

اثر ترمیمی عصاره هیدروالکلی زعفران بر آسیب کبدی ناشی از پاراکوات در موش آزمایشگاهی

شیما پدرپور واجارگاه^۱، دکتر فرح فرخی*^۲

۱- کارشناس ارشد بافت شناسی و جنین شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. ۲- دکتری علوم تشریح، دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: پاراکوات به عنوان علف کش گیاهی، محرک قوی در تشکیل آنیون‌های سوپر اکسید است. با توجه به عوارض مضر رادیکال‌های آزاد حضور ترکیبات مفید مانند زعفران به دلیل دارا بودن اثر آنتی‌اکسیدانی و از بین برنده رادیکال‌های آزاد، ضروری به نظر می‌رسد. این مطالعه به منظور تعیین اثر ترمیمی عصاره هیدروالکلی زعفران بر آسیب کبدی ناشی از پاراکوات در موش آزمایشگاهی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۳۶ سر موش سوری نر به‌طور تصادفی به ۶ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل آب و غذای معمولی و ۱/۵ ml روغن ذرت، گروه‌های دوم و سوم به ترتیب پاراکوات با غلظت ۲۰ و ۴۰ mg/kg/bw در روغن ذرت، گروه چهارم عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت ۸۰ mg/kg/bw، گروه پنجم و ششم به ترتیب پاراکوات با غلظت ۲۰ و ۴۰ mg/kg/bw را به همراه زعفران با غلظت ۸۰ mg/kg/bw به صورت گاوژ دریافت کردند. بعد از ۳۰ روز تیمار و بیهوش نمودن موش‌ها، خون‌گیری از قلب برای مطالعه مالون دی آلدئید (MDA)، آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) انجام شد. سپس کبد از بدن جدا و نیمی از بافت کبد برای سنجش اکسایشی و نیمی دیگر برای مطالعات بافتی به فرمالین انتقال یافت.

یافته‌ها: در کبد موش‌های تیمار شده با پاراکوات، سیروز شدید کبدی، تخریب هیاتوسیت‌ها و التهاب و نیز افزایش آماری معنی‌داری در میزان MDA و آنزیم‌های AST و ALT مشاهده شد ($P < 0/05$). زعفران موجب کاهش معنی‌دار میزان MDA و آنزیم‌های ALT و AST در مقایسه با موش‌های تیمار شده با پاراکوات گردید ($P < 0/05$). همچنین در کبد موش‌های تیمار شده با زعفران تخریب کبدی کاهش یافت. **نتیجه‌گیری:** مصرف زعفران در حد معمول (۸۰ mg/kg/bw) می‌تواند اثرات سوء ناشی از سموم علف‌کش مثل پاراکوات را کاهش دهد.

کلید واژه‌ها: کبد، زعفران، پاراکوات، التهاب، آنزیم‌های کبدی، موش

* نویسنده مسؤول: دکتر فرح فرخی، پست الکترونیکی f.farokhi@urmia.ac.ir

نشانی: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تلفن ۰۴۴-۳۲۷۷۶۷۰۷، شماره ۳۲۷۵۲۷۴۶

وصول مقاله: ۱۳۹۶/۲/۱۱، اصلاح نهایی: ۱۳۹۶/۹/۴، پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۹/۲۷

شیما پدرپور واجارگاه، <https://orcid.org/0000-0002-9018-9964>، دکتر فرح فرخی <https://orcid.org/0000-0001-8688-1491>

مقدمه

اندام‌هایی مانند سیستم اعصاب مرکزی، کبد، کلیه، چشم و سیستم ایمنی مشکلاتی ایجاد نماید. این ماده شیمیایی می‌تواند سلامت انسان، حیوانات و حتی موجودات آبی را به خطر بیناندازد (۲). مکانیسم احتمالی سمیت پاراکوات در سیستم‌های بیولوژیکی به‌وسیله Bus و همکاران بررسی شده است. واکنش احیا اکسیژن منفرد (Single Oxygen Resuscitation) باعث تخلیه NADPH سلولی و تولید آنیون سوپر اکسید و ترکیبات اصلی می‌شود. آنیون سوپر اکسید به هیدروژن پراکسید و رادیکال‌های هیدروژنی و اکسیدان‌های به شدت قوی تبدیل شده که می‌تواند به پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و اسیدهای نوکلئیک آسیب برساند. رادیکال‌های هیدروکسیل باعث افزایش فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز شده که این عمل نیز باعث افزایش مصرف گلوکوتایون می‌شود (۳).

علف‌کش‌ها موادی هستند که تاثیرات زیادی بر روی گونه‌ها و جمعیت‌های حیات وحش دارند. بسیاری از آلوده کننده‌های محیطی قادرند سیستم‌های درون‌ریز حیوانات را برهم بزنند و بر تکوین و تولید مثل آنها اثر گذارند (۱). پاراکوات (گرااماکسون) یک علف‌کش تماسی گیاهی است. پاراکوات قادر است از راه دهان یا تماس با پوست جذب بدن شده و در صورت تماس با مقادیر زیاد می‌تواند ظرف مدت ۳/۵ ساعت انسان را بکشد. اثر سمی پاراکوات در انسان و حیوانات به صورت حاد و مزمن ظاهر می‌شود. در حالت حاد علت اصلی مرگ ایست تنفسی بوده و موجب ناتوانی و آسیب در کبد، کلیه، قلب، غدد فوق کلیه، طحال و اعصاب مرکزی می‌گردد. در حالت مزمن نیز می‌تواند در

شد. سپس پلیت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا الکل آن تخییر شود. پودر حاصله را وزن کردیم و تا زمان استفاده داخل فویل آلومینیومی و در یخچال نگهداری شد. عصاره در محل آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه تهیه گردید.

گروه بندی حیوانات: موش‌ها بعد از یک هفته انطباق با محیط مرکز نگهداری به‌طور تصادفی در ۶ گروه ۶ تایی به شرح زیر تقسیم‌بندی شدند (۸).

گروه اول (کنترل): دریافت کننده آب و غذای معمولی به همراه ۱/۵ ml روغن ذرت.

گروه دوم: دریافت کننده پاراکوات با غلظت ۲۰ mg/kg/bw حل شده در ۱/۵ ml روغن ذرت.

گروه سوم: دریافت کننده پاراکوات با غلظت ۴۰ mg/kg/bw حل شده در ۱/۵ ml روغن ذرت.

گروه چهارم: دریافت کننده عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت ۸۰ mg/kg/bw حل شده در ۱/۵ ml روغن ذرت.

گروه پنجم: دریافت کننده پاراکوات با غلظت ۲۰ mg/kg همراه با عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت ۸۰ mg/kg/bw

گروه ششم: دریافت کننده پاراکوات با غلظت ۴۰ mg/kg همراه با عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت ۸۰ mg/kg/bw

برای رقیق نمودن پاراکوات که یک علف کش روغنی بود؛ از روغن ذرت استفاده شد. تیمار تمام گروه‌ها به مدت ۳۰ روز و در ساعات مشخص (۸ صبح هر روز)، به صورت گاوآذ دهانی برای تمامی گروه‌ها انجام شد (۹). نیمی از موش‌های تیمار شده با پاراکوات تلف شدند و تعداد موش‌های باقیمانده نهایی و جایگزین شده در این گروه‌ها ۶ سر بود.

بعد از پایان تیمار موش‌ها به‌وسیله کتامین - زایلازین به‌صورت تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند. سپس شکم حیوانات باز شد و سریعاً خون‌گیری از قلب موش‌ها انجام گردید. نمونه خون بلافاصله با دور ۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سرم حاصله تا زمان اندازه‌گیری AST و ALT در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

نیمی از بافت کبد در فویل آلومینیومی قرار داده شد و برای سنجش مالون دی‌آلدئید، کاتالاز و TAOC (سنجش اکسایشی) به دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. نیمی دیگر از بافت کبد برای مطالعات بافتی جدا شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق به فرمالین ۱۰ درصد انتقال یافت. بعد از تثبیت بافت و آبگیری به‌وسیله الکل و شفاف‌سازی در گزلیل و تهیه بلوک‌های پارافینی مقطعی به قطر ۶ میکرون تهیه و بعد از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین - اتوزین توسط میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan, model CHD) مطالعه گردید. از هر گروه ۶ سر موش و از هر موش ۴ اسلاید با

باتوجه به عوارض سوء رادیکال‌های آزاد حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی ضروری به‌نظر می‌رسد. آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با کاهش سرعت اکسیداسیون، دوره اکسیداسیون کند را افزایش می‌دهند. این مواد ممکن است به‌طور طبیعی مانند آنتوسیانین (Anthocyanin) در گلبرگ زعفران وجود داشته باشند و یا به‌صورت سنتزی به ماده غذایی اضافه شوند (۴ و ۵). زعفران و مواد موثره آن اثرات ضدتومور، آنتی‌اکسیدانی و از بین برنده رادیکال‌های آزاد، تقویت‌کننده حافظه، ضد درد و التهاب، پایین آورنده فشارخون و چربی خون دارد (۶). طعم تلخ زعفران ناشی از وجود ماده‌ای بنام پیکروکروسین است. این ماده بر اثر تجزیه حرارتی یا آنزیمی به آلدئیدی به‌نام سافرئال تبدیل می‌شود. کروسین‌ها مسؤل رنگ زعفران هستند. کاروتنوئیدهای دیگری مانند کروسین، کروستین، سافرئال مواد موثره اصلی زعفران هستند که اثرات از بین برنده رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدانی دارند (۶). برخی از خواص زعفران به علت وجود کاروتنوئیدهاست که اثرات محافظتی خود را توسط تعدیل پراکسیداسیون لیبید - آنتی‌اکسیدان‌ها و سیستم خنثی‌کننده سموم اعمال می‌نمایند. کاهش معنی‌دار در اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها در بیماران با بیماری سرخرگ کرونر، پتانسیل زعفران را به عنوان یک آنتی‌اکسیدان نشان داده است (۷). به دلیل عوارض مضر سموم به‌خصوص پاراکوات که می‌تواند سبب ایجاد رادیکال آزاد و آسیب در هپاتوسیت‌های کبدی گردد؛ در این مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی زعفران بر روی آسیب ایجاد شده در کبد موش‌های سوری نر که با پاراکوات تیمار شدند؛ ارزیابی شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی ۳۶ سر موش سوری نر در دامنه وزنی ۲۸-۳۰ گرم انتخاب شدند. موش‌ها از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات دانشکده علوم دانشگاه ارومیه در سال ۱۳۹۴ تهیه شدند. حیوانات با رژیم غذایی استاندارد (غذای پلیت استاندارد و دسترسی آزاد به آب و غذا در شرایط اتاق، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی) نگهداری شدند. قبل از شروع تیمار موش‌ها به مدت ۷ روز به منظور سازگاری در شرایط محیط قرار گرفتند.

طرز تهیه عصاره هیدروالکلی زعفران: برای تهیه عصاره هیدروالکلی زعفران ۳ گرم زعفران فائات تولید سال ۱۳۹۴ با نشان سحرخیز خریداری و پس از تایید کارشناسان دانشگاه ارومیه (هرباریوم ۴۸۴۵) با آسیاب دستی پودر شد. بعد از انتقال به ارلن، با اضافه نمودن ۱۷۰ سی‌سی اتانول ۹۶ درصد و ۸۰ سی‌سی آب و انتقال بر روی شیکر به مدت ۱۰ ساعت، محتویات درون ارلن با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد و مایع حاصل در پلیت‌هایی که قبلاً به‌وسیله الکل ضد عفونی شده بود؛ انتقال داده

محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به لوله آزمایش منتقل گردید و ۳ میلی لیتر معرف FRAP به آن اضافه شد و در بن ماری ۳۷ درجه به مدت ۱۰-۷ دقیقه انکوبه گردید. جذب کمپلکس آبی رنگ در ۵۹۳ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر خوانده شد. مقادیر بر حسب $m \text{ mol / mgr tissue}$ بیان گردید (۱۰). میزان سمیت هر علف کش به تجمع بافتی، نوع و ساختار ماده مورد مطالعه و برهمکنش این ماده با جانور در معرض سم بستگی دارد. با توجه به این که کبد محل اصلی ذخیره مواد سمی است؛ لذا با افزایش استرس اکسیداتیو که ناشی از افزایش غلظت سم است؛ غشای کبد به دلیل متورم شدن و اکوتل های آن از هم گسیخته شده و باعث ایجاد آسیب های شدید کبدی می گردد (۱۱).

روش تجزیه و تحلیل داده ها: داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-22 و آزمون یک طرفه ANOVA و تست تعقیبی Tukey در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها

نتایج بیوشیمیایی حاصل از اندازه گیری کاتالاز، MDA، TAOC، AST و ALT در جدول یک آمده است.

در تمامی گروه ها به غیر از گروه چهارم (دریافت کننده عصاره هیدروالکلی زعفران) افزایش معنی دار میزان AST ($1/21 \pm 26/94$) نسبت به گروه کنترل ($29/97 \pm 2/32$) مشاهده شد ($P < 0/05$). بیشترین میزان AST مربوط به گروه سوم (دریافت کننده دوز بالای پاراکوات) بود. در گروه دوم (دریافت کننده دوز کم پاراکوات) نیز این افزایش معنی دار بود ($P < 0/05$). در حالی که مقدار AST در گروه های پنجم و ششم (دریافت کننده همزمان پاراکوات و عصاره هیدروالکلی زعفران) در مقایسه با گروه های دوم و سوم به طور معنی داری کاهش نشان داد ($P < 0/05$).

میزان ALT در گروه چهارم ($2/49 \pm 63/41$) نسبت به گروه کنترل ($2/18 \pm 67/19$) کاهش غیر معنی داری یافت و این میزان در سایر گروه ها افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P < 0/05$). بیشترین میزان ALT مربوط به گروه سوم ($5/64 \pm 163/41$) تعیین شد. در گروه های پنجم و ششم کاهش معنی دار ALT نسبت به گروه های دوم و سوم دیده شد.

نتایج به دست آمده از تست TAOC نشان داد که بیشترین مقدار مربوط به گروه چهارم ($0/64 \pm 11/60$) بود و در سایر گروه ها کاهش معنی دار TAOC نسبت به گروه کنترل ($0/58 \pm 9/08$) دیده شد ($P < 0/05$). در گروه های دریافت کننده پاراکوات مقدار TAOC از همه گروه ها کمتر بود. در حالی که در گروه های پنجم و ششم افزایش معنی دار ظرفیت آنتی اکسیدانی دیده شد ($P < 0/05$).

در تمامی گروه ها کاهش معنی دار کاتالاز نسبت به گروه کنترل ($2/33 \pm 16/70$) دیده شد ($P < 0/05$). در گروه های دوم و سوم مقدار کاتالاز از همه گروه ها کمتر بود. در حالی که گروه های پنجم و

مقاطع ممتد تهیه و مطالعه گردید. رویت کانون التهاب در بافت کبدی بیانگر فعال شدن مکانیسم دفاعی بدن علیه تخریب در نظر گرفته شد (۹).

سنجش میزان مالون دی آلدئید (MDA): درجه پراکسیداسیون لیپیدها بر مبنای میزان تشکیل مالون دی آلدئید تعیین می شود. MDA محصول نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب است و با تیوباریوتوریک اسید وارد واکنش شده و تولید کمپلکس رنگی می نماید. اساس روش، اندازه گیری اسپکتوفتومتری یک رنگ ایجاد شده است. در این روش نمونه بافت کبد وزن گردید و ۱۰ درصد وزن/حجم به آن بافر فسفات اضافه و در هاون کوبیده شد. سپس هموژنای تهیه شده به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ۱۵۰ میکرولیتر از محلول رویی را برداشته و به لوله آزمایش منتقل نمودیم. سپس ۳۰۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به لوله آزمایش منتقل و با ۳۰۰ میکرولیتر از تیوباریوتوریک اسید ۰/۶۷ درصد درمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد برای ۲۵ دقیقه انکوبه شد. ۵ دقیقه بعد از خنک شدن محلول، رنگ صورتی ناشی از واکنش مالون دی آلدئید با تیوباریوتوریک اسید ظاهر و با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر در مقابل بلانک ارزیابی گردید. میزان مالون دی آلدئید به کمک ضریب جذبی مالون دی آلدئید محاسبه و به صورت nmol/gr tissue بیان شد (۱۰).

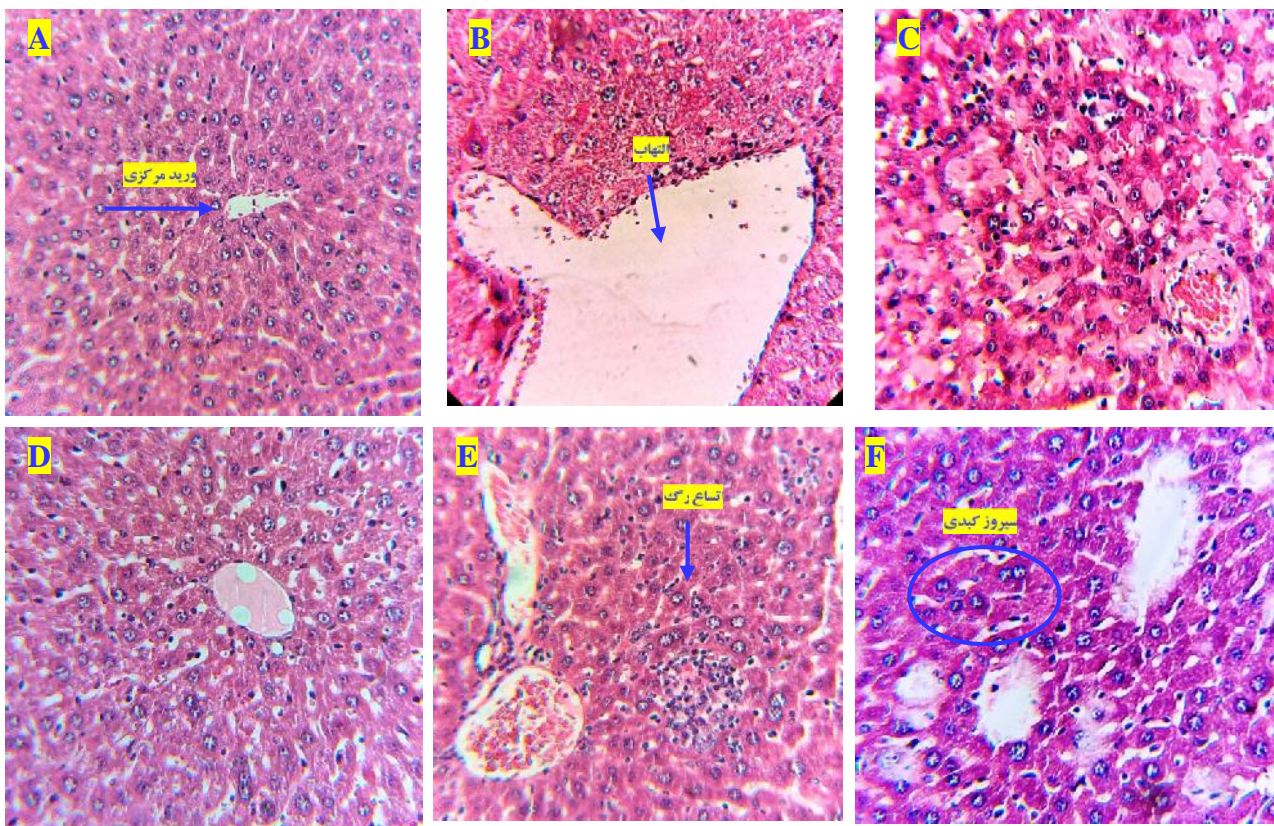
سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: فعالیت کاتالاز بر اساس توانایی آن در تجزیه پراکسید هیدروژن تعیین گردید. تجزیه پراکسید هیدروژن با کاهش جذب در طیف جذبی ۲۴۰ نانومتر قابل بررسی است. نمونه بافت کبد وزن گردید و ۱۰ درصد وزن/حجم در آن بافر فسفات ریخته شد و در هاون قرار گرفته در محیط یخ کوبیده شد. محلول هموژنای بافتی تهیه شده به مدت ۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعدی ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی سانتریفیوژ شده به ۲/۸ میلی لیتر بافر فسفات اضافه گردید و پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آب اکسیژنه، جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. در پایان مقادیر بر حسب U/gr tissue ($U = \mu\text{mol}$) بیان شد (۱۰).

سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (TAOC): ظرفیت آنتی اکسیدانی تام توسط تست FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) بررسی گردید. ارزیابی تغییر در جذب ۵۹۳ نانومتر به واسطه تشکیل ترکیب FeII-Tripyridylhiazine آبی رنگ از FeIII اکسید شده بی رنگ اندازه گیری شد. برای تهیه هموژنای بافت، ۱۰ درصد وزن/حجم بافت کبد، KCl اضافه گردید و در هاون کوبیده شد. سپس هموژنای تهیه شده با دور ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. از

جدول ۱: تغییرات آمینوترانسفرازهای سرمی (ALT و AST) و سنجش اکسایشی (کاتالاز، FRAP، MDA) بافت کبد موش‌های سوئی نر گروه‌های مورد مطالعه میانگین و انحراف معیار

ALT (mg/dl)	AST (mg/dl)	MDA (nmol/gr tissue)	TAOC (mmol/mgr)	کاتالاز (μ mol /gr tissue)	
67/19±2/18	29/97±2/32	1/67±0/16	9/08±0/58	16/70±2/33	گروه اول
217/99±6/46*	62/33±6/33*	4/64±0/36*#	*#4/82±0/40	11/20±1/91*	گروه دوم
260/13±8/65*	74/35±3/85*	5/51±0/26*	14/05±0/31*	4/62±6/90*	گروه سوم
63/41±2/49	26/94±1/21*	2/04±0/32	11/60±0/64*	11/05±1/18*	گروه چهارم
116/61±6/89#*	48/07±1/85#*	3/82±0/14#*	5/55±0/26#*	14/60±1/89#*	گروه پنجم
163/41±5/64#*	61/67±2/90#*	4/15±0/28	5/27±0/55#*	10/40±1/50#*	گروه ششم

گروه اول (کنترل)؛ گروه دوم (پاراکوات با غلظت 20 mg/kg/bw)؛ گروه سوم (پاراکوات با غلظت 40 mg/kg/bw)؛ گروه چهارم (عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت 80 mg/kg/bw)؛ گروه پنجم (پاراکوات با غلظت 20 mg/kg/bw همراه با عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت 80 mg/kg/bw)؛ گروه ششم (پاراکوات با غلظت 40 mg/kg/bw همراه با عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت 80 mg/kg/bw) *P<0/05 در مقایسه با گروه کنترل؛ #P<0/05 در مقایسه با گروه تیمار شده با زعفران و پاراکوات



شکل ۱: مقطع عرضی از بافت کبد در گروه‌های مورد مطالعه (بزرگ‌نمایی 400x، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین) (A) کنترل؛ (B) گروه دوم (پاراکوات با غلظت 20 mg/kg/bw)؛ (C) (پاراکوات با غلظت 40 mg/kg/bw) (D) (عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت 80 mg/kg/bw)؛ (E) (پاراکوات با غلظت 20 mg/kg/bw همراه با عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت 80 mg/kg/bw)؛ (F) (پاراکوات با غلظت 40 mg/kg/bw همراه با عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت 80 mg/kg/bw)

در مطالعه بافتی کبد گروه کنترل، دستجات هیاتوسیت ها به‌طور مرتب اطراف ورید مرکزی قرار گرفته بودند و شکل طبیعی خود را حفظ کرده و هیچگونه تخریب بافتی مشاهده نگردید. در حیوانات گروه دریافت کننده دوز کم پاراکوات، التهاب مشاهده گردید. در موش‌های گروه دریافت کننده دوز کم پاراکوات به همراه زعفران این التهاب بهبود یافته، اتساع عروقی و

ششم افزایش معنی‌دار کاتالاز دیده شد (P<0/05). در تمامی گروه‌ها به‌غیر از گروه چهارم افزایش معنی‌دار MDA نسبت به گروه کنترل (0/16±1/67) مشاهده شد (P<0/05). بیشترین مقدار MDA مربوط به گروه سوم (0/26±5/51) بود. گروه‌های پنجم و ششم کاهش معنی‌داری در میزان MDA نسبت به گروه‌های دوم و سوم نشان دادند (P<0/05).

می دهد (۱۲).

مکانیسم بیوشیمیایی سمیت پاراکوات نشان داده که تخلیه بدن از NADPH باعث افزایش تولید آنیون سوپر اکساید و ترکیبات مشابه مانند پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل شده می‌گردد و این مواد به‌ویژه رادیکال‌های هیدروکسیل موجب آسیب بافتی خواهند شد (۱۳). در مکانیسم‌های سمیت پاراکوات تولید رادیکال آزاد اکسیژن درگیر است که آن هم منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود. به طوری که بین ساختار رادیکال آزاد اکسیژن و سیستم آنتی‌اکسیدانی تعادل برقرار نمی‌شود. واکنش رادیکال آزاد اکسیژن با اسیدهای چرب اشباع نشده، منجر به تولید متابولیت‌های سمی آلدئیدی مثل MDA که محصول نهایی لیپیدپراکسیداسیون است؛ می‌گردد (۱۴). در این تحقیق هم گروه‌های دریافت‌کننده پاراکوات مقدار MDA نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان دادند. مطالعه بر روی ماهی نشان داده کلیه، کبد، مغز و آبشش ارگان‌های اصلی و قابل توجه هستند که تحت تأثیر انواع سموم قرار می‌گیرند. سموم روی هیپوتوسیت‌ها اثر داشته و سبب تخریب آنها می‌گردند (۱۵).

تاکون فواید مواد آنتی‌اکسیدانی در پیشگیری از بیماری‌های قلبی تا کاهش آسیب مغز و چشم به اثبات رسیده است. علاوه بر این آنتی‌اکسیدان‌ها جلوی عمل رادیکال‌های آزاد را گرفته و آنها را خنثی می‌کنند. لذا تامین ذخایر آنتی‌اکسیدان، به منظور کاهش آثار تنش اکسایشی امری مهم تلقی می‌شود (۱۶). ارزش کلاله خشک شده زعفران به علت وجود سه متابولیت ثانویه اصلی بنام کرووسین، پیکروکروسین و سافرانال است. زعفران به‌واسطه ترکیبات کاروتنوئیدی خود باعث تنظیم فعالیت پراکسیدازی لیپیدها، آنتی‌اکسیدان‌ها و سم‌زدایی می‌گردد (۷). کرووسین‌های زعفران با افزایش غیرمستقیم بیان mRNA آنزیم گاماگلو تامیل سیستینیل سنتتاز (GCG-Y) میزان گلو تاتیون احیا شده درون سلول را افزایش می‌دهند که در تنظیم فعالیت پراکسیدازی لیپیدها و آنتی‌اکسیدان‌ها نقش موثری دارد. زعفران با تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی موجب کاهش استرس‌های اکسیداتیو می‌گردد (۱۷). در مطالعه ای کروستین موجود در زعفران به علت اثر آنتی‌اکسیدانی سلول‌های کبدی موش صحرایی را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت کرده است (۱۲). کروستین یک فلاونوئید است که در انواع گیاهان یافت می‌شود و پتانسیل خوبی در جلوگیری از فیروز کبدی و کلیه دارد. کروستین طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی شامل آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب و ضد توموری دارد. با توجه به اثر مفید کروستین در حفاظت در برابر فیروز کبدی، ریه، پوست به‌طور قابل توجه ممکن است کروستین موجب منع فعالیت فیروبلاستی و همچنین فیروز کبدی در موش‌ها شود. کروستین ممکن است مانع فعالیت فیروبلاست‌های کشت شده و همچنین بهبود فیروز اندام در

کاهش ذخایر گلیکوژنی نیز در اغلب حیوانات مشاهده گردید. در همه حیوانات دریافت‌کننده دوز بالای پاراکوات سیروز شدید کبدی و تخریب هیپوتوسیت‌ها و در تعدادی از موش‌ها التهاب نیز مشاهده گردید. در اغلب حیوانات گروه دریافت‌کننده دوز بالای ۴۰ mg/kg پاراکوات به همراه زعفران، تخریب کبدی کاهش یافته بود و در تعدادی از موش‌ها آثار التهاب دیده شد. در همه حیوانات گروه دریافت‌کننده زعفران خالص، ساختار بافتی کبد طبیعی و مشابه گروه کنترل بود (شکل یک).

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، عصاره هیدروالکلی گیاه زعفران (۸۰ mg/kg/bw) سبب کاهش صدمات بافتی کبد ناشی از علف کش پاراکوات گردید. نتایج آزمایشات بیوشیمیایی بیانگر آن بود که آنتی‌اکسیدان‌های موجود در گیاه زعفران سبب کاهش معنی‌دار MDA، AST و ALT در برابر افزایش معنی‌دار این عوامل توسط پاراکوات گردید. همچنین بیشترین مقدار کاتالاز و TAOC مربوط به گروه دریافت‌کننده زعفران خالص بود. در گروه‌های دریافت‌کننده غلظت ۲۰ mg/kg/bw پاراکوات ضایعات کمتری مشاهده شد و با افزایش غلظت سم به ۴۰ mg/kg/bw میزان صدمات بیشتر شد. همچنین پاراکوات موجب ایجاد کانون التهاب شد که بیانگر فعال شدن مکانیسم دفاعی بدن علیه تخریب است (۹). گروه‌های دریافت‌کننده همزمان پاراکوات و زعفران میزان TAOC و کاتالاز نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده پاراکوات افزایش و میزان MDA کاهش معنی‌داری نشان دادند که احتمالاً عصاره آبی زعفران به عنوان عامل آنتی‌اکسیدان عمل کرده و از تولید رادیکال آزاد اکسیژن جلوگیری کرده است. همچنین مقدار ALT و AST در گروه‌های دریافت‌کننده زعفران نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده پاراکوات کاهش معنی‌داری نشان داد. زعفران به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی سبب بهبود آسیب بافتی ناشی از مصرف پاراکوات گردید.

با افزایش غلظت سم پاراکوات، واکنش‌های موجود در کبد بزرگ‌تر شده و ضمن پاره شدن غشاء ایجاد سیروز و نکروز کبدی می‌کند (۱۱). این نتایج ضمن تایید مشاهدات تحقیق حاضر می‌تواند نشان‌دهنده فرآیند واکنش‌های حاصل از پاراکوات در کبد باشد. در این تحقیق میزان آمینوترانسفرازهای سرمی در گروه‌های دریافت‌کننده پاراکوات به دلیل آسیب کبدی افزایش یافت؛ ولی در گروه‌های دریافت‌کننده زعفران و گروه‌های دریافت‌کننده پاراکوات همراه زعفران در این معیارها کاهش مشاهده شد. احتمالاً عصاره زعفران با ممانعت از تراوش این آنزیم‌ها از سلول‌های داخلی با پایدار کردن غشای سلولی اثر خود را اعمال می‌کند (۱۲). افزایش در فعالیت پلاسمایی آلانین آمینوترانسفراز و آسپارات آمینوترانسفراز به احتمال قوی به علت نقص در عملکرد کبد روی

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی زعفران (۸۰ mg/kg/bw) می تواند وضعیت شاخص های عملکردی آسیب کبد، متغیرهای بیوشیمیایی و نیز خصوصیات بافتی این ارگان را در موش های سوری نر که توسط علف کش پاراکوات آسیب دیده بودند؛ بهبود بخشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه بخشی از پایان نامه (شماره ۹۸-۲) خانم شیمیا پدرپور واجارگاه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بافت شناسی و جنین شناسی از دانشکده علوم دانشگاه ارومیه بود و با حمایت معاونت پژوهشی دانشکده علوم در گروه زیست شناسی دانشگاه ارومیه انجام گردید. بدین وسیله از آن معاونت محترم و کارکنان آن حوزه صمیمانه سپاسگزاری می گردد.

کبد، ریه و پوست شود. بعضی از پلی فنول ها مانند کروسستین می تواند مانع رشد سلول، آنژیوژنز و نشان دادن اثر ضد التهابی در رده های سلولی سرطان روده شوند. کروسستین همچنین می تواند باعث کاهش سطح استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در کلیه موش های دیابتی شده گردد (۱۸).

از محدودیت های این مطالعه می توان به تغذیه حیوان توسط گاوآژ با نیدل و سوراخ شدن کام حیوان اشاره نمود که امکان تلف شدن حیوان بیشتر و دسترسی به حیوان کمتر بود. همچنین به خاطر مصرف عام زعفران آثار عمومی آن بررسی شد و از ترکیب موثره زعفران استفاده نشد. لکن شناخت دقیق ماده یا مواد موثره اصلی این عصاره و تعیین مکانیسم های موثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

References

- Fathi N, Hosseinpanah M, Hajihosseini M, Ranjbar A. Effect of paraquat on testicular histomorphometry of male rats. *Biological Forum - An International Journal*. 2015; 7(2): 573-75.
- Parvez S, Raisuddin S. Effects of paraquat on the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch): non-enzymatic antioxidants as biomarkers of exposure. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2006 Apr; 50(3): 392-97. doi:10.1007/s00244-005-5083-4
- Bus JS, Aust SD, Gibson JE. Lipid peroxidation: a possible mechanism for paraquat toxicity. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1975 May; 11(1): 31-8.
- Loliger J, Lambelet P, Aeschbach R, Prior EM. Natural antioxidants: from radical mechanisms to food stabilization. In: McDonald RE, Min DB, Eds. *Food Lipids and Health*. 1st ed. New York: Marcel Dekker Inc. 1996; pp: 315-44.
- Pitsikas N, Zisopoulou S, Tarantilis PA, Kanakis CD, Polissiou MG, Sakellaridis N. Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins on recognition and spatial rats' memory. *Behav Brain Res*. 2007 Nov; 183(2): 141-46. doi:10.1016/j.bbr.2007.06.001
- Kianbakht S. [A systematic review on pharmacology of saffron and its active constituents]. *J Med Plants*. 2008; 4(28): 1-27. [Article in Persian]
- Sravani PV, Babu NK, Gopal KV, Rao GR, Rao AR, Moorthy B, et al. Determination of oxidative stress in vitiligo by measuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and non-vitiliginous skin. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2009 May-Jun; 75(3): 268-71. doi:10.4103/0378-6323.48427
- Mohajeri D, Mousavi G, Mesgari M, Doustar Y, Nouri HK. Subacute toxicity of *Crocus sativus* L. (Saffron) stigma ethanolic extract in rats. *Am J Pharmacol Toxicol*. 2007; 2(4): 189-93.
- Zini A, Al-Hathal N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? *Asian J Androl*. 2011 May; 13(3): 374-81. doi:10.1038/aja.2010.182
- Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Safranal, a constituent of *Crocus sativus* (saffron), attenuated cerebral ischemia induced oxidative damage in rat hippocampus. *J Pharm Pharm Sci*. 2005 Aug; 8(3): 394-99.
- Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res*. 2009 Apr; 129(4): 357-67.
- Hosseinpour Chermahini S, Adibah Abd Majid F, Roji Sarmidi M, Taghizadeh E, Salehnezhad S. Impact of saffron as an anti-cancer and anti-tumor herb. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2010 Nov; 4(11): 834-40.
- Akerman G, Amcoff P, Tjärnlund U, Fogelberg K, Torrisen O, Balk L. Paraquat and menadione exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)--studies of effects on the pentose-phosphate shunt and thiamine levels in liver and kidney. *Chem Biol Interact*. 2003 Jan; 142(3): 269-83.
- Ray S, Sengupta A, Ray A. Effects of paraquat on antioxidant system in rats. *Indian J Exp Biol*. 2007 May; 45(5): 432-8.
- Zain AMD. The evaluation of the toxic effect of paraquat and its mechanism of action on reproductive system of male rats. Thesis for the degree of Master of Science. 2007 May.
- Ayedh A, Al-Qudsi F. Effect of saffron on liver development in mouse embryo. *Life Sci J*. 2013; 10(1): 1480-95.
- Ochiai T, Soeda S. Crocin prevent the death of PC-12 cells through sphingo myelinaseceramide signaling by increasing glutathione synthesis. *Neurochemistry International*. 2004; 44(5): 321-30.
- Brand-Williams W, Cavelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 1995; 28(1): 25-30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5

Original Paper

Regeneration effect of *Saffron* on the liver damaged with paraquat in male mice

Shima Pedarpoor Vajargah (M.Sc)¹, Farah Farokhi (Ph.D)^{*2}

¹M.Sc in Histology & Embryology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.

¹Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.

Abstract

Background and Objective: Paraquat is a common agricultural herbicide that is a strong stimulus in superoxide anions foundation. Due to the adverse effects of the free radicals, the anti oxidant compounds such as *Saffron* seem necessary as antioxidants and removing the free radicals. The aim of this study was to evaluate the regeneration effect of *Saffron* on the liver damaged with paraquat in male mice.

Methods: In this experimental study, 36 male mice were randomly allocated into 6 groups. Animals in group one were received normal food, water and corn oil. Secound and third groups of mice were treated at a dose of 20, 40 mg/kg/bw paraquat, respectively. Animals in the fourth group were received *Saffron* at a dose of 80 mg/kg/bw. Animals in fifth and sixth two groups were treated with paraquat treated at a dose of 20, 40 mg/kg/bw and *Saffron* (80 mg/kg/bw), orally, per day. At the end of 30 days the mice were anesthesia and blood samples were prepared for measurement of AST and ALT in sera and livers were removed for measurment of MDA, FRAP, katalaze concentration and half of liver was transfer to formaline for histopathological study.

Results: Cell necrosis and inflammation was found in the liver of mice treated with paraquat, also the level of AST, ALT and MDA was significantly increased in compared to controls ($P < 0.05$). Also the level of AST, ALT and MDA and histopathological alterations of liver in animals treated with paraquat at a dose of 20, 40 mg/kg/bw and *Saffron* (80mg/kg/bw) were significantly reduced in compared to paraquat group.

Conclusion: *Saffron* (80 mg/kg/bw, orally) improves liver dysfunction in mice exposed with paraquat.

Keywords: Liver, *Saffron*, Paraquat, Inflammation, Liver Enzymes, MDA, Mouse

* Corresponding Author: Farokhi F (Ph.D), E-mail: f.farokhi@urmia.ac.ir

Received 1 May 2017

Revised 25 Nov 2017

Accepted 18 Dec 2017

Shima Pedarpoor Vajargah (<https://orcid.org/0000-0002-9018-9964>), Farah Farokhi (<https://orcid.org/0000-0001-8688-1491>)