بررسی هیستوپاتولوژی سمّیت تحت حاد عصاره تام کلاله زعفران (*Crocus sativus*) بر بافت کبد و کلیه در موش صحرایی

داریوش مهاجری[۱]*، مهران مسگری عباسی[۲] ، عباس دل آذر[۳]، یوسف دوستار[۱]، غفور موسوی[٤]، بهرام عمواوغلی تبریزی[٤]

[۱]دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران. [۲]مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. [۲،۳]دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. [٤]دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۳۰ ، تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۲۰

Histopathological study of subacute toxicity of *Crocus sativus* L. (Saffron) stigma total extract on liver and kidney tissues in the rat

Mohajeri D.[1*], Mesgari Abbasi M.[2] , Delazar A.[3], Doustar Y.[1], Mousavi, Gh.[4], Amouoghli Tabrizi B.[4]

[1]Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran. [2] Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [2,3]Faculty of pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

[4]Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran

Received: 20 Aug. 2008, Accepted: 8 Feb. 2009

Objective: The medicinal properties attributed to *Crocus sativus* L. (saffron) are extensive, but saffron taken in large amounts is highly toxic. This study was performed to elucidate the possible toxic effects of total extract of *Crocus sativus* L. stigma on liver, kidney and some hematological parameters in normal rats. **Methods:** Male Wistar rats were randomly assigned into four groups of eight animals each. Group 1 was treated with ISS as control and Groups 2 to 4 were treated with total saffron extract administered daily for 2 weeks intraperitoneally in doses of 0.35, 0.70 and 1.05 g/kg, respectively. Body weight of the animals were recorded on the first, 7 and 14 of the experiment Hematological and biochemical parameters were measured on final days of the experiment. Tissue specimens of the liver and kidneys were subjected to histological examination using standard hematoxyline-eosin staining. **Results:** Total saffron extract caused significant reductions in the Hb and HCT levels and total RBC count, although it showed no dose-dependent effect. Total WBC count showed significant dose-dependent increases in extract treated rats. The extract treated animals, also, exhibited significant dose-dependent increased values of AST, ALT, urea, uric acid and creatinine. In the histopathological studies of liver and kidneys in extract treated rats, there were mild to severe tissue injuries supporting the biochemical analysis. **Conclusion:** The results of this study indicated that total extract of *Crocus sativus* L. stigma is toxic (in given doses), and causes hepatic and renal tissue damages along with anemia in rats.

Key words: *Crocus sativus L., Stigma, Total extract, Subacute toxicity, Histopathology.*

زمینه و هدف: خواص دارویی که به زعفران نسبت داده شده است، بسیار گسترده می‌باشد ولی مصرف مقادیر زیاد آن بسیار توکسیک است. این مطالعه برای ارزیابی اثرات سمّی احتمالی عصاره تام کلاله زعفران بر بافت‌های کبد، کلیه و برخی پارامترهای خونی در موش‌های صحرایی طراحی شده است. **روش‌ها:** موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در چهار گروه ۸ تایی توزیع گردیدند. به گروه ۱، تحت عنوان شاهد، سرم فیزیولوژی و به گروه‌های ۲ تا ٤ عصاره تام کلاله زعفران به طور روزانه و به‌مدت دو هفته به ترتیب با دزهای ۰/۳۵، ۰/۷ و ۱/۰۵ گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به‌طور داخل صفاقی تزریق شد. وزن بدن موش‌ها در روزهای صفر، ۷ و ١٤ ثبت و مقادیر پارامترهای هماتولوژیک و بیوشیمیایی سرم موش‌ها در پایان دوره آزمایش مورد سنجش قرار گرفت. نمونه‌های بافتی کبد و کلیه نیز پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین از لحاظ آسیب شناسی مورد مطالعه قرار گرفتند. **یافته‌ها:** عصاره تام زعفران باعث کاهش معنی‌دار غیر وابسته به دز هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز گردید. شمارش کلی گلبول‌های سفید، افزایش وابسته به دز معنی‌داری را در گروه‌های تیمار با عصاره نشان داد. گروه‌های تیمار با عصاره افزایش وابسته به دز معنی‌داری را در میزان اوره، اسید اوریک، کراتینین و آنزیم‌های آلانین ترانس آمیناز و آسپارتات ترانس آمیناز سرم نشان دادند. در آسیب شناسی بافتی کلیه‌ها و کبد موش‌های تیمار شده با عصاره، آسیب‌های ملایم تا شدیدی مشاهده شد که با نتایج آزمایشات بیوشیمی همخوانی داشت. **نتیجه‌گیری:** نتایج بررسی حاضر نشان داد که عصاره تام کلاله زعفران با دزهای مصرف شده در موش‌های صحرایی سمی بوده و باعث ایجاد آسیب‌های کبدی، کلیوی و همچنین کم‌خونی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *زعفران، کلاله، عصاره تام، سمیت تحت حاد، هیستوپاتولوژی.*

*نویسنده مسئول: داریوش مهاجری، استادیار، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران، تلفن: ۰۹۱٤٤۱۳۱۸۱۰، نمابر: ٦۳۷٦۹۳٤-۰٤۱۱

**Corresponding Author: Daryoush Mohajeri, Assistant professor, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran. Tel: +98-9141311810; Fax: +98-411-6376934; E-mail: daryoushmohajeri@yahoo.com*

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

گیاهان دارویی همانند داروهای صناعی ممکن است با داشتن اثرات جانبی ناخواسته باعث ایجاد آسیب‌های بافتی جبران ناپذیری گردند (۱). ارزیابی اثرات جانبی و سمّی گیاهان دارویی با انجام آزمایشات تجربی بر روی مدل‌های حیوانی کمک موثری در شناسایی و تشخیص اثرات مخرب دارو در انسان خواهد بود. این بررسی‌ها می‌توانند به‌عنوان مطالعه‌ای اولیه و همچنین پیش مطالعه‌ای در جهت تحقیقات بعدی باشند. از سوی دیگر، شناسایی آسیب‌های ایجاد شده در بافت‌ها و اندام‌های مختلف بدن متعاقب مصرف داروهای گیاهی راهکار مناسبی در جهت هرچه اختصاصی‌تر نمودن مصرف این داروها خواهد بود. تعیین میزان مصرف دارو نیز خود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد، چراکه داروهای گیاهی اگر بیش از حد مصرف گردند، ممکن است نه‌تنها باعث درمان بیماری افراد نشده بلکه ضایعات جبران‌ناپذیری نیز ایجاد نمایند (۱). از اینرو لازم است، آزمایشات مختلفی با دزهای مصرف متفاوت نیز بر روی مدل‌های حیوانی انجام پذیرد تا علاوه بر شناخت اثرات مضرّ دارو در بافت‌ها و اندام‌های مختلف، میزان مصرف دقیق و غیر سمّی دارو نیز مشخص گردد. زعفران که به‌دلیل خواص درمانی متنوع و کاربرد فراوان در طب سنتی به عنوان یک گیاه دارویی از چند دهه اخیر به‌طور خاص مورد توجه محققین بوده است، از این موضوع مستثنی نبوده و اغلب کتب مرجع در زمینه گیاهان دارویی نیز بر این مهم تاکید داشته‌اند (۲،۳). بر اساس مطالعات تجربی که بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است، مشخص گردیده است که زعفران دارای اثرات کاهنده چربی خون می‌باشد. در طب سنتی نیز از زعفران به‌عنوان مسکن و آرام بخش، ضد اسپاسم و مقوی معده و اشتهاء آور استفاده می‌شود (٤). همچنین مشخص گردیده است که این گیاه قدرت حافظه را بهبود می‌بخشد و دارای اثرات زدایندگی (Scavengering) بر روی رادیکال‌های آزاد بوده و دارای خواص ضد توموری می‌باشد (۱۰-۵،۷). تأثیر عصاره زعفران در کاهش فشارخون و اثرات شل کنندگی آن بر روی عضلات صاف عروق وازودفران موش صحرایی و ایلئوم خوکچه هندی مطالعه شده است (۱۱). تحقیقات نشان داده است که عصاره زعفران آسیب ایسکمی/ برقراری مجدد خون (Ischemic-Reperfusion) را در کلیه و عضلات اسکلتی کاهش مـــی‌دهد (۱۲،۱۳). نقش بالقوه ضد آریتمی گیاه زعفران در درمان تاکی‌آریتمی‌های فوق بطنی نیز گزارش شده است (١٤). در گزارشی اثرات قابل توجه کاهش در میزان قند خون عصاره زعفران به همراه Cisplatin مطرح شده است (۱۵). اثرات ضد دیابتی عصاره تام زعفران در موش‌های دیابتی شده توسط آلوکسان، نیز به اثبات رسیده است (١٦). علاوه بر تمام موارد ذکر شده، در طب سنتی از زعفران به عنوان ضد نفخ (Carminative)، قاعدگی آور (Emmenagogue) و عـــامل افزایش دهنده تعرق در بدن (Diaphoretic) نیز استفاده شده است (۵،۱۷).

با توجه به مجموعه فوق‌الذکر، بررسی اثرات ناخواسته و توکسیک این گیاه به عنوان دارو از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. به دلیل گزارشات متناقضی که در مورد سمّیت زعفران ارائه گردیده است، در مورد استفاده از زعفران به لحاظ دارویی، سر درگمی ایجاد شده است. برخی از گزارش‌ها نشان می‌دهد که زعفران گیاهی کاملاً غیر سمّی است (۲۱-۱۸). در مقابل، مشخص شده است که کروستین (Crocetin) که کارتنوئیدی مشتق از زعفران است، خواص تراتوژنی دارد (۲۲). بر اساس طبقه‌بندی‌های انجام شده در مورد اثرات توکسیک زعفران روی سیستم اعصاب مرکزی نیز، عصاره زعفران نسبتاً توکسیک شناخته شده (۲۳) و همچنین مشخص شده است که عصاره تام زعفران بیشتر از عصاره آبی (Aqueous extract) آن توکسیک است (٢٤). آنچه که مسلم است، این است که مصرف زعفران در مقادیر زیاد شدیداً توکسیک است ولی گزارش شده است که حتی مقادیر کمتر آن ممکن است باعث مسمومیت با علائمی نظیر استفراغ، خونشاشی، اسهال و یرقان گردد (٤). همچنین گزارش شده است که مصرف مقادیر بالای زعفران باعث سقط جنین نیز می‌گردد (۳،٤). این موضوع باعث گردیده است که از زعفران در مقادیر زیاد جهت سقط عمدی جنین استفاده شود، که بالطبع برای فرد مصرف کننده با مخاطرات جدّی همراه خواهد بود.

بررسی حاضر اولین مطالعه تجربی آزمایشگاهی است که سمّیت تحت حاد دزهای بالای عصاره تام زعفران را با جنبه آسیب‌شناسی در بافت‌های کبد و کلیه مورد بررسی قرار می‌دهد تا عوارض جانبی و احتمالاً خطرناکی که ممکن است متعاقب سوء مصرف این گیاه ایجاد شود، آشکار گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱: مواد دارویی

زعفران مورد استفاده در این مطالعه از شرکت نوین زعفران (مشهد، ایران) تهیه گردید. ابتدا کلاله زعفران توسط آسیاب مکانیکی به پودر کاملاً ریز تبدیل گردید. سپس استخراج با حلال متانول ۷۰ درصد به روش ماسراسیون (Maceration) انجام پذیرفت. عمل استخراج پنج بار و هر بار به مدت ۱۲ ساعت تکرار گردید. پس از آن عصاره های جمع آوری شده توسط دستگاه روتاری اواپوراتور تحت خلأ و دمای زیر ٤٥ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک گردید. عصاره‌های خشک شده تا زمان استفاده در یخچال و در دمای زیر صفر درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۳).

۲-۲: تهیه و نگهداری حیوانات

تعداد ٤٠ سر موش صحرایی نر نژاد Wistar ، با وزن تقریبی ۲۳۰-۲۱۰ گرم و سن ۱۰ هفته (خریداری شده از محل پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران) انتخاب و به‌طور تصادفی در ٤ گروه ۱۰تایی شامل گروه شاهد، گروه تیمار با دز پایین، گروه تیمار با دز متوسط و گروه تیمار با دز بالا) توزیع گردیدند. شرایط تغذیه و نگهداری برای تمام گروه‌ها یکسان و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای ۲ ± ۲۱ درجه سانتی‌گراد در قفس‌های مخصوص و در بستری از پوشال در نظر گرفته شد. آب به‌طور آزاد در دسترس قرار گرفت. پس از یک هفته عادت به وضعیت جدید، مطالعه روی موش‌ها انجام گردید.

در این مطالعه موارد اخلاقی مورد تائید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز قرار گرفت.

۲-۳: تعیین سمّیت حاد (LD_{50})

برای تعیین سمیت حاد (LD_{50})، ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد Wistar با وزن تقریبی ۲۳۰-۲۱۰ گرم و سن ۱۰ هفته در ٥ گروه شش‌تایی توزیع و با دزهای ۱، ۲، ۳، ٤ و ٥ گرم به‌ازای هر کیلو گرم وزن بدن عصاره تام زعفران به صورت داخل صفاقی و به شکل محلول در سالین نرمال به میزان ۱۰ میلی‌لیتر به‌ازای هر کیلو گرم وزن بدن تحت تزریق قرار گرفتند. سپس موش‌ها به مدت ٦ ساعت به فواصل یک ساعته و بالاخره در پایان ۲٤ ساعت از لحاظ رفتارهای ظاهری، علایم عصبی، میزان مصرف غذا، وضعیت مدفوع و ادرار و مرگ تحت نظر بودند. تعداد مرگ و میر بعد از ۲٤ ساعت اندازه‌گیری شد. LD_{50} با روش Litchfield and Wilcoxon با استفاده از نرم‌افزار PCS تعیین گردید.

٤-۲: طرح آزمایش

بعد از تعیین دز سمیّت حادّ (LD_{50}) به گروه‌های تیمار از روز اول تا آخر مطالعه (به مدت ۲ هفته)، هر روز عصاره زعفران به‌ترتیب و به‌میزان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد LD_{50} و به گروه شاهد، نرمال سالین به‌صورت داخل صفاقی (Intra peritoneally) تزریق شد. جهت در نظر گرفتن عوامل مداخله‌گر، غذا و آب دریافتی موش‌ها به‌صورت روزانه و وزن آنها در روزهای صفر، ۷ و ۱٤ مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. ٤ ساعت بعد از آخرین تزریق، خونگیری از شبکه پشت کره چشمی (Retro-orbital plexus) جهت انجام مطالعات هماتولوژیک و بیوشیمی خون انجام پذیرفت. آزمایشات هماتولوژیک شامل اندازه‌گیری میزان هموگلوبین (Hb)، درصد هماتوکریت (HCT%)، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، حجم متوسط سلولی (MCV)، هموگلوبین متوسط سلولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین سلولی (MCHC) و گلبول‌های سفید (WBC) و آزمایشات بیوشیمی خون شامل اندازه‌گیری اوره (Urea)، اسید اوریک (Uric acid)، کراتینین (Creatinine)، آنزیم‌های آلانین ترانس آمیناز (ALT) و آسپارتات ترانس آمیناز (AST) بود. برای سنجش اوره، اسید اوریک، کراتینین، آنزیم‌های آلانین ترانس آمیناز و آسپارتات ترانس آمیناز از کیت‌های اندازه‌گیری زیست شیمی (Ziest chem.) ساخت ایران به‌روش رنگ‌سنجی (Colorimetric) و دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Bio-wave مدل F2100 ساخت انگلستان استفاده شد. در آزمایشگاه، سرم توسط دستگاه سانتریفیوژ جدا شده، یک نمونه خون نیز با ماده ضد انعقاد سیترات سدیم تهیه شد که در این نمونه‌ها، میزان مقادیر هماتوکریت، هموگلوبین، WBC ، RBC مورد ارزیابی قرار گرفت. هماتوکریت توسط دستگاه اولتراسانتریفیوژ در لوله‌های هماتوکریت با دور ۱۰۰۰۰ اندازه گرفته شد. هموگلوبین نیز به‌روش سیانومت‌هموگلوبین مورد سنجش قرار گرفت. شمارش WBC و RBC توسط دستگاه سل‌کانتر Sysmex مدل KX21 ساخت کشور ژاپن انجام شد (۲٥، ۲٦ و ۲۷). بعد از انجام خونگیری جهت آزمایشات هماتولوژیک و بیوشیمیایی، هم‌زمان همه موش‌ها توسط ایجاد جابجایی در مهره‌های گردن (Cervical dislocation) به راحتی کشته شده و بعد از کالبدگشایی از کبد و کلیه تمامی موش‌ها نمونه‌های بافتی جمع‌آوری و سپس در فرمالین

Archive of SID

www.SID.ir

بافری ۱۰ درصد پایدار گردید. از نمونه‌های فوق با استفاده از شیوه‌های رایج پاساژ بافت و تهیه مقاطع آسیب شناسی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون توسط میکروتوم تهیه و جهت رنگ آمیزی با هماتوکسیلین-ائوزین آماده گردیدند.

۵-۲: تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها

تمامی داده‌های به‌دست آمده کمّی، به صورت mean±S.E.M ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون آماری ANOVA (one-way analysis of variance) و آزمون تعقیبی Bonferroni در سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ توسط بسته نرم‌افزاری SPSS ویرایش ۱۳، تعیین گردید.

۳- نتایج

۳-۱: تأثیر عصاره بر وزن بدن موش‌های صحرایی

تأثیر عصاره تام کلاله زعفران بر وزن بدن موش‌های صحرایی در جدول ۱ ارائه گردیده است. نتایج نشان می‌دهد که عصاره باعث کاهش معنی‌دار وزن بدن در هر سه گروه مورد مطالعه (۰/۳۵، ۰/۷ و ۱/۰۵ گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) شده است. لازم به ذکر است که این تاثیر در روز چهاردهم وابسته به دز می‌باشد.

۳-۲: تأثیر عصاره بر پارامترهای خون موش‌های صحرایی

تأثیر عصاره تام کلاله زعفران بر پارامترهای خونی موش‌های صحرایی در جدول ۲ ارائه گردیده است. نتایج به‌دست آمده کاهش قابل توجهی را در میزان هموگلوبین، هماتوکریت و شمارش گلبول‌های قرمز موش‌های تیمار با عصاره نشان می‌دهد، گرچه هیچ اثر وابسته به دزی در این رابطه مشخص نگردید. لازم به ذکر است که عصاره باعث افزایش وابسته به دز گلبول‌های سفید شده است. مقادیر سایر پارامترها نیز بدون تغییر مانده است.

۳-۳: تأثیر عصاره بر پارامترهای بیوشیمیایی سرم موش‌های صحرایی

تاثیر دزهای رتبه‌بندی شده عصاره تام زعفران بر پارامترهای بیوشیمیایی سرم موش‌های صحرایی در جدول ۳ ارائه گردیده است. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که آنزیم‌های شاخص آلانین ترانس آمیناز (ALT) و آسپارتات ترانس آمیناز (AST)، متعاقب تیمار با عصاره به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. به‌همین ترتیب، موش‌های تیمار با عصاره افزایش معنی‌دار مقادیر اوره، اسید اوریک و کراتینین را نشان می‌دهد. تاثیر عصاره تام زعفران بر تمامی پارامترهای یاد شده وابسته به دز می‌باشد.

۳-٤: یافته‌های هیستوپاتولوژی

آسیب‌شناسی بافتی کبد و کلیه در موش‌های گروه شاهد هیچ‌گونه تغییر پاتولوژیک قابل ملاحظه‌ای را نشان نداد. آسیب‌شناسی بافتی کبد در گروه تیمار با دز ۰/۳۵ گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره، طیفی از تغییرات پاتولوژیک از جمله کانون‌های ریز و پراکنده دژنراتیو و نکروز، اتساع سینوسوئیدها و از بین رفتن نظم رو به مرکز هپاتوسیت‌ها، پرخونی و اتساع وریدها را نشان داد (تصویر ۱). در آسیب‌شناسی بافتی کبد موش‌های گروه تیمار با دز ۰/۷ گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره، تغییرات پاتولوژیک بیشتری از جمله نواحی وسیع تغییر چربی و نکروز هپاتوسیت‌ها در قسمت‌های مرکزی لوبول‌های کبدی، ارتشاح لنفوسیتی و گرانولوسیتی در فضاهای پورتال دیده شد (تصویر ۲).

آسیب‌شناسی بافتی کبد در موش‌های گروه تیمار با دز ۱/۰۵ گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره، آسیب‌های بیشتری از جمله دژنراسیون و نکروز پری‌پورتال، تجمع سلول‌های کوپفر با فعالیت فاگوسیتیک در نواحی پری‌پورتال، تشکیل پل‌های فیبروزه توام با حضور سلول‌های تک هسته‌ای ما بین لوبول‌های کبدی و نکروزهای وسیع همراه با تخریب در ساختار بافتی و خونریزی را نشان داد (تصویر ۳). تغییرات پاتولوژیک ایجاد شده در موش‌های گروه تیمار با دز ۰/۳۵ گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره، شامل تورم آبکی و تغییر چربی سلول‌های پوششی لوله‌های ادراری و اتساع گلومرول‌ها به‌دلیل تجمع قطرات ریز هیالنی پروتئینی (Hyaline proteinaceouse droplets) در فضاهای ادراری بود (تصویر ٤).

در مطالعات آسیب‌شناسی بافتی، کلیه‌های موش‌های گروه تیمار با دز ۰/۷ گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره، ضایعات گلومرولی شدیدتری را به‌شکل پرخونی، هیپرسلولاریتی ملایم مزانژیال، افزایش ضخامت غشاءهای پایه گلومرولی و ماتریکس مزانژیال توأم با چسبندگی لایه‌های جداری و احشایی کپسول بومن (Syneciae) نشان دادند. همچنین در این گروه کست‌های هیالنی که باعث انسداد و اتساع لوله‌های

Archive of SID

www.SID.ir

ادراری شده بود، دیده شد (تصویر ۵). در کلیه‌های موش‌های گروه تیمار با دز ۱/۰۵ گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره، علاوه بر ضایعات مشاهده شده در گروه‌های قبلی، نکروز شدید لوله‌های ادراری و انفصال سلول‌های توبولی از غشاء پایه توام با خونریزی‌های شدید و ارتشاح بینابینی لنفوسیتی نیز مشخص بود. چروکیدگی گلومرول‌ها و در برخی موارد فقدان کامل کلافه مویرگی گلومرولی و همچنین نکروز سلول‌های سنگفرشی لایه جداری کپسول بومن از تغییرات بارز مشاهده شده در این گروه بود (تصاویر ٦).

۵-۳: نتایج آزمایش تعیین سمیّت حاد (LD_{50})

مصرف عصاره با دز ۵ گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، موجب مرگ همه موش‌های مورد آزمایش شد. با دز ٤ گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، ٤ سر از موش‌ها تلف گردید. دز ۲ گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره، باعث مرگ ۱ موش و دز ۳ گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره، باعث مرگ ۲ سر از موش‌ها شد. موش‌های مورد مطالعه پس از تجویز عصاره تعادل خود را از دست داده و در برخی موارد قدرت حرکت خود را از دست می‌دادند. در دزهای بالا، رخوت و بی‌حالی، افت شدید دمای بدن و در نهایت مرگ مشاهده می‌شد. با دز ۱ گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، تا ٤ ساعت پس از مصرف عصاره هیچگونه تغییر رفتاری مشاهده نشد و تا پایان ٤٨ ساعت هیچگونه تلفاتی مشاهده نشد. بدین ترتیب، دز سمیّت حادّ (LD_{50}) عصاره تام کلاله زعفران در این موش‌ها، ۳/۵ گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن تعیین گردید.

جدول ۱. تاثیر عصاره تام کلاله زعفران بر وزن بدن در موش‌های صحرایی

گروه‌ها	میزان مصرف (گرم بر کیلوگرم)	وزن بدن (گرم)		
		روز صفر	**روز ۷**	**روز ١٤**
شاهد	-	۲۱۷/۵±۲/۸	۲۲۳/۳±۵/۳	۲۲٤/۰±۳/۸
تیمار با عصاره	۰/۳۵	۲۱۷/۸±۲/۱	۲۱۱/٦±۳/۱*	۲۰۰/۷±۲/۱*
تیمار با عصاره	۰/۷	۲۱۸/٤±۲/۸	۲۰۷/۵±٤/۹*	۱۸۸/۲±۳/۵**
تیمار با عصاره	۱/۰۵	۲۲۱/۳±۲/۳	۲۰۳/۳±۳/۱*	۱٦٦/٤±٤/۹***

مقادیر به‌صورت mean ± S.E.M. ارائه شده است. (n= ۱۰)، ***P<۰/۰۰۱ ، **P< ۰/۰۱ ، *P< ۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد

جدول ۲. تاثیر عصاره تام کلاله زعفران بر پارامترهای خون در موش‌های صحرایی

گروه‌ها	میزان مصرف (گرم بر کیلوگرم)	شمارش‌تام گلبول‌های‌سفید	شمارش‌تام گلبول‌های‌قرمز	هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)	هماتوکریت (درصد)	حجم متوسط‌سلولی (fl)	هموگلوبین متوسط‌سلولی (پیکوگرم)	غلظت‌متوسط هموگلوبین‌سلولی (گرم در دسی‌لیتر)
شاهد	-	۵/۹±۰/۵	۷/۸±۰/٤	۱٤/۲±۰/۵	٤۱/٤±۰/٤	۵۰/۷۲±۰/۸	۱۷/۹۵±۰/۲	**۳۵/۳۹±۰/۲**
تیمار با عصاره	۰/۳۵	۸/۲±۰/٤*	۵/٤±۰/۳***	۱۰/۲±۰/۳***	۳۲/۲±۰/۳***	۵۵/۷٦±۰/۷	۱۷/٦۲±۰/۳	**۳۱/٦۱±۰/۳**
تیمار با عصاره	۰/۷	۱۰/۱±۰/۵**	۵/۱±۰/۳***	۱۰/۰±۰/۳***	۳۰/۱±۰/٦***	۵۳/۸۵±۰/۵	۱۷/۷۱±۰/۱	**۳۲/۸۹±۰/۲**
تیمار با عصاره	۱/۰۵	۱٤/٦±۰/۹***	٤/۹±۰/۲***	۹/۹±۰/۲***	۲۹/۷±۰/۷***	۵٦/۱۱±۰/٤	۱۸/۸±۰/۱	**۳۳/٦٦±۰/۳**

مقادیر به‌صورت mean ± S.E.M. ارائه شده است. (n= ۱۰)، ***P<۰/۰۰۱ ، **P< ۰/۰۱ ، *P< ۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد

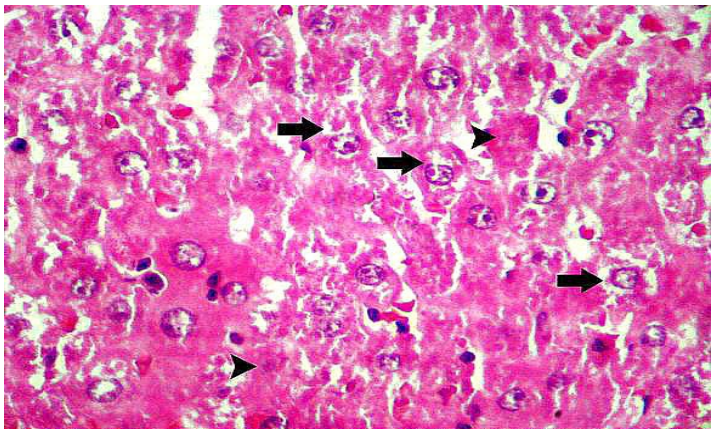
جدول۳. تاثیر عصاره تام کلاله زعفران بر پارامترهای بیوشیمیایی سرم در موش‌های صحرایی

گروه‌ها	میزان مصرف (گرم بر کیلوگرم)	آلانین ترانس آمیناز (IU/L)	آسپارتات ترانس (IU/L) آمیناز	اوره (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	اسید اوریک (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	کراتینین (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)
شاهد	-	۲۵/۳۷±۰/٤	۷٦/٦۲±۱/۷	۲۲/۵±۰/٦	۲/۳±۰/۲	۰/۵±۰/۰۱
تیمار با عصاره	۰/۳۵	۳٦/۲۲±۰/۸*	۹۱/۵۷±۲/۸*	۳۱/۸±۱/۹*	۳/۳±۰/۹*	۰/۸±۰/۰۳*
تیمار با عصاره	۰/۷	۵۲/۸۱±۱/۳**	۱۱۱/۳۲±۳/۵**	٤۲/٤±۳/۸**	۳/۸±۰/٦**	۱/۳±۰/۰۲**
تیمار با عصاره	۱/۰۵	۷۱/٦۱±۲/۱***	۱٤٤/۳۸±۳/۹***	۵۵/۸±٦/۲***	۵/۲±۱/۱***	۲/۲±۰/۰۱***

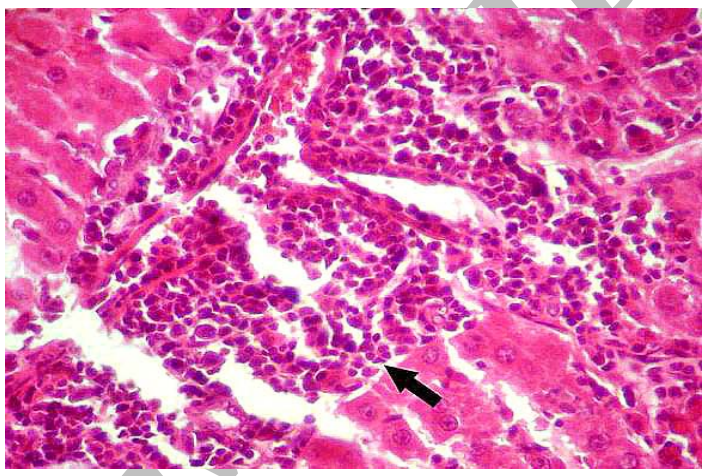
مقادیر به‌صورت mean ± S.E.M. ارائه شده است. (n= ۱۰)، ***P<۰/۰۰۱ ، **P< ۰/۰۱ ، *P< ۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد

Archive of SID

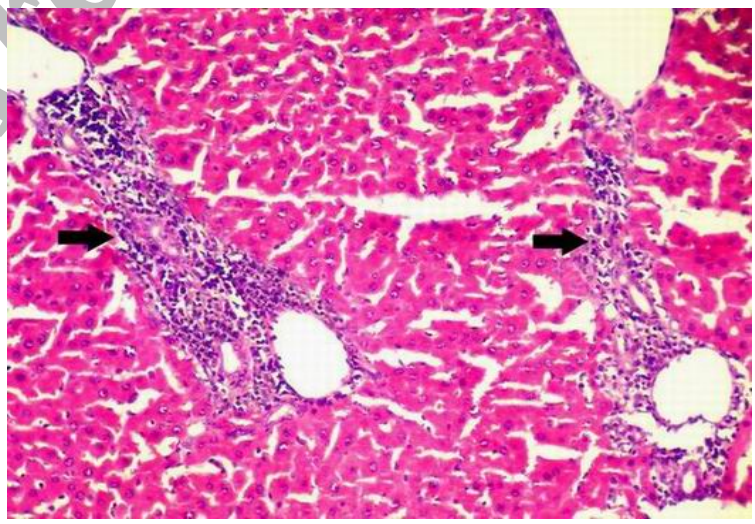
www.SID.ir



تصویر ۱. نمای ریزبینی از بافت کبد گروه تیمار با دز ۰/۳۵ گرم/ کیلوگرم عصاره، تغییرات دژنراتیو (فلش‌ها) و نکروز پراکنده هپاتوسیت‌ها (نوک فلش‌ها) را نشان می‌دهد (هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ٤٠٠×).



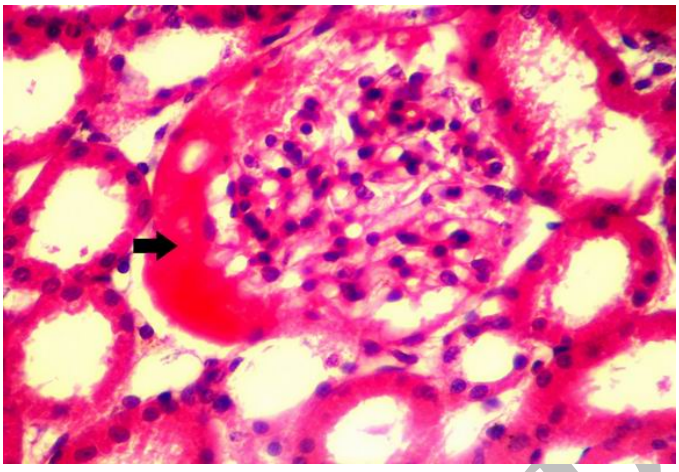
تصویر ۲. نمای ریزبینی از بافت کبد گروه تیمار با دز ۰/۷ گرم/ کیلوگرم عصاره، تجمع شدید نوتروفیل‌ها و سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای (فلش) را در فضای پورتال نشان می‌دهد (هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۳٦۰×).



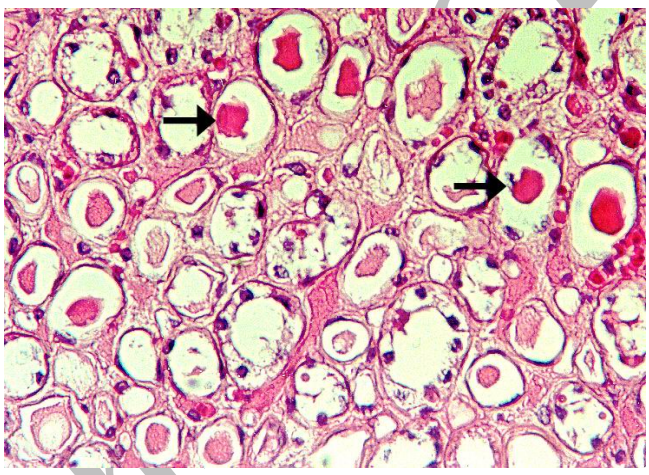
تصویر ۳. نمای ریزبینی از بافت کبد گروه تیمار با دز ۰/۷ گرم/ کیلوگرم عصاره، تشکیل پل‌های آماسی فیبروزه (فلش‌ها) را بین لوبول‌های کبدی نشان می‌دهد (هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۱۲۰×).

Archive of SID

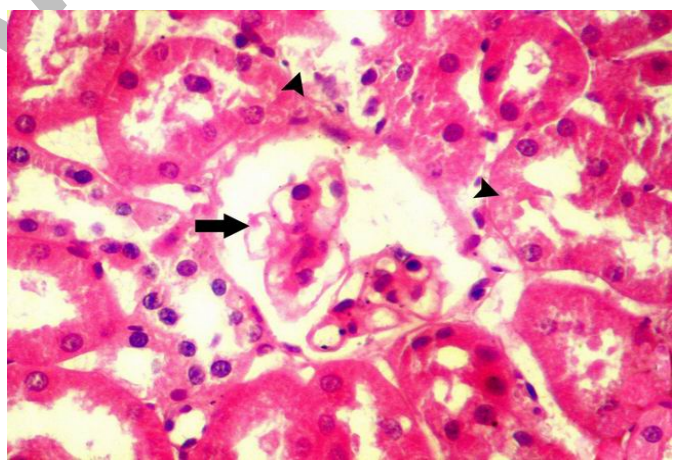
www.SID.ir



تصویر ٤. نمای ریزبینی از بافت کلیه گروه تیمار با دز ۰/۳۵ گرم/ کیلوگرم عصاره، اتساع گلومرول را به‌دلیل تجمع قطرات ریز هیالنی پروتئینی (Hyaline proteinaceouse droplets) (فلش) در فضای ادراری نشان می‌دهد (هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۳۲۰×).



تصویر ٥. نمای ریزبینی از بافت کلیه گروه تیمار با دز ۰/۷ گرم/ کیلوگرم عصاره، کست‌های هیالنی در داخل لوله‌های ادراری به‌وفور دیده می‌شود (هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۲۵۰×).



تصویر ٦. نمای ریزبینی از بافت کلیه گروه تیمار با دز ۱/۰۵ گرم/ کیلوگرم عصاره، نکروز سلول‌های پوششی لوله‌های ادراری پروگزیمال (نوک فلش‌ها) و چروکیدگی گلومرول (Glomerular shrinkage) همراه با نکروز سلول‌های سنگفرشی لایه جداری کپسول بومن (فلش) را نشان می‌دهد (هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ٤۰۰×).

Archive of SID

www.SID.ir

٤- بحث

نتایج به دست آمده از این بررسی نشان داد که عصاره تام کلاله زعفران به‌طور معنی‌داری باعث کاهش وزن بدن در موش‌های صحرایی می‌گردد. تحقیقات نشان داده است که کاهش اشتهاء به‌عنوان عارضه‌ای جانبی متعاقب تیمار با زعفران مطرح می‌باشد (۲۸،۲۹). در بررسی حاضر، افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، می‌تواند پیامدی از واکنش‌های التهابی ایجاد شده در بافت‌های آسیب دیده موش‌ها متعاقب تیمار با عصاره زعفران باشد.

نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که عصاره تام کلاله زعفران باعث کم‌خونی از نوع نورموکرومیک-نورموسیتیک (Normochromic-normocytic) در موش‌ها می‌شود. در بررسی انجام شده هیچ تغییر همولیتیکی مشخصی در سرم موش‌های تیمار شده با عصاره مشاهده نگردید. بر اساس نتایج بررسی حاضر و نتایج مطالعات انجام شده توسط سایر محققین (۳۰) چنین برمی‌آید که آنمی حاصله می‌تواند در اثر سرکوبی (Suppression) مغز استخوان باشد.

در این بررسی، موش‌های تیمار شده با عصاره تام زعفران افزایش معنی‌دار آنزیم‌های شاخص آلانین ترانس آمیناز (ALT) و آسپارتات ترانس آمیناز (AST) را نشان دادند که حاکی از بروز آسیب در بافت کبد می‌باشد (۳۱). همچنین، موش‌های تیمار شده با عصاره تام زعفران افزایش معنی‌داری را در سطوح سرمی اوره، اسید اوریک و کراتینین نیز نشان دادند که نشانگر آسیب و اختلال عملکرد کلیه‌ها می‌باشد (۳۲). مطالعه‌ای که توسط Modaghegh و همکارانش (۲۰۰۸) انجام شده، نشان داده است که مقادیر بالای زعفران (٤۰۰ میلی‌گرم) باعث افزایش مقادیر سرمی BUN و کراتینین در انسان نیز می‌شود (۳۳).

مطالعات هیستوپاتولوژی بررسی حاضر، آسیب‌های قابل توجهی را در بافت کبد و کلیه‌های موش‌های تیمار شده با عصاره تام کلاله زعفران، نشان داد که در توافق با نتایج آزمایشات بیوشیمی آن‌ها می‌باشد. تغییرات دژنراتیو و نکروز هپاتوسیت‌ها در ناحیه مرکز لوبولی (Centrilobular) پدیده‌ای معمول می‌باشد، چراکه این منطقه از لوبول، حداقل اکسیژن را از خون دریافت می‌کند و بنابراین نسبت به هیپوکسی حساس می‌باشد. دژنراسیون و نکروز اطراف لوبولی (Periportal) نیز متعاقب مسمومیت‌ها رخ می‌دهد (۳٤). بر این اساس، یافته‌های آسیب‌شناسی کبد در این مطالعه، نقش توکسیک مستقیم زعفران را در موش‌های تیمار شده با عصاره قطعی می‌نماید.

با توجه به مجموعه فوق‌الذکر، مشخص می‌گردد که مصرف عصاره زعفران در مقادیر زیاد دارای اثرات توکسیک می‌باشد. خاطر نشان می‌گردد که مصرف خود زعفران نیز در مقادیر زیاد، شدیداً توکسیک است (٤). در هر صورت، اجتناب از مصرف این گیاه به‌عنوان ادویه و یا دارو به‌هیچ عنوان توصیه نمی‌گردد، چرا که دز کشنده زعفران (۲۰ گرم)، بسیار بیشتر از دز درمانی آن می‌باشد و با مصرف روزانه زعفران با دز حداکثر ۱/۵-۱ گرم، هیچگونه ضرر و آسیبی تا کنون گزارش نشده است (٤).

٥- نتیجه‌گیری

نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که عصاره زعفران در دزهای بالا سمّی می‌باشد. بدین ترتیب، سوء مصرف زعفران با مقادیر زیاد منع مصرف خواهد داشت. به‌هر حال، ماده (مواد) موثر، محل و مکانیسم(های) مولکولی و سلولی اثرات توکسیک یاد شده ناشناخته مانده و مطالعات آتی و گسترده‌تری را می‌طلبد.

٦- تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز صمیمانه قدردانی می‌گردد.

References:

1. De Smet P.A.G.M., Hansel R., Chandler R.F. Adverse Effect of Herbal Drugs, Berlin, Springer-Verlag, 1997, 82.
2. Kafi M. Saffron: Production and Processing, 1st ed. Ferdowsi University of Mashhad, 2003, 21-135&209-275.
3. Ebrahimzade H., Rajabian T., Abrishamchi P., Karamian R., Saboura A. Iranian Saffron from the Research View Point, 1st ed. Ettelaat Publication, 2007, 587-591.
4. Bisset N.G., Wichtl M. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. A Handbook for Practice on a Scientific Basis, (2ed.), Med. Pharm. Scientific Publisher, CRC Press, London, 2001, 167-169.
5. Abdullaev F.J., Ferenkel G.D. Effects of saffron on cell colony formation and

Archive of SID
www.SID.ir

cellular nucleic acid and protein synthesis. Biofactors, 1992, 3: 201-204.
6. Tarantilis P.A., et al. Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from Crocus sativus, Anticancer Research, 1994, 14(5A): 1913-1918.
7. Nair S.C., Kurumboor S.K., Hasegawa J.H. Saffron chemoprevention in biology and medicine: A review. Cancer Biother., 1995, 10(4): 257-264.
8. Escribano J., et al. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (Crocus sativus) inhibit the growth of human cancer cells in vitro, Cancer Letters, 1996, 100 (1-2): 23-30.
9. Garcia-Olmo D.C. Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (Crocus sativus): an experimental study in the rat, Nutrition and Cancer, 1999, 35(2): 120-126.
10. Abdullaev Jafariva J., Caballero-Ortega H., Riveron-Nigrete L., Pereda-miranda R., Rivera-Luna R., Manuel Hernandez J., Perez-Lopez I., Espinosa-Aguirre J.J. In vitro evaluation of chemopreventive potential of saffron., Rev. Inves. Clin., 2002, 54(5): 430-436.
11. Fatehi M., Rashidabady T., Fatehi-hassanabad Z. Effects of Crous sativus petals extract on rat blood pressure and on responses induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum. Journal of Ethanopharmacology, 2003, 84: 199-203.
12. Hosseinzadeh H., Sadeghnia H.R., Ziaee T., Danaee A. Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. J. Pharm. Pharm. Sci., 2005, 8(3): 387-93.
13. Hosseinzadeh H., Modaghegh M.H., Saffari Z. *Crocus Sativus* L. (Saffron) Extract and its Active Constituents (Crocin and Safranal) on Ischemia-Reperfusion in Rat Skeletal Muscle. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2007, Available at: http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/.
14. Khori V., Naieb Pour M., Mir Abbasi A., Rakhshan E. The Effect of aqueous extract of Croucus sativus on the basic and functional electrophysiological properties of isolated perfused rabbit AV-Nodal preparation, Journal of Gorgan University of Medical Sciences, 2007, 8(3): 1-7.
15. El Daly E.S. Protective effect of cysteine and vitamin E, Croucus sativus and Nigella sativa Extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. J. Pharm. Belg., 1998, 53(2): 87-95.
16. Mohajeri D., Amouoghli Tabrizi B., Mousavi Gh., Mesgari M. Anti-diabetic activity of *Crocus sativus* L. (Saffron) stigma ethanolic extract in alloxan-induced diabetic rats. Research Journal of Biological Science, 2008, 3(9): 1102-1108.
17. Akhondzadeh S., Fallah-pour H., Afkham K., Khalighi F. Comparison of *croucus sativus* L. and imipramine mild to moderate depression: A pilot double-blind [ISRCTN45683816] Journal List BMC Complement Altern. Med., 2004, V.4.
18. Salomi M.J., Nair S.C., Panikkar P.R. Cytotoxicity and non-mutagenicity of *Nigela sativa* and saffron (*Crocus sativus*) in vitro. Proc. Ker. Sci. Congr., 1991, 5: 244.
19. Abdullaev F.I., Riveron Negrette L., Rotenburd Belacortu V., Kasumov F.J., Perez Lopez I., Hernandes J.M., Espinosa Aguirre J.J. Saffron as chemopreventive agent. In: Wenyi T, Ed. Food of 21st Century: Food and Resource Technology Environment. China: Ligth Industry Press, 2000, 185–195.
20. Abdullaev F.I., Caballero Ortega H., Riveron Negrette L., Pereda Iranda R., Hernandez J.M., Perez Lopez J., et al. Use of in vitro assays to assess the potential genotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). Tox. InVitro, 2003, 17: 731–6.
21. Abdullaev F.I., Espinosa-Aguirre J.J. Biomedical properties of saffron and its potential use in Cancer therapy and chemoprevention trials. Review, Cancer Detection and Prevention, 2004, 28: 426–432.
22. Martin G., Goh E., Neff A.W. Evaluation of the developmental toxicity of crocetin on Xenopus Food and Chemical Toxicology, 2002, 40(7): 959-964.
23. Loomis T.A. Essentials of Toxicology. Philadelphia: Lea and Febiger, 1968, 67-78.
24. Hosseinzadeh H., Khosravan V. Anticonvulsant effects of aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus* L. stigmas in mice. Arch Irn. Med., 2002, 5: 44–7.
25. Stockham S.L., Scott M.A. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. First Edition, Iowa State Press. A Blackwell Publishing Company, USA, 2002, 31-48.
26. Latimer K.S., Mahaffey E.A., Prasse K.W. Duncan & Parsse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology. Fourth Edition, Iowa State Press. A Blackwell Publishing Company, USA, 2003, 193-257.
27. Feldman B.F., Zinkl J.G., Jain N.C. Schalm's veterinary hematology, 5th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000, 186-298.
28. Noorbala A.A., Akhondzadeh S., Tahmacebi-Pour N., Jamshidi A.H. Hydro-alcoholic extract of Crocus sativus L. versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized pilot trial. J. Ethnopharm., 2005, 97(2): 281-284.
29. Moshiri E., Akhondzadeh Basti A., Noorbala A.A., Jamshidi A.H., Abbasi S.H., Akhondzadeh S. Crocus sativus L. (petal) in the treatment of mild-to-moderate depression: A double-blind, randomized and placebo-controlled trial. Phytomed., 2006, 13(9-10): 607-611.
30. Karimi Gh., Taiebi N., Hosseinzadeh H., Shirzad F. Evaluation of subacute toxicity of aqueous extract of Crocus sativus L. stigma and petal in rats. Journal of Medical

Archive of SID

www.SID.ir

Plants, Institute of Medical Plants, 2004, 12: 29-35.
31. Whitehead M.W., Hawkes N.D., Hainsworth I., Kingham G.C. A prospective study of the causes of notably raised aspartate transaminase of liver origin, Gut., 1999, 45(1): 129–133.
32. Burtis C.A., Ashwood E.R. Teitz Fundamentals of Clinical Chemistry (4ed.), NB Saunders Company, Philadelphia, 1996, 312-335.
33. Modaghegh M.H., Shahabian M., Esmaeili H.A., Rajbai O., Hosseinzadeh H. Safety evaluation of saffron (Crocus sativus) tablets in healthy volunteers. Phytomedicine, Article in Press.
34. Cullen J.M. Liver, Biliary system, and exocrine pancreas, Pathologic Basis of Veterinary Disease. McGavin MD, Zachary JF Ed.; Forth Edition, Mosby, London, 2007, 403-406.

Archive of SID

www.SID.ir