزاری SPSS-13 استفاده شد. داده‌های به‌دست آمده کمی، به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد (mean \pm SEM.) ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) مورد بررسی

به طور معنی داری کاهش و مقادیر کاهش یافته پروتئین تام و آلبومین سرم را به طور معنی داری افزایش دهد (جدول ۱).

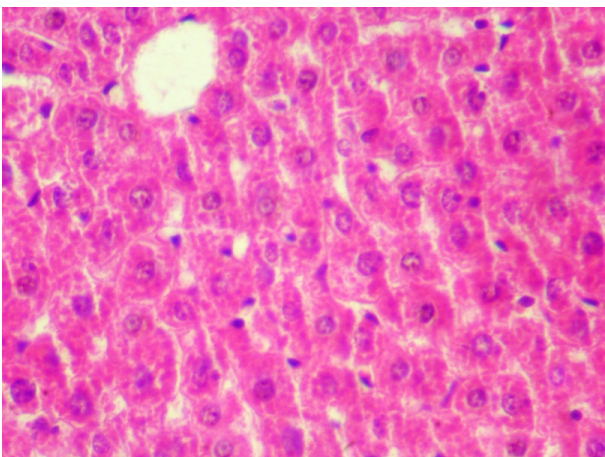
جدول ۱- تاثیر کروسین بر پارامترهای بیوشیمیایی سرم موش های صحرایی در استئاتوز کبد ناشی از رژیم غذایی پرچرب

پارامترها						گروه ها
پروتئین تام سرم (g/dl)	آلبومین (g/dl)	بیلی روبین تام سرم (mg/dl)	آلکالین فسفاتاز (IU/L)	آسپاراتات آمینو ترانسفراز (U/L)	آلانین آمینو ترانسفراز (U/L)	
۸/۲۸±۰/۵۸ ^{bde}	۴/۳۸±۰/۴۲ ^{bde}	۰/۸۱±۰/۰۳ ^{bde}	۱۹۴/۸۷±۹/۰۳ ^{bde}	۶۸/۹۰±۱/۷۱ ^{bde}	۵۴/۸۲±۲/۳۶ ^{bde}	شاهد سالم
۵/۵۶±۰/۴۵ ^{acef}	۳/۱۲±۰/۲۱ ^{acef}	۱/۲۹±۰/۰۷ ^{acef}	۲۸۱/۶۷±۱۱/۲۵ ^{acef}	۹۳/۲۱±۲/۹۶ ^{acef}	۷۱/۲۵±۳/۱۲ ^{acef}	رژیم غذایی پر چرب
۷/۲۶±۰/۴۷ ^{bd}	۴/۳۲±۰/۳۶ ^{bd}	۰/۸۷±۰/۰۶ ^{bd}	۲۰۸/۹۲±۸/۰۹ ^{bd}	۶۸/۲۱±۱/۳۴ ^{bd}	۵۵/۹۰±۲/۴۷ ^{bd}	رژیم غذایی پرچرب + کلوفیبرات (۳۲۰ mg/kg)
۵/۶۵±۰/۴۲ ^{acf}	۳/۳۳±۰/۲۷ ^{acf}	۱/۲۵±۰/۰۶ ^{acf}	۲۷۵/۶۱±۹/۶۵ ^{acf}	۸۹/۷۶±۳/۲۴ ^{acf}	۶۹/۵۵±۳/۳۶ ^{acf}	رژیم غذایی پرچرب + کروسین (۲۵ mg kg ⁻¹)
۶/۱۶±۰/۴۳ ^{ab}	۳/۷۳±۰/۲۹ ^{ab}	۱/۰۶±۰/۰۵ ^{ab}	۲۳۵/۶۲±۶/۹۱ ^{ab}	۷۸/۳۰±۲/۶۱ ^{ab}	۶۲/۵۶±۲/۹۵ ^{ab}	رژیم غذایی پرچرب + کروسین (۵۰ mg kg ⁻¹)
۷/۲۱±۰/۵۲ ^{bd}	۴/۳۱±۰/۳۴ ^{bd}	۰/۸۵±۰/۰۴ ^{bd}	۲۱۴/۸۸±۸/۵۰ ^{bd}	۶۹/۹۱±۲/۱۵ ^{bd}	۵۶/۳۰±۲/۶۴ ^{bd}	رژیم غذایی پرچرب + کروسین (۱۰۰ mg kg ⁻¹)
$p=۰/۰۰۰$	$p=۰/۰۰۰$	$p=۰/۰۰۰$	$p=۰/۰۰۰$	$p=۰/۰۰۰$	$p=۰/۰۰۰$	آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA)

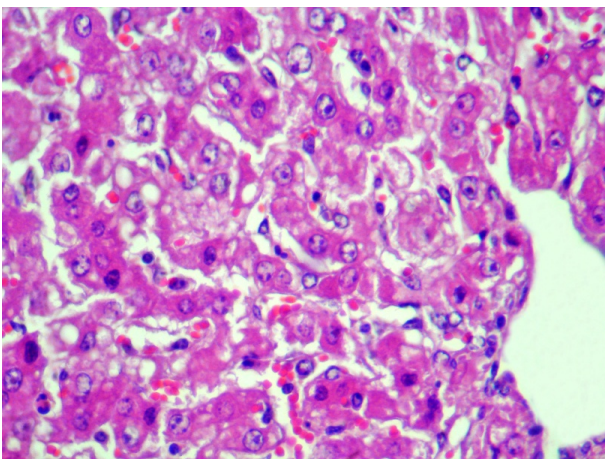
مقادیر به صورت میانگین ± انحراف استاندارد (mean±SEM) برای ۱۰ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است. a: اختلاف معنی دار با گروه ۱، b: اختلاف معنی دار با گروه ۲، c: اختلاف معنی دار با گروه ۳، d: اختلاف معنی دار با گروه ۴، e: اختلاف معنی دار با گروه ۵، f: اختلاف معنی دار با گروه ۶ ($p<۰/۰۵$).

استئاتوز شدید بافت کبد به صورت تغییر چربی میکروویکر و گاهاً ماکروویکولر همراه با تورم هپاتوسیت ها ایجاد شده بود (تصویر ۲). کلوفیبرات در موش های گروه ۳ که جیره پرچرب دریافت می کردند، مانع از استئاتوز کبد شده بود (تصویر ۳). در گروه های ۵ و ۶ تجویز کروسین (۱۰۰ و ۵۰) به صورت وابسته به دز از بروز تغییر چربی در هپاتوسیت ها

ب- هیستوپاتولوژی تاثیر کروسین بر آسیب بافت کبد ناشی از رژیم پرچرب در مطالعات ریزبینی، هیچگونه حالت غیر طبیعی در بافت کبد موش های گروه شاهد سالم (گروه ۱) مشاهده نشد (تصویر ۱). در حالی که، در موش های گروه ۲ که به مدت ۴ هفته فقط با جیره پرچرب تغذیه شده بودند،



نگاره ۱- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرائی متعلق به گروه شاهد سالم. هپاتوسیت‌ها و ساختار بافت کبد طبیعی می‌باشد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، درشتنمایی ۴۰۰).



نگاره ۲- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرائی متعلق به گروه تغذیه با رژیم پرچرب. تغییر چربی با تشکیل میکرووزیکول‌ها و ماکرووزیکول‌ها درون سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها مشخص می‌باشد (رنگ-آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، درشتنمایی ۴۰۰).

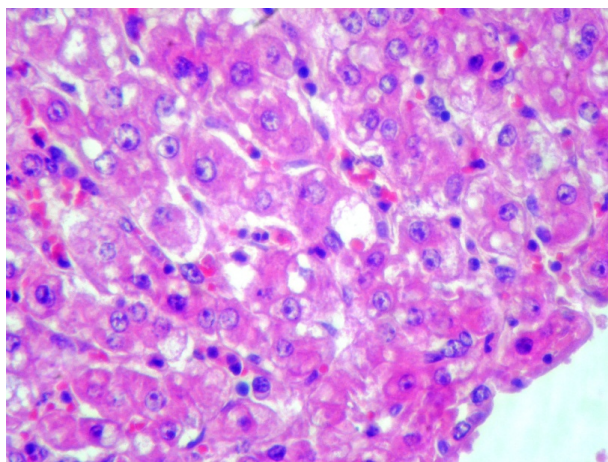
پیشگیری کرد، به‌خصوص با دز 100 mg/kg که تقریباً به طور کامل مانع از بروز استئاتوز در کبد شد (تصاویر ۴ و ۵)، در حالی که در گروه ۴، کروسین با دز 25 mg/kg نتوانست به طور مشخصی از استئاتوز بافت کبد جلوگیری کند (تصویر ۶). تاثیر کروسین بر درجه‌بندی پاتولوژیک استئاتوز کبد در موش-های تغذیه شده با رژیم پرچرب در جدول ۲ آورده شده است. جدول ۲- تاثیر کروسین بر استئاتوز بافت کبد موش‌های صحرائی تغذیه

شده با رژیم غذایی پرچرب

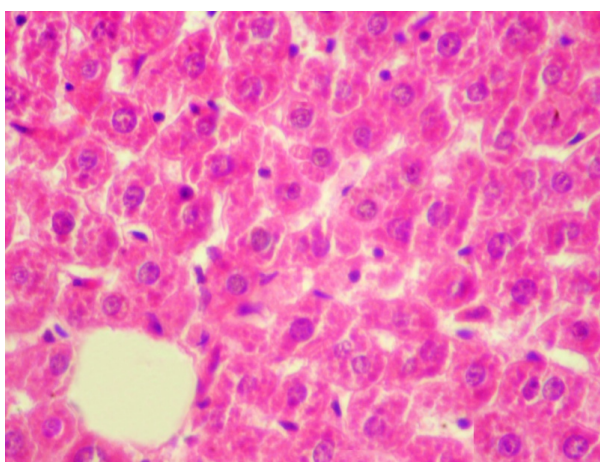
P	درجه استئاتوز کبد	گروه‌ها
		شاهد سالم
$P < 0.001$	0.00 ± 0.00	رژیم پرچرب
	$2.97 \pm 0.85d$	رژیم پرچرب + کلوفیبرات
	$0.74 \pm 0.11b$	رژیم پرچرب + کروسین (25 mg kg^{-1})
	$2.65 \pm 0.68d$	رژیم پرچرب + کروسین (50 mg kg^{-1})
	$1.84 \pm 0.46ac$	رژیم پرچرب + کروسین (100 mg kg^{-1})

هر گروه شامل ۱۰ سر موش صحرائی بوده و ارقام نشان‌دهنده تعداد موش-ها برای هر درجه از شدت استئاتوز می‌باشد.

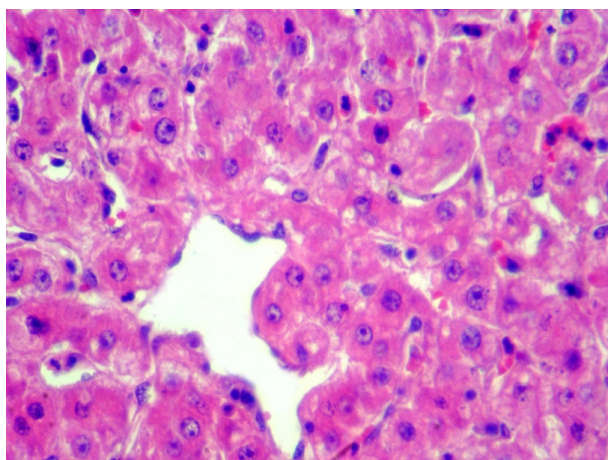
a: $p < 0.05$ و b: $p < 0.01$ در مقایسه با گروه رژیم پرچرب. c: $p < 0.05$ و d: $p < 0.01$ در مقایسه با گروه شاهد سالم.



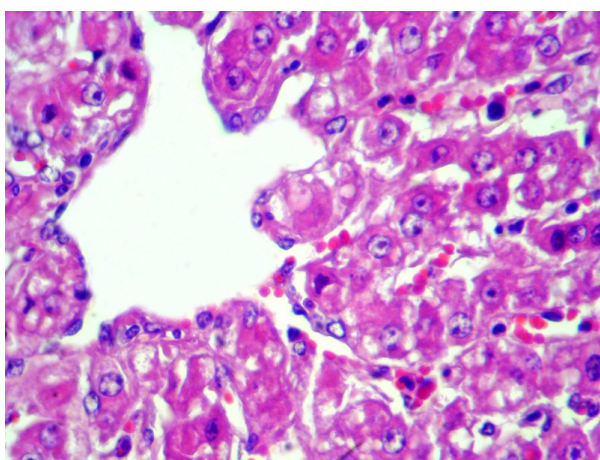
نگاره ۵- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرائی متعلق به گروه رژیم پر چرب + کروسین (50 mg/kg). تغییر چربی در حد متوسط بوده و قطرات ریز چربی به صورت پراکنده قابل مشاهده می‌باشد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشتنمایی $400\times$).



نگاره ۳- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرائی متعلق به گروه رژیم پر چرب + کلوفیبرات (320 mg/kg). بافت کبد طبیعی بوده و تغییر پاتولوژیک خاصی در آن مشاهده نمی‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشتنمایی $400\times$).



نگاره ۶- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرائی متعلق به گروه رژیم پر چرب + کروسین (100 mg/kg). تغییر چربی در حد بسیار جزئی بوده و قابل چشم‌پوشی می‌باشد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشتنمایی $400\times$).



نگاره ۴- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرائی متعلق به گروه رژیم پر چرب + کروسین (25 mg/kg). وزیکول‌های ریز و درشت چربی به طور منتشر در بافت کبد مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشتنمایی $400\times$).

بحث و نتیجه گیری

افزایش فعالیت آنزیم‌های شاخص عملکرد کبد شامل ALT، AST و ALP در سرم نشانگر آسیب کبد می‌باشد (۸). از آنجائی‌که تغییر در میزان سرمی مارکرهای فوق طی استئاتوز کبد نیز قبلاً گزارش گردیده است (۲ و ۳۴)، بنابراین، در بررسی حاضر سطوح سرمی این آنزیم‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. افزایش فعالیت سرمی آنزیم‌های ALT، AST و ALP در سرم موش‌های مورد تغذیه با جیره پرچرب مشاهده شد که حکایت از بروز آسیب در سلول‌های کبدی را دارد. این یافته با نتایج Chidambaram و Venkatraman در سال ۲۰۱۰ همخوانی دارد (۸). تیمار با کروسین تا حد قابل توجهی از افزایش سطوح سرمی آنزیم‌های مذکور، ناشی از تغذیه با جیره پرچرب، جلوگیری کرد که این تاثیر با عملکرد کلوپیبرات در گروه کنترل مثبت، قابل مقایسه می‌باشد. این نتیجه با یافته‌های El-Maraghy و همکاران در سال ۲۰۰۹ که اثرات محافظتی کروسین را در برابر افزایش سیستمیک بار آهن در موش‌های صحرایی مورد مطالعه قرار داده بودند، همراستا است (۱۴). در این مطالعه، نتایج بیوشیمیایی به دست آمده با یافته‌های هیستوپاتولوژی نیز مورد تأیید قرار گرفت، به طوری که موش‌هایی که به مدت ۴ هفته با جیره پرچرب تغذیه شده بودند، درجات بالایی از استئاتوز کبد را بروز دادند. در هر صورت، ارزیابی‌های هیستوپاتولوژی اثرات ضد هپاتواستئاتوزی کروسین را در موش‌های تغذیه شده با جیره پرچرب نشان داد به طوری که، کروسین به خصوص با دز ۱۰۰ mg/kg مانع از رسوب چربی در هپاتوسیت‌ها شده بود. مشاهدات ریزینی در توافق با یافته‌های بیوشیمیایی، با نتایج مطالعه Wang و همکارانش در سال ۲۰۰۹ همسو می‌باشد (۳۴). شواهد موجود نشان می‌دهد که تجمع چربی در کبد، حساسیت این بافت را نسبت به سایر عوامل آسیب‌رسان نظیر استرس‌های اکسیداتیو افزایش می‌دهد که خود باعث پیشرفت استئاتوز به سمت

استئاتوهپاتیت، فیروز و سیروز می‌شود (۲۱). با توجه به ارتباط بین استرس اکسیداتیو و التهاب بافت (۸)، بررسی حاضر تأیید می‌کند که رژیم غذایی پرچرب می‌تواند باعث آسیب اکسیداتیو کبد شود. عدم تعادل بین استرس اکسیداتیو و تشکیل آنتی-اکسیدان‌ها می‌تواند متعاقب تغذیه با جیره پرچرب بروز نماید و اینکه کروسین می‌تواند از این روند پاتولوژیک پیشگیری کند، اثرات درمانی و پیشگیری‌کنندگی آنرا از هپاتواستئاتوز ناشی از جیره پرچرب نشان می‌دهد. نتایج آزمایشات بیوشیمیایی مطالعه حاضر، در کنار یافته‌های هیستوپاتولوژی، نشان می‌دهد که تیمار با کروسین استئاتوز کبد را کاهش داده و مانع از آسیب پراکسیداتیو آن می‌گردد به طوری که، این اثرات با اثرات کلوپیبرات قابل قیاس می‌باشد. این نتایج با یافته‌های مطالعات Zou و همکاران در سال ۲۰۰۶ همراستا می‌باشد (۳۶). کبد نقشی اساسی را در متابولیسم چربی در بدن به عهده داشته و استئاتوز کبد نشان از تجمع بیش از حد لیپیدها در هپاتوسیت‌ها به دلیل عدم تعادل در تشکیل و تجزیه چربی دارد (۷). هیپرکلسترولمی، هیپرتری‌گلیسریدمی، میزان کم HDL-C و سطوح بالای LDL-C در سرم اختلالات معمولی هستند که در هومئوستاز لیپیدی مبتلایان به استئاتوز کبد رخ می‌دهد (۳). تحقیقات نشان داده است که کروسین دارای اثرات هیپولیپیدمیک می‌باشد (۳۱). در این مطالعه، کروسین به طور معنی‌داری شواهد بیوشیمیایی و هیستولوژیک مربوط به تجمع چربی در بافت کبد را بهبود بخشید. این نتایج نشان می‌دهند که کروسین می‌تواند از وقوع هپاتواستئاتوز از طریق کاهش تجمع لیپیدها در سرم و کبد ممانعت کند. به عبارتی دیگر کروسین اختلالات ایجاد شده در متابولیسم چربی ناشی از رژیم غذایی پرچرب را کاهش می‌دهد. در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که کروسین به عنوان یک کاروتنوئید گلیکوزیده که نقش خود را از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی اعمال می‌دارد، از تجمع چربی در بافت کبد در رژیم غذایی پرچرب جلوگیری

کرده و این تغییرات با کاهش مارکرهای سرمی آسیب کبد
 همراه می‌باشد.
 سیاستگذاری: این طرح پژوهشی با اعتبارات مالی دانشگاه آزاد
 اسلامی واحد تبریز به انجام رسیده است. بدین وسیله از
 معاونت پژوهشی این دانشگاه صمیمانه قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Ahmad A.S., Ansari M.A., Ahmad M., Saleem S., Yousuf S. and Hoda M.N. et al., Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 81 (2005), pp. 805–813.
2. Angulo P. Non alcoholic fatty liver disease, *N. Engl. J. Med.* 18 (346) (2002), pp. 1221–1231.
3. Angulo P. and Lindor K.D. Non-alcoholic fatty liver disease, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17 Suppl. (2002), pp. S186–190.
4. Assy N., Kaita K., Mymin D., Levy C., Rosser B. and Minuk G. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients, *Dig. Dis. Sci.* 45 (2000), pp. 1929–1934.
5. Barbuio R., M. Milanski, M.B. Bertolo, M.J. Saad and L.A. Velloso, Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet, *J. Endocrinol.* 194 (2007), pp. 539–550.
6. Brunt E.M., Janney C.G., Di Bisceglie A.M., Neuschwander-Tetri B.A. and Bacon B.R., Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions, *The American Journal of Gastroenterology* 94 (1999), pp. 2467–2474.
7. Burt AD, Mutton A and Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis, *Seminars in Diagnostic Pathology* 15 (1998), pp. 246–258.
8. Chidambaram J and Venkatraman AC. Cissus quadrangularis stem alleviates insulin resistance, oxidative injury and fatty liver disease in rats fed high fat plus fructose diet. *Food and Chemical Toxicology*, 2010 48(8-9):2021-2029.
9. Clark J.M., Brancati F.L. and Diehl A.M. Nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology* 122 (2002), pp. 1649–1657.
10. Day, C.P. and James, O.F. 1998. Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? *Gastroenterology*, 114:842-5.
11. Day, C.P. 2006. From fat to inflammation. *Gastroenterology*, 130:207-10.
12. Dixon, J.B., Bhathal P.S. and O'Brien P.E. 2001. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese, *Gastroenterology* 121: 91-100.
13. Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D. and Parks, E.J. 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.*, 115:1343-51.
14. El-Maraghy, S.A., Rizk, S.M. and El-Sawalhi, M.M. 2009. Hepatoprotective potential of crocin and curcumin against iron overload-induced biochemical alterations in rat. *African Journal of Biochemistry Research*, 3(5):215-221.
15. Farrell, G.C. 2003. Non-alcoholic steatohepatitis: what is it, and why is it important in the Asia-Pacific region?, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 18:124-138.
16. He, S.Y., Qian, Z.Y., Tang, F.T., Wen, N., Xu, G.L. and Sheng, L. 2005, Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms, *Life Sciences*, 77: 907-921.
17. Hokanson, J.E. 2002. Hypertriglyceridemia and risk of coronary heart disease, *Curr. Cardiol. Rep.* 4: 488-493.
18. James, O. and Day C. 1999. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence, *Lancet*, 353:1634-1636.
19. Kametani, T., Koshida, H., Nagaoka, T. and Miyakoshi, H. 2002. Hypertriglyceridemia is an independent risk factor for development of impaired fasting glucose and diabetes mellitus: a 9-year longitudinal study in Japanese, *Intern. Med.*, 41:516-521.
20. Kind, P.R. and King, E.J. 1954. Estimation of plasma phosphates by determination of hydrolyzed phenol with antipyrin. *J. Clin. Pathol.*, 7:322-326.
21. Koteish, A. and Diehl, A.M. 2002. Animal models of steatohepatitis, *Semin. Liver Dis.*, 21:89-104.
22. Lee, G. and Luna, H.T. 1988. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. Third Edition. The Blakiston Division Mc Graw. Hill Book Company, pp: 32- 107.
23. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

24. Magesh, V., Singh, J.P.V., Selvendiran, K., Ekambaram, G. and Sakthisekaran, D. 2006. Antitumour activity of crocetin in accordance to tumor incidence, antioxidant status, drug metabolizing enzymes and histopathological studies, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 287: 127-135.
25. Malloy, H.T. and Evelyn, K.A. 1937. The determination of bilirubin level with the photoelectric colorimeter. *J. Biol. Chem.*, 119: 481-484.
26. Ochiai, T., Ohno, S., Soeda, S., Tanaka, H., Shoyama, Y. and Shimeno, H. 2004. Crocin prevents the death of rat pheochromocytoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of α -tocopherol, *Neuroscience Letters*, 362:61-64.
27. Orrenius, S., Gogvadze, V. and Zhivotovsky, B. 2007. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47:143-183.
28. Postic, C. and Girard, J. 2008. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.*, 118:829-38.
29. Reitman, S. and Frankel, S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, 28:56-63.
30. Shen, X.C. and Qian, Z.Y. 2006. Effects of crocetin on antioxidant enzymatic activities in cardiac hypertrophy induced by norepinephrine in rats. *Pharmazie*, 61:348-352.
31. Sheng, L., Qian, Z., Zheng, S. and Xi, L. 2006. Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rats: Crocin inhibits pancreatic lipase. *European Journal of Pharmacology*, 543 (1-3): 116-122.
32. Tseng, T.H., Chu, C.Y., Huang, J.M., Shiow S.J. and Wang, C.J. 1995. Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes, *Cancer Letters*, 97:61-67.
33. Walldius, G., Aastveit, A. and Jungner, I. 2004. Hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia—greatest cardiac risk in subjects with high apoB/apoA-I levels, *Int. Congr. Ser.*, 1262: 203-206.
34. Wang, J.Q., Li, J., Zou, Y.H., Cheng, W.M., Lu, C., Zhang, L., Ge, J.F., Huang, C., Jin, Y., Lv, X.W., Hu, C.M. and Liu, L.P. 2009. Preventive effects of total flavonoids of *Litsea coreana* leve on hepatic steatosis in rats fed with high fat diet. *Journal of Ethnopharmacology*, 121(1):54-60.
35. Xiang, M., Qian, Z.Y., Zhou, C.H., Liu, J., Li, W.N. and Li, W.N. 2006. Crocetin inhibits leukocyte adherence to vascular endothelial cells induced by AGEs. *Journal of Ethnopharmacology*, 107:25-31.
36. Zou, Y., Li, J., Lu, C., Wang, J., Ge, J., Huang, Y., Zhang, L. and Wang, Y. 2006. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis, *Life Sciences*, 79:1100-1107.

Histopathological study on the effects of Crocin on prevention of fatty liver disease in the rats fed with high fat diet

Mohajeri, D.^{1*}, Rezae, A.², Mousavi, Gh.² Rahmani, J.²

1-Departement of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2-Departement of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

*Corresponding author's email: mohajeri@iaut.ac.ir

(Received: 2011/9/24, Accepted: 2011/12/31)

Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is now recognized as the most common type of liver disease and might lead to an important public health problem. The aim of the present study was to evaluate the protective effects of Crocin on rat high fat diet-induced hepatic steatosis model. For this purpose male Wistar rats were given either control diet, high fat diet alone or high fat diet plus Crocin via gavage at different doses (25, 50 and 100 mg/kg) for 4 weeks in different experimental groups. Histopathological studies of the liver were conducted in all experimental rats at the end of experiment. Animals of the different groups were sacrificed by cervical dislocation. Liver issue specimens were fixed in 10% buffered formalin and 5 micron thick sections were prepared using routine hitopathological techniques. The serum levels of aminotransferases, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured to determine hepatocyte injury. Alkaline phosphatase (ALP) and total bilirubin (TB) were measured to assess biliary function. Albumin (Alb) and total protein (TP) was measured to reflect liver synthetic function. Histopathology of the liver in high fat diet fed rats showed severe fatty change of hepatocytes. Crocin reduced accumulation of lipid droplets in the hepatocytes in a dose dependent manner. In the high fat diet fed rats, serum levels of ALT, AST, ALP and TB significantly ($p<0.01$) increased, and serum Alb as well as TP levels significantly ($p<0.01$) reduced in comparison with normal control rats. Crocin treatments (100 and 50 mg/kg) significantly ($p<0.01$ and $p<0.05$, respectively) reduced elevated markers of liver tissue injury and significantly ($p<0.01$ and $p<0.05$, respectively) increased serum Alb and TP levels in high fat diet fed rats. Low dose of Crocin (25 mg/kg) made no significant changes in the mentioned parameters. The results obtained showed that Crocin has protective effects against hepatic steatosis in rats fed with high fat.

Keywords: Liver steatosis, High fat fed diet, Crocin, Rats