بررسی تغییرات بافت دستگاه گوارش گورخر ماهی (*Danio rerio*) تغذیه شده با جیره حاوی اسانس زیره سبز (*Cuminum cyminum*)

محسن شهریاری مقدم*[۱]، احسان احمدی فر[۲]

*mohsen.shahriari@uoz.ac.ir

۱-گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲-گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۷ تاریخ پذیرش: شهریور۹۷

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثرات استفاده از جیره حاوی اسانس زیره‌سبز (*Cuminum cyminum*) بر بافت روده و کبد گورخرماهی انجام شد. اسانس زیره سبز در دو غلظت ۵۰۰ mg/kg و ۱۰۰۰ به جیره ماهیان اضافه و در پایان دوره پرورش (۸ هفته) مطالعات بافت‌شناسی انجام شد. نتایج نشان داد ارتفاع ویلی‌ها، عرض ویلی‌ها، نسبت توسعه لایه مخاطی به سروزی، قطر هسته و اندازه هپاتوسیت‌ها، در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی اسانس نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود، در حالیکه عرض کریپت‌ها نسبت به شاهد کاهش نشان داد. در ماهیان پرورش یافته با جیره حاوی ۱۰۰۰ mg/kg اسانس تعداد سلول‌های گابلت نسبت به ماهیان شاهد بیشتر شده بود، در حالیکه در تیمار حاوی غلظت کمتر اسانس، تعداد این سلول‌ها نسبت به تیمار شاهد کمتر بود. به رغم مشاهده تغییرات مشخص در شاخص‌های اندازه‌گیری شده، تنها قطر سلول‌های کبدی در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی غلظت بالای اسانس با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان دادند و اندازه این سلول‌ها در ماهیان این تیمار نسبت به سایر تیمارها بزرگتر بود. به طور کلی با توجه به افزایش نسبت توسعه لایه مخاطی به سروزی و همچنین کاهش تعداد سلول‌های گابلت در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰۰ mg/kg اسانس زیره سبز، بنظر می‌رسد استفاده از غلظت‌های پایین اسانس در جیره می‌تواند منجر به بهبود ویژگی‌های هیستولوژیک دستگاه گوارش گورخر ماهی شود.

لغات کلیدی: روده، زیره سبز، سلول گابلت، گورخرماهی، هپاتوسیت

*نویسنده مسئول

مقدمه

امروزه با توجه به دستورالعمل‌های جدیدی که در زمینه محدودیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنایع پرورش طیور و آبزیان در کشورهای مختلف وضع شده است و همچنین تمایل مصرف‌کنندگان به مصرف مواد غذایی ارگانیک، محققان به تحقیق در زمینه استفاده از افزودنی های جدید به جیره‌های غذایی تمایل پیدا کرده‌اند. از مهم‌ترین این ترکیبات می‌توان به پروبیوتیک (Banerjee and Ray, 2017)، آنزیم‌ها (Sabzi *et al.*, 2017)، اسیدهای آلی (He *et al.*, 2017)، عصاره و اسانس‌های گیاهی (Álvarez *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2018) اشاره نمود.

در میان محرک‌های رشد اسانس‌ها اهمیت ویژه‌ای دارند. این ترکیبات دارای ویژگی‌های مختلفی از قبیل خواص آنتی اکسیدانی هستند که موجب استفاده از آنها در صنایع پرورشی شده است. به‌علاوه، اسانس‌ها ترشح آنزیم‌های گوارشی را بیشتر می کنند و موجب بهبود پاسخ های ایمنی می‌شوند. همچنین مطالعات نشان داده‌اند استفاده از اسانس‌ها موجب افزایش کارایی جیره مصرف شده می‌شوند (Amerah *et al.*, 2016).

زیره سبز (*C. cyminum*) یکی از گیاهان دارویی مهم بشمار می‌رود که دارای ارزش دارویی و اقتصادی بالایی است. در طب سنتی زیره سبز به عنوان داروی ضدچاقی، ضد تشنج، ضد صرع، مدر و مقوی معده کاربرد دارد و اخیراً در بعضی مطالعات به عنوان یک داروی ضد دیابت مطرح شده است (محیطی اردکانی و همکاران، ۱۳۹۰). از ترکیبات مهم و عمده زیره سبز می‌توان به سابینن، فلاونوئیدها، پلی‌ساکاریدها، کومارین، کومین آلدئید، پینن و ترپینن اشاره نمود (دانشمندی و همکاران، ۱۳۸۹).

گورخرماهی (*Danio rerio*) از ماهیان زینتی و متعلق به خانواده کپورماهیان است. این ماهی دارای ویژگی‌هایی از قبیل اندازه کوچک، هماوری بالا، تکوین سریع و تشابه سیستم غدد درون ریز و ژنومی با انسان و همچنین بسیاری از ویژگی‌های دیگر است که موجب استفاده گسترده از این ماهی به عنوان مدل در رشته های مختلف شده است (عنایت غلامپور و همکاران، ۱۳۹۵). تحقیقات مختلفی در زمینه اضافه کردن اسانس و عصاره های گیاهان مختلف در جیره آبزیان و بررسی ویژگی‌های ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و تاثیر آنها بر رشد انجام شده است که از آنها می توان به مطالعه تاثیر اسانس پونه کوهی بر رشد گربه ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) و همچنین بررسی خواص ضد باکتریایی آن بر علیه باکتری *Aeromonas hydrophil*a (Zheng *et al.*, 2009)، بررسی اثرات اسانس پوست پرتقال بر رشد ماهی تیلاپیا و همچنین تاثیر آن بر افزایش مقاومت در برابر بیماری (Acar *et al.*, 2015) و تاثیر استفاده همزمان از اسانس رازیانه و آویشن بر شاخص‌های بیوشیمیایی و الکترولیت های قزل‌آلای رنگین کمان (Gulec *et al.*, 2013)، تاثیر مکمل پودر زیره سبز بر شاخص‌های رشد، بازماندگی و ترکیبات لاشه میگوی سفید غربی (شیخ اسدی و همکاران ۱۳۹۷) و تأثیر مصرف خوراکی عصاره آبی- الکلی برگ زیتون در عملکرد رشد و برخی از فراسنجه‌های خونی و ایمنی در بچه ماهی کپور معمولی (کریمی پاشاکی و همکاران، ۱۳۹۷) اشاره نمود. با این وجود مطالعات محدودی در زمینه اثرات استفاده از اسانس‌ها در جیره غذایی بر بافت‌های مختلف ماهیان انجام شده است (Jamroz *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2016; Ghazanfari *et al.*, 2015).

اپی‌تلیوم دستگاه گوارش اولین بافتی است که در معرض مواد غذایی تغذیه شده قرار می‌گیرد. در نتیجه وضعیت سلامت این لایه و ساختار میکروسکوپی آن می‌تواند نشانگر مناسبی در مورد نحوه پاسخ دستگاه گوارش به غذای خورده شده باشد (Jamroz *et al.*, 2006). به‌علاوه، نوع ترکیبات تشکیل دهنده جیره می‌تواند به صورت مستقیم، عملکرد و مورفولوژی کبد را، به عنوان یک اندام مهم در متابولیسم و سم زدایی بدن، تحت تاثیر قرار دهد. این اطلاعات می‌توانند برای تعیین فرمول مناسب جیره غذایی و مدیریت تغذیه ماهیان استفاده شود و منجر به افزایش تولید و کاهش هزینه ها گردد. با توجه به مطالب مذکور این پژوهش با هدف بررسی اثرات استفاده از جیره حاوی اسانس زیره سبز بر بافت روده و کبد گورخرماهی انجام شد.

مواد و روش کار

تهیه اسانس

دانه زیره سبز (*C. cyminum*) از شهرستان کرمان تهیه و آسیاب شد. ۱۰۰ گرم پودر دانه با ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و با استفاده از دستگاه کلونجر به روش تقطیر آبی به مدت ۲ساعت اسانس‌گیری شد. اسانس حاصل توسط سولفات سدیم آبگیری و در ویال‌های شیشه‌ای تیره تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (حقیرالسادات و همکاران، ۱۳۹۰).

تهیه جیره و پرورش ماهی ها: جهت انجام آزمایش، بچه ماهیان گورخرماهی (۰/۰۴±۰/۵۳ گرم و طول استاندارد ۲/۵ cm) از مرکز ماهیان زینتی استان گلستان تهیه شدند. پرورش بچه‌ماهیان در آکواریوم هایی با ابعاد ۴۰×۲۰×۱۵ سانتیمتر و در هر آکواریوم ۳۰ عدد ماهی، بطور تصادفی انجام شد. به منظور بررسی اثرات اضافه کردن اسانس زیره سبز در جیره ماهی از دو غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم اسانس اضافه شده به هر کیلوگرم غذای تجاری بیومار (0.5, BioMar, France) استفاده شد. هم‌چنین از ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی فاقد اسانس به عنوان تیمار شاهد استفاده شد. ماهیان به صورت دستی و روزانه ۳ بار و به میزان ۱۰-۷ درصد وزن بدن به مدت ۸ هفته غذادهی شدند. به منظور کنترل دمای آب آکواریوم‌ها از هیتر اتوماتیک استفاده شد. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب به صورت روزانه اندازه‌گیری شد. دامنه تغییرات خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب آکواریوم‌ها در طول دوره پرورش به صورت pH ۰/۱±۷/۲، اکسیژن محلول mg/L ۰/۲±۶/۱۰، نیتریت mg/L ۰/۳±۱/۶۰، سختی کل mg/L ۶/۳±۲۱۷ و دما ^{o}C ۱±۲۵/۲ بود. جهت حفظ کیفیت آب، ۴۰ درصد حجم آب آکواریوم هر ۲ روز یکبار تعویض گردید. ماهیان در قالب ۳ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد.

مطالعات بافت شناسی: به منظور بررسی اثرات اضافه کردن اسانس زیره سبز به جیره گورخرماهی ۱۵ ماهی از هر تیمار در MS-222 (۱۰ mg/L به مدت ۱۰ دقیقه) بی‌هوش شدند، سپس تمامی محتویات حفره شکمی جدا و در محلول بوئن فیکس شد. نمونه‌ها بعد از ثابت شدن به مدت ۲۴ ساعت در محلول بوئن، به اتانول ۷۰ ٪ منتقل شدند. مراحل آبگیری به ترتیب با استفاده از الکل‌های ٪۹۰، ٪۹۵، ٪۱۰۰ و در نهایت با الکل بوتیلیک (۱۲ ساعت) انجام گردید. مراحل شفاف‌سازی نمونه‌ها با استفاده از تولوئن انجام شد. نمونه‌ها بعد از ۹ ساعت نگهداری در داخل پارافین مایع (در داخل اون با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد) در داخل پارافین قالب‌گیری شدند (Mortoja and Mortoja-pierson, 1967). سپس از ابتدای روده و کبد مقاطع ۵ میکرونی با استفاده از میکروتوم (ساخت شرکت دید سبز مدل DS_{4055}) تهیه شد. برش‌های تهیه شده با رنگ‌های هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و توسط میکروسکوپ (Nikon E600) مجهز به دوربین عکاسی بررسی و عکسبرداری شدند. آنالیز مورفومتریک برش‌های بافتی بر ۱۰ اسلاید تهیه شده از هر ماهی (۱۵ ماهی در هر تیمار) با استفاده از نرم افزار ImajeJ (version 1.38) انجام شد. به منظور بررسی مورفومتریک کبد ۵ تصویر بافتی از هر اسلاید به صورت تصادفی با بزرگنمایی ۱۰۰۰ گرفته شد. در ادامه در هر تصویر گرفته شده قطر ۱۰ هپاتوسیت و هسته هپاتوسیت‌ها (میکرومتر) اندازه‌گیری شد (۷۵۰۰ سلول در هر تیمار). هم‌چنین برای بررسی بافت شناسی بافت روده (ارتفاع ویلی‌ها، عرض ویلی‌ها، عرض کریپت) ۵ تصویر بافتی از هر اسلاید با بزرگنمایی ۱۰۰ گرفته شد و در ۳ ویلی مجاور (۲۲۵۰ ویلی در هر تیمار) اندازه‌گیری گردید (Ferreira *et al.*, 2016). برای شمارش تعداد سلول‌های گابلت ۵ تصویر بافتی از ویلی‌های روده‌ایی با بزرگنمایی ۴۰۰ گرفته شد و سلول‌های گابلت (بر حسب تعداد سلول گابلت در ۳ ویلی مجاور) در ۳ ویلی مجاور شمارش شدند. به منظور آنالیز مورفومتریک برش‌های بافتی روده نسبت توسعه لایه مخاطی به سروزی (mucosal-to-serosal amplification ratio) توسط رابطه ۱ و روش ارائه شده توسط Kisielinski و همکاران (۲۰۰۲) اندازه‌گیری شد (رابطه ۱):

$$M = ((VW.VL) + \left(\frac{VW}{2} + \frac{CW}{2}\right)^2 . \left(\frac{VW}{2}\right)^2)/(\frac{VW}{2} + \frac{CW}{2})^2$$

در این رابطه ارتفاع ویلی‌ها از قسمت پایه‌ایی هر ویلی تا قسمت راسی آن (VL)، عرض ویلی‌ها (VW) و عرض کریپت‌ها (CW) می‌باشد.

تجزیه و تحلیل داده ها :پس از بررسی نرمالیتی داده‌ها، مقایسه تاثیر تیمارهای مختلف بر فاکتورهای اندازه‌گیری شده با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way Anova) و بررسی تفاوت میان تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون دانکن تعیین شد. آزمون‌های آماری توسط نرم افزار SPSS-19 انجام شد.

نتایج

روده در گورخرماهی شبیه به دیگر مهره‌داران از چهار لایه مخاطی، زیرمخاطی، لایه ماهیچه‌ای و سروز تشکیل شده است (شکل ۱- A و B). نتایج فاکتورهای اندازه‌گیری شده مطالعات بافتی در جدول ۱ ارائه شده است. بیشترین میزان ارتفاع ویلی‌های روده‌ای (۴۸۰/۸۶±۱۱۰/۴۵ µm) در ماهیان پرورش یافته با جیره حاوی ۵۰۰ mg/kg اسانس زیره سبز و کمترین میزان آن (۴۵۷/۸۸±۹۳/۲۶ µm) در ماهیان تیمار شاهد دیده شد.

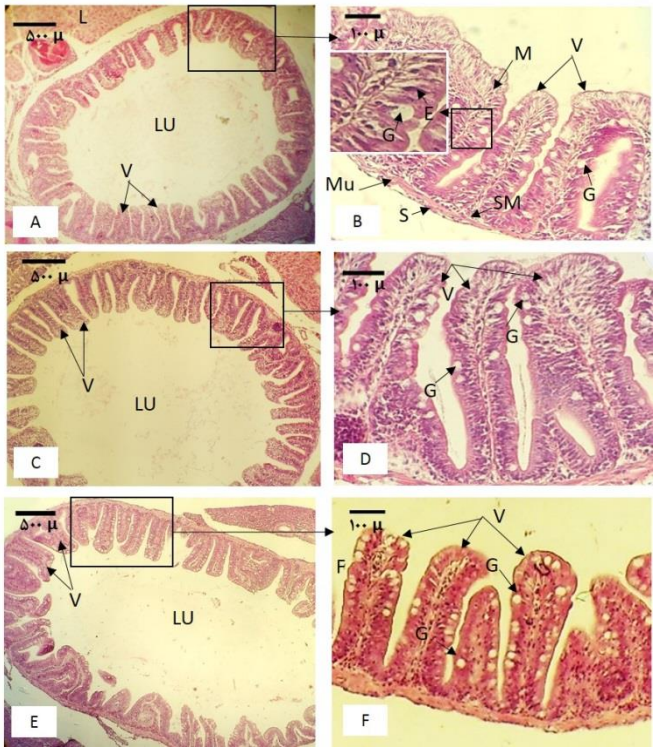
جدول ۱: میزان پارامترهای بافت شناسی روده و کبد گورخر ماهی *D. rerio* (ارتفاع ویلی، عرض ویلی، عرض کریپت، نسبت توسعه لایه مخاطی به سروزی، تعداد گابلت سل‌ها، قطر هسته سلول های کبدی، قطر سلول‌های کبدی) در ماهیان شاهد و تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰۰ mg/kg و ۱۰۰۰ mg/kg اسانس زیره سبز.

Table 1: Histological parameters of the intestine and liver of the zebrafish, *D.rerio* (control and fish fed on diet enriched with cumin essential oils, 500 and 1000mg/kg) (Villus height, villus width, Crypt width, mucosal-to-serosal amplification ratio, number of goblet cells, nucleus diameter of hepatocytes and hepatocyte diameter).

	شاهد	جیره حاوی ۵۰۰ mg/kg اسانس	جیره حاوی ۱۰۰۰ mg/kg اسانس
ارتفاع ویلی ها (µm)	۴۵۷/۸۸±۹۳/۲۶	۴۸۰/۸۶±۱۱۰/۴۵	۴۶۹/۷۵۱±۱۱۸/۳۶
عرض ویلی ها (µm)	۱۵۹/۲۸±۳۱/۷۱	۱۶۲/۰۰±۶۱/۹۵	۱۷۱/۱۸±۵۰/۷۹
عرض کریپت (µm)	۵۲/۰۴±۲۳/۴۲	۵۱/۰۷±۲۹/۳۶	۴۹/۳۱±۱۴/۸۳
نسبت توسعه لایه مخاطی به سروزی	۶/۹۰±۰/۵۲	۷/۱۹±۰/۷۶	۶/۹۹±۰/۶۸
تعداد گابلت سل‌ها (تعداد در ۳ ویلی مجاور)	۳۰/۷۷±۸/۳۶	۲۵/۳۳±۷/۳۵	۳۱/۶۶±۸/۳۶
قطر هسته سلول های کبدی (µm)	۱۰/۵۷±۱/۶۹	۱۱/۸۱±۱/۳۹	۱۱/۱۹±۱/۲۰
قطر سلول های کبدی (µm)	۲۳/۶۳±۴/۱۰^{A}	۲۶/۹۶±۶/۲۰^{A}	۲۹/۴۱±۶/۹۰^{B}

حروف بزرگ متفاوت (A, B) نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p<0/05$) بین تیمارهای مختلف می‌باشد.

بیشترین میزان عرض ویلی‌ها (۱۷۱/۱۸±۵۰/۷۹ µm) در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰۰۰ mg/kg اسانس و کمترین آن در ماهیان تیمار شاهد اندازه‌گیری شد. همچنین نتایج اندازه‌گیری عرض کریپت‌ها نشان داد، ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰۰۰ mg/kg اسانس کمترین عرض کریپت‌ها (۴۹/۳۱±۱۴/۸۳ µm) را دارا بودند. بیشترین نسبت توسعه لایه مخاطی به سروزی (۷/۱۹±۰/۷۶) در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰۰ mg/kg اسانس اندازه‌گیری شد و در ماهیان تیمار شاهد و جیره حاوی ۱۰۰۰ mg/kg اسانس تقریبا برابر بود (شکل۱-A، C و E). نتایج شمارش تعداد سلول‌های گابلت نشان داد در ماهیان پرورش یافته با جیره حاوی ۱۰۰۰ mg/kg تعداد سلول‌های گابلت نسبت به ماهیان شاهد بیشتر شده بود در حالی که در ماهیان پروش یافته در تیمار حاوی ۵۰۰ mg/kg اسانس تعداد سلول‌های گابلت نسبت به تیمار شاهد کمتر بود (شکل ۱-B، D و F). نتایج آنالیز بافت کبد نشان داد، هپاتوسیت‌ها عمدتاً دارای هسته‌های بزرگ و کروی بودند که در بخش مرکزی سلول‌ها، قرار گرفته بودند.

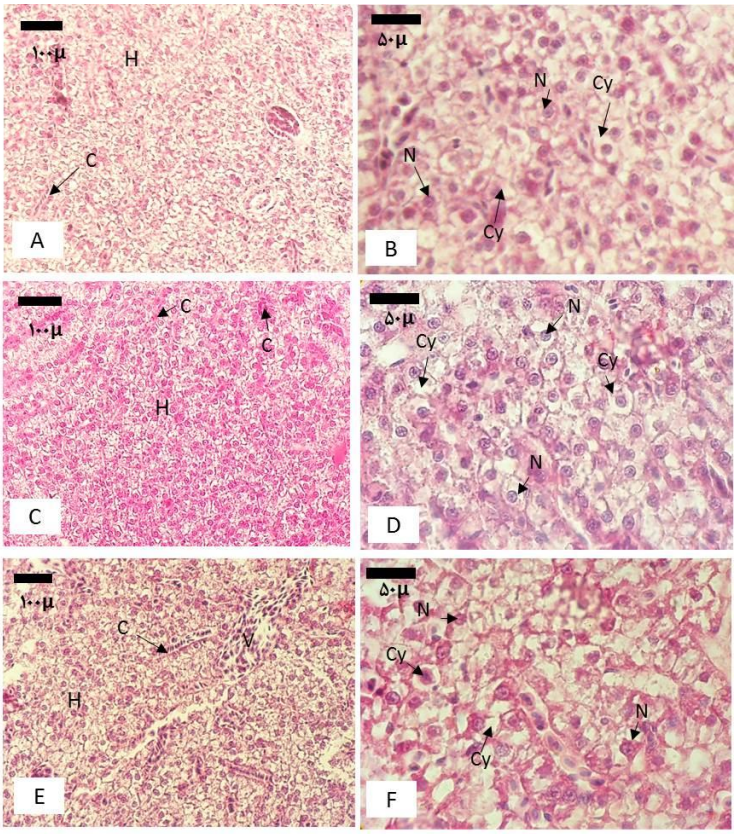


شکل ۱: تصاویر بافت شناسی از ابتدای روده گورخر ماهی (*D. rerio*) شاهد و تغذیه شده با اسانس زیره سبز. اشکال A و B تصاویر برش بافتی از روده گورخرماهی در تیمار شاهد، ویلی‌ها و فضای داخلی روده دیده می‌شوند. همچنین در بزرگنمایی بالاتر، ویلی‌ها، انتروسیت‌ها، لایه سروز، لایه ماهیچه‌ای، لایه زیر مخاط و مخاط در تصویر مشاهده می‌شوند. اشکال C و D تصاویر برش بافتی از روده گورخر ماهی در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰۰ mg/kg اسانس زیره سبز، ویلی‌ها و فضای داخلی روده و سلول‌های گابلت با تعداد کمتر نسبت به تیمار شاهد دیده می‌شوند. اشکال E و F تصاویر برش بافتی از روده گورخر ماهی در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰۰۰ mg/kg اسانس زیره سبز، بیشترین میزان عرض ویلی‌ها، کمترین میزان عرض کریپت‌ها و بیشترین تعداد سلول‌های گابلت مشاهده شدند.

CW: عرض کریپت (Crypt width)؛ E : انتروسیت (Enterocytes)؛ G: سلول گابلت (Goblet cell)؛ Lu: فضای داخلی لوله گوارش (Lumen)؛ M: مخاط (Mucosa)؛ Mu: لایه ماهیچه‌ایی (Muscularis)؛ S: سروز (Serosa)؛ SM: زیر مخاط (Sub-mucosa)؛ V: ویلی (Villi).

Figure 1: Beginning portion of zebrafish (controlled and fish fed on diet enriched with cumin essential oils) intestine. A and B, cross sections of the intestine in the control group, villi are visible in the lumen. With higher magnification, enterocytes, serosa, muscullaris, sub-mucosa and mucosa were seen. C and D, fish fed the diet enriched with cumin essential oils 500 mg/kg, villi are visible in the lumen and goblet cell number was lower than control treatment. E and F, fish fed the diet enriched with cumin essential oils 1000 mg/kg, the highest villi width, the lowest crypt width, and the highest number of goblet cells were observed.

در میان هپاتوسیت‌ها، مویرگ‌های سینوزوئیدی به همراه گلبول‌های قرمز مشاهده شد. قطر هسته سلول‌های کبدی در تیمار شاهد ۱۰/۵۷±۰۱/۶۹ µm اندازه‌گیری شد (شکل ۲-A و B).به طور کلی، قطر هسته سلول های کبدی در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰۰ mg/kg اسانس زیره سبز نسبت با تیمار شاهد اندکی بیشتر (شکل ۲-C و D) و این تغییرات در ماهیان پرورش یافته در تیمار حاوی ۱۰۰۰ mg/kg اسانس افزایش بیشتری نشان داد (شکل ۲-E و F). قطر سلول‌های کبدی در ماهیان شاهد ۲۳/۶۳±۴/۱۰ µm اندازه‌گیری شد (شکل ۲-B).



شکل ۲: تصاویر بافت شناسی کبد گورخر ماهی *D. rerio* شاهد و تغذیه شده با اسانس زیره سبز. اشکال A و B تصاویر برش بافتی کبد گورخر ماهی در تیمار شاهد، مویرگ‌ها و هپاتوسیت‌ها با ساختار منظم و هسته مرکزی در سیتوپلاسم مشاهده می‌شوند. اشکال C و Dتصاویر برش بافتی از کبد گورخرماهی در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰۰ mg/kg اسانس زیره، مویرگ‌ها و هپاتوسیت‌ها با ساختار منظم دیده می‌شوند، در ماهیان تغذیه شده با این تیمار عارضه هیستوپاتولوژیک مشخصی بافت کبد دیده نشد. اشکال E و Fتصاویر برش بافتی در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰۰۰ mg/kg اسانس زیره، رگ‌های خونی، مویرگ‌ها و هپاتوسیت‌ها دیده می‌شوند. واکوئله شدن، خارج شدن هسته از موقعیت مرکزی، افزایش اندازه هپاتوسیت‌ها و نکروز خفیف در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰۰۰ mg/kg اسانس زیره مشاهده شد.

C: مویرگ (Capillary)؛ Cy : سیتوپلاسم (Cytoplasm)؛ H: هپاتوسیت (Hepatocyte)؛ N: هسته (Nucleus)؛ V: سیاهرگ خونی (Vine).

Figure 2: Liver histology from zebrafish (controlled and fish fed on diet enriched with cumin essential oils). A and B, in the control group capillaries and normal arrangement of hepatocytes were observed. C and D, fish fed with cumin essential oils as fish diet additives 500 mg/kg, capillaries and normal arrangement of hepatocytes were observed. No histological abnormalities were observed. E and F, fish fed with cumin essential oils as fish diet additives 1000 mg/kg, vacuolation, hepatocyte enlargement and small necrosis were observed.

قطر سلول‌های کبدی در ماهیان تیمار شده با اسانس زیره سبز نسبت با تیمار شاهد افزایش یافت و این افزایش در ماهیان تیمار شده با غلظت بالای اسانس (µm ۶/۹۰±۲۹/۴۱) بیشتر بود (شکل ۲-D وF). همچنین واکوئله شدن، افزایش اندازه هپاتوسیت‌ها، خارج شدن هسته از موقعیت مرکزی و نکروز خفیف در برخی از ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی mg/kg ۱۰۰۰ اسانس زیره دیده شد.

نتایج آزمون واریانس یک طرفه نشان داد فقط قطر سلول‌های کبدی در ماهیان تیمار شده با جیره حاوی

۱۰۰۰ mg/kg اسانس با ماهیان شاهد و تیمار حاوی ۵۰۰ mg/kg اسانس اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($p<۰/۰۵$) و در دیگر فاکتورهای سنجیده شده اختلاف معنی‌داری دیده نشد.

بحث

روده به عنوان محل اصلی هضم و جذب مواد غذایی و کبد با ایفاء نقش در سوخت و ساز، ذخیره‌سازی چربی، گوارش و سم‌زدایی نقش مهمی در فرآیند تغذیه ایفاء می‌کنند (ستوده و همکاران، ۱۳۹۴). مجرای روده‌ای در مهره‌داران توسط یک لایه از سلول‌های اپی‌تلیومی پوشیده شده است. این لایه سلولی محافظی در برابر محیط بیرونی است و به صورت انتخابی برای جذب مواد غذایی، الکترولیت‌ها و آب عمل می‌کند در حالی که نسبت به ورود پاتوژن‌ها و آنتی‌ژن‌ها، مقاوم است (Peterson and Artis, 2014). این لایه همچنین یک میانجی در پاسخ های ایمنی است و در شناسایی پاتوژن‌ها از باکتری‌های همزیست دستگاه گوارش عمل می‌کند (Martin *et al.*, 2016). نتایج مطالعات بافت شناسی روده در ماهیان شاهد و ماهیان تغذیه شده با اسانس گیاه زیره سبز نشان داد به طور کلی اختلافات بافت شناسی کمی بین ماهیان تیمار شده با ماهیان شاهد وجود داشت و این اختلافات از نظر آماری معنی‌دار نبودند. در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی غلظت بالا و پایین اسانس زیره سبز، بلندی و عرض ویلی‌ها نسبت به ماهیان شاهد بیشتر شده بود در حالی که عرض کریپت‌ها کمی کاهش یافت. نتایج پژوهش‌های محققین نشان داده است که این تغییرات می‌تواند مرتبط با اثرات ضد باکتریایی اسانس و در نتیجه آن کاهش باکتری‌های پاتوژن و در نهایت صدمه کمتر به بافت اپی تلیومی روده باشد. نتایج تحقیقات انجام شده بر روی ماهی تترای‌دم زرد نیز نشان داد که استفاده از جیره حاوی اسانس گیاه پونه کوهی منجر به توسعه چین خورگی‌های روده‌ای می‌شود (Ferreira *et al.*, 2016). به طور کلی، افزایش سطح چین خوردگی‌های روده‌ای فرایند هضم و جذب را بهبود می بخشد و در نتیجه منجر به مصرف کارآمد تر مواد مغذی می‌شود. اسانس‌های گیاهی همچنین موجب بهبود وضعیت ایمنی بدن می‌شوند، در نتیجه موجب افزایش در دسترس قرار گرفتن مواد مغذی برای جذب در روده و در نهایت رشد بهتر می شوند (Franz *et al.*, 2010) در مطالعه حاضر اختلاف معنی داری بین تعداد سلول‌های گابلت در تیمار های مختلف دیده نشد، اگرچه تعداد سلول‌های گابت در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰۰۰ mg/kg اسانس نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. ترشحات سلول‌های گابلت محافظی را برای سلول‌های اپی تلیومی فراهم می‌کند، همچنین این سلول‌ها اصطکاک لوله گوارشی را کاهش می‌دهند و حرکت مواد غذایی را در دستگاه گوارش تسهیل می‌کنند (Faccioli *et al.*, 2014). تحقیقات مختلف نشان داده اند که تعداد و عملکرد سلول‌های گابلت در شرایط مختلف تغییر می‌کند. برای مثال، مقدار ترشح مواد موکوسی در زمان افزایش بار میکروبی بیشتر می‌شود (Kandori *et al.*, 1996). همچنین برخی محققین بیان نمودند، وجود انگل‌های گوارشی سبب افزایش تعداد سلول‌های گابلت می‌شوند (Khan and Collins, 2004; Ishikawa *et al.*, 1997). در پژوهش حاضر کاهش تعداد سلول های گابلت در تیمار حاوی غلظت کمتر اسانس (۵۰۰ mg/kg) می‌تواند نشان‌دهنده اثر بخشی اسانس زیره سبز در کنترل میکروارگانیسم‌ها و پارازیت‌های روده‌ای باشد. Ghazanfari و همکاران (۲۰۱۵) نیز نشان دادند استفاده از روغن گشنیز در جیره غذایی موجب کاهش تعداد سلول‌های گابلت در روده می شود که نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر تایید کننده نتایج این محققین است. نکته قابل توجه آن است که در تیمارهای حاوی غلظت بالای اسانس تعداد گابلت نسبت به تیمار حاوی غلظت کمتر اسانس بیشتر بود. به طور کلی، استفاده از اسانس‌های گیاهی در جیره‌های غذایی دارای یک غلظت بهینه است که باید بررسی و تعیین شود. برای مثال، Dušan و همکاران (۲۰۰۶) اثرات ضد باکتریایی و همچنین سیتوتوکسی‌سیتی چند اسانس گیاهی (دارچین، میخک، پونه کوهی و آویشن) مختلف را در شرایط آزمایشگاهی بر محیط کشت باکتری و سلولی مطالعه کردند. نتایج این محققین نشان داد اگرچه غلظت‌های

بالای اسانس‌ها می‌تواند رشد باکتری‌ها را کاملاً متوقف کند، ولی اثرات سیتوتوکسیک آنها نیز زیاد است. در حالیکه در غلظت‌های پایین‌تر اثرات سلول‌کشی کمتری مشاهده شد. این محققین نتیجه‌گیری کردند برای آنکه بتوان بهترین کارایی را از اسانس‌ها گرفت، باید غلظتی استفاده نمود که علاوه بر داشتن خاصیت باکتری‌کشی، اثرات سیتوتوکسیک آن در کمترین حالت ممکن باشد (Dušan *et al.*, 2006).

در این تحقیق، بررسی ساختار سلول‌های کبدی نشان داد هپاتوسیت‌ها در تیمار شاهد و حاوی ۵۰۰ mg/kg اسانس دارای ساختار نرمال با لوبول‌های منظم می‌باشند که هسته‌ها در مرکز سلول قرار گرفته است و نشان‌دهنده سلامت کبد می‌باشد. مطالعه تغییرات بافت شناسی کبد می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد کیفیت جیره، سوخت و ساز بدن و وضعیت تغذیه‌ای ماهی ارائه دهد (ستوده و همکاران، ۱۳۹۴). در پژوهش حاضر با افزایش میزان اسانس در جیره غذایی قطر هپاتوسیت‌ها افزایش بیشتری یافت و اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد. همچنین در برخی از بخش‌ها هپاتوسیت‌ها ساختار نرمال خود را از دست دادند و هسته از موقعیت مرکزی خودش خارج شد. بررسی ماهی *Astyanax altiparanae* نیز نشان داده است که در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی اسانس پونه کوهی اندازه هپاتوسیت‌ها نسبت به ماهیان شاهد بزرگتر بوده است و محققین علت آن را ترکیبات فلاونوییدی موجود در اسانس پونه کوهی ذکر کردند که به دلیل خواص هیپوگلیسیمیک منجر به افزایش ذخیره گلیکوژن کبدی و بزرگ شدن اندازه هپاتوسیت‌ها می‌شود (Ferreira *et al.*, 2016). در تحقیق حاضر نیز افزایش اندازه هپاتوسیت‌ها را می‌توان به دلیل نقش اسانس زیره سبز در کاهش قند خون و به موجب آن افزایش میزان ذخیره گلیکوژن در هپاتوسیت‌ها دانست. اسانس زیره سبز نیز به دلیل داشتن ترکیبات مختلفی از قبیل کومین آلدهید یا ۴- ایزوپروپیل بنز آلدهید می‌تواند به عنوان مهار کننده آلدوز ردکتاز و آلفا گلوکوزیداز عمل نماید و در نتیجه منجر به کاهش قند خون شود (محیطی اردکانی و همکاران، ۱۳۹۰).

به طور کلی، با توجه به افزایش نسبت توسعه لایه مخاطی به سروزی و همچنین کاهش تعداد سلول‌های گابلت در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰۰ mg/kg اسانس زیره سبز بنظر می‌رسد استفاده از غلظت‌های پایین اسانس در جیره می‌تواند منجر به بهبود ویژگی‌های هیستولوژیک دستگاه گوارش گورخر ماهی شود. البته شایان ذکر است از آنجایی که در مطالعه حاضر شاخص‌های رشد و بقاء در ماهیان مطالعه نشده‌اند، نمی‌توان به نقش استفاده از اسانس زیره سبز بر بهبود شاخص‌های پرورشی بحث نمود و نیازمند مطالعات تکمیلی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه زابل بخاطر تأمین هزینه اجرای این تحقیق (شماره پژوهانه : UOZ-GR-9517-45) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

حقیرالسادات، ب.ف.، وحیدی، ع.ر.، صبور، م.ح.، عظیم زاده م.، کلانتر، س.م. و شرف الدینی، م. ۱۳۹۰. بررسی ترکیبات مؤثره و خواص آنتی اکسیدانی اسانس گیاه دارویی زیره سبز (*Cuminum cyminum* L) بومی استان یزد. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ۲ (۴): ۴۸۱-۴۷۲.

دانشمندی، س.، سلیمانی، ن.، مرتضی، ستاری، م. و پورفتح اله، ع.ا. ۱۳۸۹. اثرات متقابل دارویی و فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سبز. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک، ۱۳ (۲): ۸۲-۷۵.

ستوده، ا.، عابدیان کناری، ع.، خدابنده، ص. و اوجی فرد، ا. ۱۳۹۴. تغییرات بافت شناسی دستگاه گوارش و ترکیب اسیدهای چرب ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) در اثر تغذیه با سطوح مختلف اسیدهای چرب ضروری EPA و DHA و ویتامین D جیره. مجله بوم شناسی آبزیان، ۵ (۳): ۱۳۸-۱۲۴.

شیخ اسدی، م.، ذریه زهرا، ج.، رفیعی پور، ا.، یزدان پناه گوهرریزی، ل.، سیرپور، ق. ۱۳۹۷. تأثیر افزودن سطوح مختلف مکمل پودر زیره سبز (*Cuminum cyminum*) بر شاخص‌های رشد، بازماندگی و ترکیبات شیمیایی لاشه میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*). مجله علمی شیلات ایران. ۲۷ (۳) :۱۳۰-۱۲۱. DOI: 10.22092/ISFJ.2018.117059

عنایت غلامپور، ط.ع.، جعفری، و.، ایمانپور، م.ر. و کلنگی میاندره، ح. ۱۳۹۵. تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه پنج انگشت (*Vitex* agnus-castus L.) بر شاخص های رشد و نسبت بقا در گورخر ماهی (*Danio rerio*). یافته های نوین در علوم زیستی، ۳ (۴): ۲۶۹-۲۷۸. DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.4.269

کریمی پاشاکی، ع.، قاسمی، م.، ذریه زهرا، ج.، شریف روحانی، م.، حسینی، س. م. ۱۳۹۷. تأثیر مصرف خوراکی عصاره آبی- الکلی برگ زیتون در عملکرد رشد و برخی از فراسنجه‌های خونی و ایمنی در بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران. ۲۷ (۲) :۸۰-۷۱. DOI: 10.220092/ISFJ.2018.116698

محیطی اردکانی، ج.، زهرا اکبریان، ا.، ابوالفضل نظریان، ا. ۱۳۹۰. تاثیراسانس زیره سبز بر میزان گلوکز و لیپیدهای خون در موش‌های صحرایی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد. ۱۹(۳): ۴۸۱-۴۷۲.

Acar, Ü., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., Gültepe, N. and Türker, A., 2015. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against Streptococcus iniae. *Aquaculture*, 437: 282-286. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.12.015.

Álvarez, A., García, B.G., Jordán, M.J., Martínez-Conesa, C. and Hernández, M.D., 2012. The effect of diets supplemented with thyme essential oils and rosemary extract on the deterioration of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during storage on ice. *Food Chemistry*, 132(3): 1395-1405. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.127.

Amerah, A.M. and Ouwehand, A.C., 2016. Use of essential oils in poultry production. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 101-110. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00010-9.

Banerjee, G. and Ray, A.K., 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Research in Veterinary Science*, 115: 66-77. DOI: 10.1016/j.rvsc.2017.01.016.

Dušan, F., Marián, S., Katarína, D. and Dobroslava, B., 2006. Essential oils their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in Vitro*, 20(8): 1435-1445. DOI: 10.1016/j.tiv.2006.06.012.

Faccioli, C.K., Chedid, R.A., do Amaral, A.C., Vicentini, I.B.F. and Vicentini, C.A., 2014. Morphology and histochemistry of the digestive tract in carnivorous freshwater *Hemisorubim platyrhynchos* (Siluriformes: Pimelodidae). Micron, 64: 10-19. DOI: 10.1016/j.micron.2014.03.011.

Ferreira, P.M., Caldas, D.W., Salaro, A.L., Sartori, S.S., Oliveira, J.M., Cardoso A.J. and Zuanon, J.A., 2016. Intestinal

and liver morphometry of the Yellow Tail Tetra (*Astyanax altiparanae*) fed with oregano oil. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 88(2): 911-922. DOI: 10.1590/0001-3765201620150202.

Franz, C., Baser, K.H.C. and Windisch, W., 2010. Essential oils and aromatic plants in animal feeding–a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5): 327-340. DOI: 10.1002/ffj.1967.

Ghazanfari, S., Mohammadi, Z. and Adib Moradi, M., 2015. Effects of Coriander essential oil on the performance, blood characteristics, intestinal microbiota and histological of broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 17(4): 419-426. DOI: 10.1590/1516-635X1704419-426.

Gulec, A.K., Danabas, D., Ural, M., Seker, E., Arslan, A. and Serdar, O., 2013. Effect of mixed use of thyme and fennel oils on biochemical properties and electrolytes in rainbow trout as a response to *Yersinia ruckeri* infection. *Acta Veterinaria Brno*, 82(3): 297-302. DOI: 10.2754/avb201382030297.

He, W., Rahimnejad S., Wang, L., Song K., Lu, K. and Zhang, C., 2017. Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 70:164-173. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.09.007.

Ishikawa, N.A.O.T.O., Wakelin, D.E.R.E.K. and Mahida, Y.R., 1997. Role of T helper 2 cells in intestinal goblet cell hyperplasia in mice infected with *Trichinella spiralis*. Gastroenterology, 113(2):542-549. DOI: 10.1053/gast.1997.v113.pm9247474.

Jamroz, D., Wertelecki, T., Houszka, M. and Kamel, C., 2006. Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90(5-6): 255-268. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2005.00603.x.

Kandori, H., Hirayama, K., Takeda, M. and DOI, K., 1996. Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. *Experimental Animals*, 45(2): 155-160. DOI: 10.1538/expanim.45.155.

Khan, W.I. and Collins, S.M., 2004. Immune-mediated alteration in gut physiology and its role in host defense in nematode infection. *Parasite Immunology*, 26(8-9): 319-326. DOI: 10.1111/j.0141-9838.2004.00715.x.

Kisielinski, K., Willis, S., Prescher, A., Klosterhalfen, B. and Schumpelick, V., 2002. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2(3): 131-135. DOI: 10.1007/s102380200018.

Martin, S.A., Dehler, C.E. and Król, E., 2016. Transcriptomic responses in the fish intestine. *Developmental and Comparative*

Immunology, 64:103-117. DOI: 10.1016/j.dci.2016.03.014.

Mortoja, R., Mortoja-Pierson, M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Paris: Masson et Cie. 345P.

Peterson, L.W. and Artis, D., 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. Nature. Reviews. *Immunology*, 14, 141e153. DOI: 10.1038/nri3608.

Sabzi, E., Mohammadiazarm, H. and Salati, A.P., 2017. Effect of dietary l-carnitine and lipid levels on growth performance, blood biochemical parameters and antioxidant status in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 480: 89-93. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.08.013.

Xu, Y.T., Liu, L., Long, S.F., Pan, L. and Piao, X.S., 2018. Effect of organic acids and essential oils on performance, intestinal health and digestive enzyme activities of weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 235: 110-119. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2017.10.012.

Zheng, Z.L., Tan, J.Y., Liu, H.Y., Zhou, X.H., Xiang, X. and Wang, K.Y., 2009. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 292(3): 214-218. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.025.

The gastrointestinal histological changes in zebra fish (*Danio rerio*) fed with cumin (Cuminum cyminum) essential oils

Shahriari Moghadam M.[1*], Ahmadifar E.[2]

[*]mohsen.shahriari@uoz.ac.ir

1-Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol
2-Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol

Abstract

Present study was conducted to investigate the effects of cumin (*Cuminum cyminum*) essential oil on the intestine and liver tissues of zebra fish. Essential oil was added to the diet in two concentrations (500 and 1000 mg/kg) and at the end of the experiment (8 weeks) histological studies were performed. The results showed that villus height and width, absorption surface area of the intestinal mucous membrane surface, diameters of hepatocyte and their nucleus in the fish that fed with the essential oils were higher than control treatment, while the crypt depth decreased compared with the control. In fish grown with diet containing 1000 mg/kg, the number of goblet cells increased compared with control group, while in fish fed with the lower concentrations, the number of them was lower. Despite the observed changes in the measured parameters just the diameters of the hepatocytes in fish fed with diets containing 1000 mg/kg essential oils showed a significant difference and the size of these cells was larger than other treatments. In general, due to the increase in the absorption surface area and decrease in the number of goblet cells in fish fed with diet containing 500 mg/kg essential oil it seems that the use of low concentrations of essential oils can improve the histological characteristics of the digestive tract.

Keywords: Cumin, Goblet Cell, Hepatocyte, Intestine, Zebra Fish

[*]Corresponding author