Archive of SID

Physiology and Pharmacology, 13(4), 397 - 403
Winter 2010 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Evaluation of the cytotoxic activity of crocin and safranal using potato disc and brine shrimp assays

Javad behravan [1,4*], Hossein Hosseinzadeh [2], Amir Rastgoo [3], Obeid. M.Malekshah[3], Mitra Hessani[4]

1. Department of Medical Biotechnology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2. Department of Pharmacodinamy and Toxicology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
3. Department of Medical Biotechnology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences,Mashhad, Iran
4. Biotechnology Research Center,Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received: 17 May 2009 **Accepted: 28 Dec 2009**

Abstract

Introduction: In this study, two constituents of saffron stigm a (crocin and safranal) were tested for possible cytotoxic and antitumoral activity using brine shrimp and potato disc assays.

Methods: In the brine shrimp assay, three wells containing 10 nauplii were tested for each concentration. After 24h, the number of the nauplii was counted. To investigate the antim icrobial activity of safranal and crocin against *Agrobactrium tumefaciens*, the MIC of these compounds were evaluated using microplate and spectrophotometry method. In the potato disc assay, discs of potato were cut with specific diameter and transferred on 1.5 % agar under laminar air cabinet. Discs were incubated with 50 µl of a mixture containing suspension of *Agrobactrium tumefaciens* (10^8 cfu/ml) and 50 µl of a solution of safranal (0.075, 0.150, 0.300, 0.450, 0.600 and 0.800 mg/ml) or crocin (0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 6.0 and 8.0 mg/ml) (1:1) in 25 خC for 20 days until the tumors were counted.

Results: The MIC of safranal and crocin were 1 and 10 mg/ml. The LC_{50} values of safranal and crocin against brine shrimp were 14.342 and 147.036 ppm. The percent of tumor growth inhibition of safranal at 0.075-0.800 mg/ml and crocin at 0.5-0.8 mg/ml were 5.6-90.2 % and 5.2-88.8 %, respectively and the EC_{50} Values of safranal and crocin against tumors were 0.31 and 2.34 mg/ml, respectively.

Conclusion: Both safranal and Crocin have remarkable toxic effect and suitable dose dependent antitumoral activity. Between the two compounds, safranal has higher toxic effect and antitumoral activity compared to crocin.

Key words: Safranal, Crocin, Brine shrimp, Potato disc.

*Corresponding author e-mail: behravanj@yahoo.com

Available online @:www.phypha.ir/ppj

www.SID.ir

Archive of SID

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۳ (٤)، ۳۹۷ – ٤٠٣
زمستان ۱۳۸۸

بررسی اثرات سیتوتوکسیسیتی کروسین و سافرانال به روش دیسک سیب زمینی و میگوی آب شور

جواد بهروان[1*]، حسین حسین زاده[2] ، امیر راستگو[3]، عبید محمد علیپور ملکشاه[3]، میترا حسانی[4]
۱. گروه بیوتکنولوژی دارویی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۲. گروه فارماکودینامی و سم شناسی و مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۳. گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۴. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

دریافت: ۲۷ اردیبهشت ۸۸ پذیرش: ۷ دی ۸۸

چکیده

مقدمه: در این مطالعه، احتمال سمیت و خواص ضد توموری دو ترکیب موجود در کلاله زعفران کروسین و سافرانال بـه روش میگـوی آب شـور و سـنجش دیسـک سـیب زمینی بررسی می شود.

روش‌ها: در روش میگوی آب شور،برای هر غلظت ، سه لوله آزمایش که هر کدام حاوی ۱۰ لارو زنده بودند مورد استفاده قرار گرفتند و بعد از ۲۴ سـاعت تعـداد لاروهـای مرده شمارش گردید. مقدار MIC سافرانال به روش میکروپلیت و MIC کروسین به روش کدورت تعیین شد. در روش سنجش دیسک سیب زمینی، دیسک ها به داخل پلیتهـای حاوی آگار ۱/۵٪ در زیر هود لامینار منتقل گردیدند و سپس با مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اگروباکتریوم تومه فشنز (غلظت10^8 cfu/ml) و ۵۰ میکرولیتـر از غلظـت هـای ۰/۵ mg/ml – ۸/۰ کروسین و ۰/۰۷۵–۰/۸۰۰ mg/ml سافرانال در دمای ۲۵ ^oC به مدت ۲۰ روز انکوبه شدند و سپس تعداد تومورها شمارش شد.

یافته‌ها: مقدار MIC سافرانال ۱ mg/ml و کروسین ۱۰ mg/ml تعیین گردید. مقدار LC_{50} بر علیه لاروهای میگوی آب شور بـرای سـافرانالppm ۰/۴ ±۱۴/۳و بـرای کروسین ۴/۷ mg/ml± ۱۴۷/۰ بدست آمد. درصد مهار رشـدتومور بـرای غلظتهـای ۰/۷۵۰–۰/۸۰۰ mg/ml سـافرانال و ۰/۵ mg/ml – ۸/۰ از کروسـین بـه ترتیـب ۵/۶٪ تـا ۹۰/۲٪ و ۵/۲٪ تا ۸۸/۸٪ و مقدار EC_{50} برای کروسین ۲/۳۴ mg/ml و برای سافرانال ۰/۳۱ mg/ml تعیین شد.

نتیجه‌گیری: هر دو ترکیب کروسین و سافرانال ضمن داشتن اثرات سمی قابل ملاحظه، دارای فعالیت ضد توموری مناسب و وابسته به دوز بودند. در این میان سـافرانال سـمیت و فعالیت ضد توموری بیستری نسبت به کروسین از خود نشان داد.

واژه‌های کلیدی: سافرانال ، کروسین ، میگوی آب شور ، دیسک سیب زمینی

مقدمه

زعفران تجاری از کلاله خشک شده گیاه *Crocus sativus* L بدست می آیدکه در منطقه آب و هوائی مدیترانه ، غرب آسیا و مناطق کم باران که دارای زمستان سرد و تابستان گرم هستند از جمله در ایران کشت می شود [۱۱] .

زعفران در طب سنتی به عنوان ضد اسپاسم ، کمک کننـده به هضم غذا، خواب آور، ضد نفخ، خلط آور، محرک و اشـتها آور شناخته شده است [۱۱] .

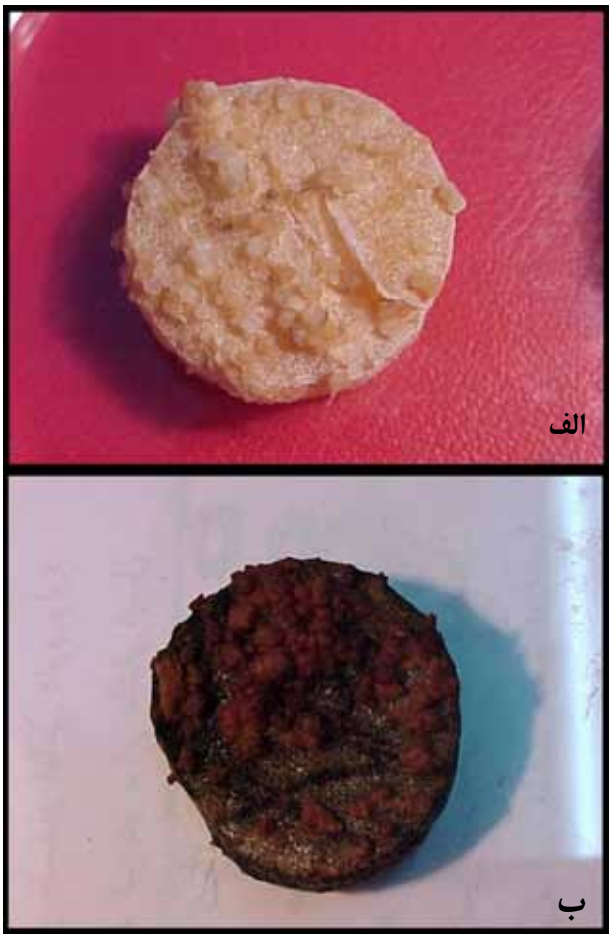
* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: behravanj@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

www.SID.ir

Archive of SID

در تحقیقات اخیر مشخص گردیده کـه کروسـین موجـود در زعفران عامل اثر آنتی اکسـیدانتی آن اسـت [۹]. عصـاره آبـی و الکلی زعفران اثر ضد افسردگی [۸] و ضد التهـاب نشـان داده [۱۳] و دارای قدرت جذب کنندگی رادیکالهـای آزاد مـی باشـد [۲].

در اوایل دهه ۹۰ میلادی برای اولین بـار گـزارش شـد کـه عصاره زعفران می تواند رشد سلولهای سرطانی را مهار کنـد [۷, ۱۰]. طی دهه گذشته چندین مطالعه در سیستم هـای حیـوانی و مدل ، تاثیر زعفران بر سلول هـای سـرطانی متنـوعی را اثبـات کردند [۳] و مشخص شد که زعفران دارای اثر مهاری وابسته به دوز بر روی کارسینوما، سارکوما،لوسمی و چنـدین نـوع سـرطان دیگر می باشد [۱۰]. در این مطالعه اثرات ضدتوموری و سـمیت دو ترکیب عمده کلاله زعفران سافرانال و کروسین بـه دو روش سنجش دیسک سیب زمینی و میگوی آب شور بررسی شد. ایـن



شکل ۱– نمایش تومورهای تاجی شکل ایجـاد شـده توسـط اگروبـاکتریوم تومـه فشنز بر دیسک سیب زمینی ، قبل (شکل الف) و بعد (شکل ب) از رنگ آمیزی بـا لوگول با غلظت ۰/۵ mg/ml کروسین

آزمون ها به عنـوان روشـهایی سـاده و دارای غربـالگری نسـبتا ارزان با هزینه های کمتر و نتایج قابل قبـول آمـاری در بررسـی فعالیت بیولوژیکی و استفاده درمانی از گیاهان داروئی می باشند.

مواد و روش ها

محیط کشـت Nutrient Broth و Soybean Casein از شرکت Himedia ، محیط کشت آگار ۱/۵٪ از شرکت Merck، کروسین و سـافرانال از شـرکت Fluka ،آمپـول وینکریسـتین و جنتامایسین از شرکت البرز دارو، سدیم هیپوکلریت، لوگول، نمک های سدیم کلراید دو آبه، پتاسیم کلراید، منیزیم کلراید، منیـزیم سولفات هفت آبه، سدیم هیـدروژن کربنـات و اسـید بوریـک از شرکت Merck، نمک تترازلیـوم از شـرکت Riedl-de Hean، کیسـت آرتمیـا از شـرکت Artem و دی متیـل سولفوکسـاید از شرکت Merck تهیه شد.

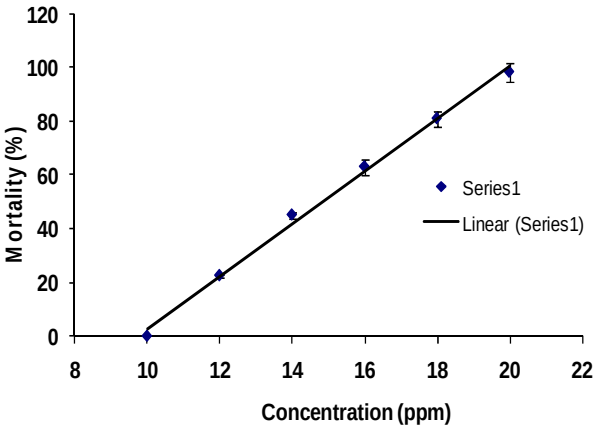
برای آزمون بررسی وتعیین سمیت حاد (LC_{50}) به روش میگوی آب شور، ابتدا مقادیر NaCl ۲۷/۰ g، KCl ۰/۵ g، $MgCl_2.6H_2O$ ۴/۰ g، $CaCl_2.2H_2Og$ ۱/۰ g، ۲/۴ g، $MgSO_4.7H_2O$ ، HBO_3 ۱/۰ g ، $NaHCO_3$ ۱/۰ g را در بالن ژوژه ۱۰۰۰ ml حل شد و با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ ml رسانده شد و به صورت دربسته در 4^oC نگهداری گردید .

به منظور تبدیل تخم به لارو ، پلیت های از قبل تهیه شـده را با محلول مصنوعی مشابه آب دریا متشکل از NaCl ۲۷/۰ g، KCl ۰/۵ g ، $CaCl_2.2H_2O$ ۱/۰ g، $MgCl_2.6H_2O$ ۴/۰ g، $MgSO_4.7H_2O$ ۴/۰ g، HBO_3 ۱/۰ g ، $NaHCO_3$ ۱/۰ g حل شده در ۱۰۰۰ ml آب مقطر، شستشـو داده و ۱ mg تخـم میگو در آنها ریخته شد. پلیت ها به مدت یک سـاعت زیـر نـور لامپ قرار داده شده و بعد از آن به مدت ۱ ساعت در انکوباتور 25^oC زیر نور لامپ انکوبه شدند. لاروهای حاصله بـه مـدت ۱۰ دقیقه زیر نور لامپ قرار گرفتند و سپس توسط میکروپیپـت، بـه پلیت دیگری که حـاوی محلـول مصـنوعی مشـابه آب دریـا بـا دمای 25^oC تـا 30^oC منتقـل شـده و بـرای تولیـد لاروهـای مرحله ۲ مجددا در 25^oC انکوبه شدند.

در مرحله محلول سازی ابتدا محلـول اسـتوکی توسـط حـل کردن ۱۰۰mg از نمونه هـای کروسـین و سـافرانل در محلـول مصـنوعی مشـابه آب دریـا بـه حجـم۱۰ ml سـاخته شـد

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- نمودار تاثیر غلظت های مختلف سافرانال بر درصد مرگ و میر لاروهای آرتمیا.اندازه گیری ها ابتدا در محدوده غلظتی ppm ۰/۱ تا ۱۰۰۰۰ و سپس در محدوده غلظتی ppm ۱۰ تا ۱۰۰ و در نهایت در محدوده غلظتی ppm ۱۰ تا ۲۰ از سافرانال انجام شد و در هر غلظت از سافرانال، ۳۰ عدد لارو زنده مورد استفاده قرار گرفت.

(غلظتppm ۱۰۰۰). سپس غلظتهایppm ۱۰۰ ، ۱۰ ، ۱ ، ۰/۱ با استفاده از محلول استوک بدست آمد. برای بهبود حلالیت سافرانال به محلول حاوی و نمونه کنترل آن ، توئین ۸۰ اضافه گردید .

در مرحله بعد لاروها با دانسیته ۱۰ عدد در هر خانه در پلیت های ۲۴ خانه توزیع شدند و با غلظت های مختلف از کروسین و سافرانال و یا محلول مصنوعی مشابه آب دریا به تنهایی ، به عنوان کنترل منفی به مدت ۲۴ ساعت در ^{o}C ۲۵ تیمار شدند. سپس درصد لاروهای زنده مشخص گردید و در صورت مردن بیشتر از ۱۰٪ لاروها در هر غلظت، تست تکرار می شد.

تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) سافرانال بر باکتری اگروباکتریوم تومه فشنز، به روش میکروپلیت در محیط کشت Nutrient Broth صورت گرفت و جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت انتخاب شد. نتایج براساس میزان تغییر جذب خوانده شده در دستگاه Microplate reader در هر نمونه پس از افزودن ml ۰/۴ نمک تترازولیوم 5mg/ml بدست آمد.

به دلیل ماده رنگی بودن کروسین ، برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) کروسین بر باکتری اگروباکتریوم تومه فشنز از روش کدورت سنجی توسط اسپکتروفوتومتر استفاده شد. که در اینجا هم از جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نتایج بر اساس فرمول زیر بدست آمد:

MIC= (مقدار جذب سوسپانسیون میکروب همراه کروسین- مقدار جذب محلول کروسین) - جذب سوسپانسیون میکروب به تنهایی برای انجام آزمون دیسک سیب زمینی ،پس از شستشو، سیب زمینی ها در هیپوکلریت سدیم w/v ۰/۱ به مدت ۲۰ دقیقه غوطه ور و ضد عفونی شده و تحت هود لامینار دیسکهایی به قطر۱/۵ سانتیمتر و ارتفاع ۰/۵ سانتیمتر از آنها تهیه گردید. این دیسک ها به پلیت حاوی آگار ۱/۵٪ منتقل گردید. جهت آزمون هر غلظت ۵ پلیت مورد استفاده قرار گرفت و در هر پلیت ۶ دیسک قرار داده شد. غلظت های مورد استفاده برای کروسین و سافرانال در این روش با توجه به نتایج بدست آمده از روش های دیگر انتخاب گردید به نحوی که همگی پائین تر از غلظت MIC باشند. به عنوان کنترل مثبت از وینکریستین که خاصیت تومورزایی آن اثبات شده استفاده گردید.

پس از کشت باکتری اگروباکتریوم تومه فشنز (ATCC 23341) درمحیط SCDA ، توسط میکروپیپت، باکتری (^{۸}۱۰ cfu/ml) بر روی دیسک های سیب زمینی تلقیح شد. سپس پلیت های حاوی دیسک در انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ تا ۴ هفته نگهداری شدند. سپس تومورهای سطح دیسک ها با محلول لوگول آغشته شده و شمارش شدند. تومورها به دلیل نشاسته اندک، برخلاف بافت سیب زمینی، پس از رنگ آمیزی با لوگول بی رنگ می شوند و قابل شمارش می گردند. درصد مهار رشد نسبت به گروه منفی (سوسپانسیون میکروبی همراه آب مقطر) سنجیده و به صورت IC_{50} محاسبه شد(شکل ۱. الف و ب).

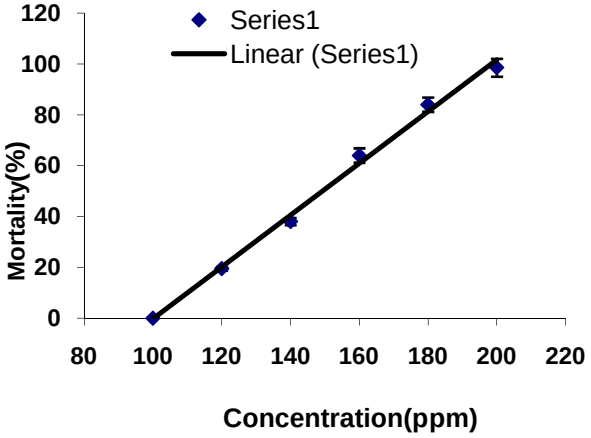
به منظور آنالیز آماری داده ها بعد از حصول اعداد مربوط به دو آزمون فوق ، از نرم افزارPharm.PCS جهت تعیین مقدار LC_{50} و EC_{50} سافرانال و کروسین و مقایسه آنها با هم استفاده گردید. جهت رسم نمودارها از برنامه نرم افزاری Sigmaplot-50 و جهت انجام محاسبات آماری از برنامه نرم افزاری Instat استفاده شد.

یافته ها

در این مطالعه به منظور اندازه گیری سمیت حاد سافرانال و کروسین، میزان مرگ و میر میگوی اب شور در تماس با غلظت های مختلف اندازه گیری شد. LC_{50} به دست آمده با این روش برای سافرانال ppm ۰/۴± ۱۴/۳ و در مورد کروسین

www.SID.ir

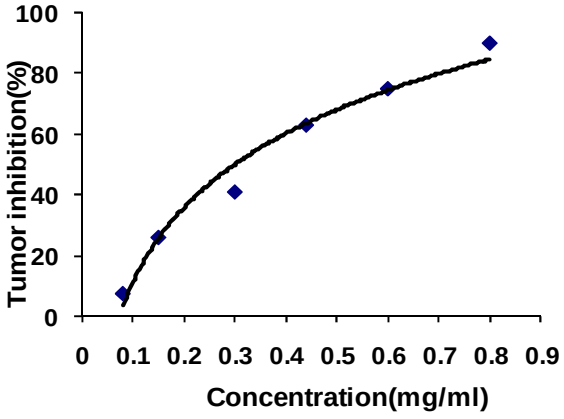
Archive of SID



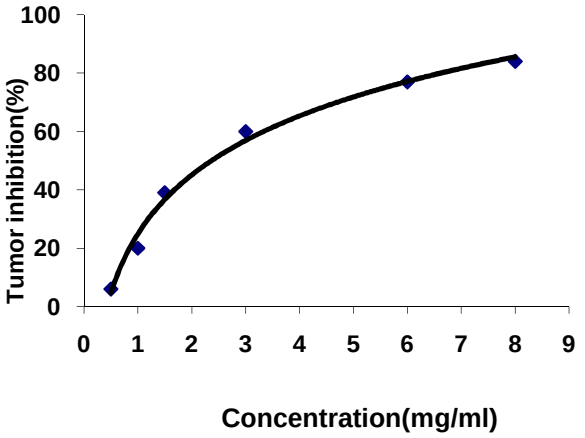
شکل ۳- نمودار تاثیر غلظت های مختلف کروسین و درصد مرگ و میر لاروهای آرتمیا. اندازه گیری ها ابتدا در محدوده غلظتی ppm ۰/۱ تا ۱۰۰۰۰ و سپس در محدوده غلظتی ppm ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ و در نهایت در محدوده غلظتی ppm ۱۰۰ تا ۲۰۰ از سافرانال انجام شد و در هر غلظت از سافرانال، ۳۰ عدد لارو زنده مورد استفاده قرار گرفت.

۱۴۷/۰ ±۴/۷ppm می باشد. با توجه به نتایج بدست آمده تفاوت معنی داری ($p<۰/۰۵$) بین LC_{50} دو ترکیب وجود دارد.

به منظور بررسی میزان MIC ، دو ترکیب سافرانال و کروسین در غلظت های مختلف به همراه نمک تترازولیدوم در مجاورت باکتری اگروباکتریوم تومه فشنز قرار گرفتند و غلظتی را که باعث توقف رشد میکروبی و به دنبال آن تغییر رنگ می شد، برای تعیین MIC مورد استفاده قرار گرفت که ۱ mg/ml به عنوان MIC سافرانال و ۱۰ mg/ml به عنوان MIC کروسین مشخص گردید.



شکل ٤- نمودار درصد مهار رشد تومورهای ناشی از آگروباکتریوم تومه فشنز در حضور سافرانال در روش دیسک سیب زمینی. تعداد دیسک های مورد مطالعه در هر غلظت ۲۰ عدد می باشد که میانگین درصد مهار نسبت به کنترل منفی تهیه شده است. در این آزمایش غلظت های mg/ml ۰/۰۷۵ تا mg/ml ۰/۸۰ از سافرانال مورد استفاده قرار گرفت که میزان مهار تومورزائی از ۵/۶ ٪ تا ۹۰/۲ ٪ بدست آمد.



شکل ۵- نمودار نشانگر درصد مهار رشد تومورهای ناشی از آگروباکتریوم تومه فشنز در حضور کروسین در روش دیسک سیب زمینی. تعداد دیسک های مورد مطالعه در هر غلظت ۲۰ عدد می باشد که میانگین درصد مهار نسبت به کنترل منفی تهیه شده است. در این آزمایش غلظت های mg/ml ۰/۵ تا mg/ml ۸/۰ از کروسین مورد استفاده قرار گرفت که میزان مهار تومورزائی از ۵/۲ ٪ تا ۸۸/۸ ٪ بدست آمد.

در سنجش دیسک سیب زمینی ، اثر ضدتوموری بر اساس کاهش ۲۰٪ و بالاتر از آن در تعداد تومورهای ناشی از اگروباکتریوم تومه فشنز نسبت به دیسک کنترل منفی مشخص می شود. باید توجه داشت که مواد مورد مطالعه در غلظت های مورد مطالعه باعث مرگ باکتری نشود زیرا در غیر این صورت نتایج منفی کاذب ایجاد می گردد. از آنجا که MIC به دست آمده برای سافرانال و کروسین به ترتیب حداقل mg/ml ۱ و mg/ml ۱۰ بودند، بنابراین بررسی کاهش تعداد تومور ها در غلظت های کمتر از این دو عدد قابل اعتمادتر است .

مقدار EC_{50} سافرانال mg/ml ۰/۰۴ ± ۰/۳۱ و کروسین mg/ml ۰/۳۵± ۲/۳۴ بدست آمد که تفاوت معنی داری ($p <۰/۰۵$) دارند. در دیسک های تیمار شده با غلظت µg ۶/۲۵ وینکریستین (کنترل مثبت) هیچ گونه رشد توموری مشاهده نگردید. در این سنجش سافرانال فعالیت ضد توموری بیشتری نسبت به کروسین از خود نشان داد(شکل ۲ و ۳) .

بحث

در مورد آزمون ضد میکروبی با توجه به MIC بدست آمده برای سافرانال و کروسین که به ترتیب mg/ml ۱و mg/ml ۱۰ تعیین شد، می توان نتیجه گرفت که سافرانال از خاصیت ضد

www.SID.ir

Archive of SID

میکروبی بیشتری بر روی میکروب اگروباکتریوم برخوردار است. در حالی که در آزمون دیگری که جهت بررسی خاصیت ضد میکروبی ترکیبات اختصاصی زعفران، کروسین،کروستین، پیکروکروسین و سافرانال بر روی سه سویه اشرشیاکلی، استافیلوکوس آرئوس و پسودوموناس آئروژینوزا توسط Abduliaev و Lai انجام گرفته است، تنها سافرانال اثر ضد میکروبی از خود نشان داد [۶ , ۱۲] .

در مورد اثرات ضد توموری سافرانال و کروسین باید گفت که بر طبق نتایج بدست آمده ترکیب سافرانال کلاله زعفران نسبت به کروسین علاوه بر اینکه سمیت حاد بیشتری از خود نشان می دهد، اثرات ضد توموری بیشتری هم دارد. در مطالعه دیگری که توسط scribano و همکارانش انجام شد اثر ضد سرطانی عصاره الکلی کلاله زعفران بر روی سلولهای سرطانی انسان Hela مورد بررسی قرار گرفت، مقدار LD_{50} برای عصاره اتانولی کلاله زعفران ۲/۳۰ mg/ml ، کروسین ۲/۹۳ mg/ml ، سافرانال ۰/۱۲ mg/ml و برای پیکروکروسین ۰/۹۹ mg/ml گزارش شد. در این تحقیق کروسین قدرت ضد توموری خوبی از خود نشان داد [۴]. همچنین در مطالعه دیگری که توسط Abduliaev و همکاران انجام گرفت، اثر کروسین، کروستین و دی متیل کروستین در مهار رشد و القای تمایز سلولی لوسمی پروستیک مورد بررسی قرار گرفته بود IC_{50} برای کروستین ۰/۶۶ mg/ml، برای دی متیل کروستین ۰/۲۸ mg/ml و برای کروسین ۱/۹۵ mg/ml بدست آمد [۱] . در مطالعه دیگر Abduliaev که به روش کلونی زائی سلولهای توموری انجام شد، کروستین فاقد اثر سمیت سلولی وابسته به دوز روی DNA و RNA و سنتز پروتئین روی سلولهای بدخیم انسان بود [۵]. نتایج تحقیق حاضر که مقدار EC_{50} سافرانال و کروسین به ترتیب ۰/۳۱ mg/ml و ۲/۳۴ mg/ml را بدست داد، با نتایج مطالعاتی که بر روی رده سلولی Hela انجام شده است، همخوانی دارد. بنابراین احتمالا محدوده دوزهای موثره بدست آمده، به نوع سلولهای مورد مطالعه بستگی دارد.

در مجموع در دو آزمون غربالگری که به منظور بررسی اثرات سمیت حاد وتعیین LC_{50} و بررسی اثرات ضد توموری و تعیین EC_{50} دو ترکیب عمده کلاله زعفران صورت گرفت، هر دو ترکیب ضمن داشتن اثرات سمی قابل ملاحظه، دارای فعالیت ضد توموری مناسب و وابسته به دوز بودند، به طوری که غلظت ۰/۸۰۰ mg/ml سافرانال فعالیت ضد توموری تا حدود ۹۰/۲ ٪ از خود نشان داد. بنابراین روش غربالگری مورد استفاده در این مطالعه، که نوعی روش برون تنی محسوب می شود، در کنار نتایج قبلی بدست آمده از سایر روش های غربالگری، بار دیگر بر فعالیت ضد توموری مهمترین ترکیبات زعفران صحه می گذارد (شکل ۵ و۶).

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شده و نویسندگان سپاس خود را در این رابطه اعلام می دارند.

References

[1] Abduliaev F, Plant-derived agents against cancer. In: Gupta SK, editor. ***Pharmacology and Therapeutics in the New Millennium.*** New Delhi: Narosa Publishing House, 2001, p. 345-354.

[2] Abdullaev FI, Biological effects of saffron. ***Biofactors*** 4 (1993) 83-86.

[3] Abduliaev FI, Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron(Crocus sativus L). ***EXP Biol Med*** 227 (2002) 20-25.

[4] Alonso GL, scribano J, Coca-prados M, Frenandoz GA, Crocin,safranal and picrocrocin from saffron(Crocus sativus L.) inhibit the growth of human cancer ell in vitro. ***Cancer lett*** (1996) 23-30.

[5] Frenkel GD ,Abduliaev FI, Effect of saffron on cell colony form ation and cellular nucleic acid protein synthesis. ***Biofactors*** 3 (1992) 201-204.

[6] Frenkel GD, Abduliaev FI, The effect of saff ron on intracellular DNA,RNA and protein synthesis in malignant and non-malignant human cells. ***Biofactors*** 4 (1992) 43-45.

[7] Gonzalez DE, Mejia E, AbduliaevFI, Antitumor activity of natural substances:lectins and saffron. ***Arch Latinoam Nutr*** 47 (1997) 195-202.

[8] Karimi GH, Hosseinzadeh H, Niapoor M,

www.SID.ir

Archive of SID

Antidepressant effects of Crocus sativus stigma extracts and its constituents, crocin and safranal, in mice. ***Acta Hort*** 650 (2004) 435-45.

[9] Moorkoth S, Badami S, Ranai RS, Kannan E, Bhojraj S, Antioxidant activity of Caesalpinia Sappan heartwood. ***Biology pharmacology Bul*** 26 (2003) 1534-1537.

[10] Panikkar B, Nair SC, Panikkar KR, Antitumor activity of saffron (Crocussativus). ***Cancer Lett*** 57 (1991) 109ت 114.

[11] Recio MC, Rios JL, Giner RM, Manez S, An update review of saffron and its active constituents. ***phytother Res*** 10 (1996) 189-193.

[12] Roy J, Lai PK, Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. ***Current Medical Chem*** 11 (2004) 1451-1460.

[13] Younesi HM, Hosseinzadeh H, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Crocus sativus L. stigma and petal extracts in mice. ***BMC Pharmacol*** 2 (2002) 1-8.

www.SID.ir