Archive of SID

تحقیقی

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.

Downloaded from goums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 8th 2018

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 به‌دلیل دارا بودن اثر آنتی‌اکسیدانی و از بین برنده رادیکال‌های آزاد، ضروری به‌نظر می رسد. 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 ۳٦ سر موش سوری نر به‌طور تصادفی به ٦ گروه ٦ 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 mg/kg/bw و ٤۰ محلول در روغن ذرت، گروه چهارم عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت ۸۰ mg/kg/bw ، گروه پنجم و ششم به‌ترتیب پاراکوات با غلظت ۲۰ mg/kg/bw و ٤۰ را به همراه زعفران با غلظت ۸۰ mg/kg/bw به صورت گاواژ دریافت کردند. بعد از ۳۰ روز تیمار و بیهوش نمودن موش‌ها، خون‌گیری از قلب برای مطالعه مالون دی آلدئید (MDA)، آنزیم های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات 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 هپاتوسیت‌ها و التهاب و نیز افزایش آماری معنی‌داری در میزان MDA و آنزیم‌های AST و ALT مشاهده شد (P<۰/۰۵). زعفران موجب کاهش معنی‌دار میزان MDA و آنزیم‌های ALT و AST در مقایسه با موش‌های تیمار شده با پاراکوات گردید (P<۰/۰۵). 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 ، پاراکوت ، 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 ۳۲۷۷٦۷۰۷-۰٤٤ ، نمابر ۳۲۷۵۲۷٤٦

وصول مقاله : ۱۳۹٦/۲/۱۱ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹٦/۹/٤ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٦/۹/۲۷

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

مقدمه

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 (گراماکسون) 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 می گردد. در حالت مزمن نیز می‌تواند در اندام‌هایی مانند سیستم اعصاب مرکزی، کبد، کلیه، چشم و سیستم ایمنی مشکلاتی ایجاد نماید. این ماده شیمیایی می‌تواند سلامت انسان، حیوانات و حتی موجودات آبزی را به خطر بیاندازد (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 گلوتاتیون پراکسیداز شده که این عمل نیز باعث افزایش مصرف گلوتاتیون می‌شود (۳).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 8th 2018

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 (۴و۵). زعفران و مواد موثره آن اثرات ضدتومور، آنتی‌اکسیدانی و از بین برنده رادیکال‌های آزاد، تقویت کننده حافظه، ضد درد و التهاب، پایین آورنده فشارخون و چربی خون دارد (۶). طعم تلخ زعفران ناشی از وجود ماده‌ای بنام پیکرو کروسین است. این ماده بر اثر تجزیه حرارتی یا آنزیمی به آلدییدی به‌نام سافرانال تبدیل می‌شود. کروسین‌ها مسؤول رنگ زعفران هستند. کاروتنوییدهای دیگری مانند کروسین،کروستین، سافرانال مواد موثره اصلی زعفران هستند که اثرات از بین برنده رادیکال های آزاد و آنتی اکسیدانی دارند (۶). برخی از خواص زعفران به علت وجود کاروتنوییدهاست که اثرات محافظتی خود را توسط تعدیل پراکسیداسیون لیپید – 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 ۳۰-۲۸ 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 وغذا در شرایط اتاق، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد، 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 قائنات 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 ۸۰سی‌سی 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 شد. سپس پلیت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا الکل آن تبخیر شود. پودر حاصله را وزن کردیم وتا زمان استفاده داخل فویل آلومینیومی و در یخچال نگهداری شد. عصاره در محل آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه تهیه گردید.

گروه‌بندی 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 به‌همراه 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 ۴۰mg/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 گروه ها به مدت ۳۰ روز و در ساعات مشخص (۸ صبح هر روز)، به صورت گاواژ 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 موش ها به‌وسیله کتامین - زایلازین به‌صورت تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند. سپس شکم حیوانات باز شد و سریعاً خون گیری 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 دی آلدئید، کاتالاز و TAOC (سنجش اکسایشی) به دمای منفی ۸۰ درجه سانتی گراد انتقال داده شد. نیمی دیگر از بافت کبد برای مطالعات بافتی جدا شد و به مدت ۷۲ساعت در دمای اتاق به فرمالین ۱۰درصد انتقال یافت. بعد از تثبیت بافت و آبگیری به‌وسیله الکل و شفاف‌سازی در گزیلل و تهیه بلوک‌های پارافینی مقاطعی به قطر ۶ میکرون تهیه و بعد از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین - ائوزین توسط میکرسکوپ نوری(Olmpus, Japan, model CHD) مطالعه گردید. از هر گروه ۶ سر موش و از هر موش ۴ اسلاید با

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 8th 2018

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 تیوباربیوتوریک اسید وارد واکنش شده و تولید کمپلکس رنگی می نماید. اساس روش، اندازه گیری اسپکتوفتومتریک 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 تیوباربیوتوریک اسید ۰/۶۷ درصد در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد برای ۲۵ دقیقه انکوبه شد. ۵دقیقه بعد از خنک شدن محلول، رنگ صورتی ناشی از واکنش مالون دی آلدئید با تیوباربیوتوریک اسید ظاهر و با اسپکتروفتومتر 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 براساس 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 ۱۰درصد 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 سانتریفوژ گردید. در مرحله بعدی ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی سانتریفوژ شده به ۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات اضافه گردید و پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آب اکسیژنه، جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در پایان مقادیر بر حسب U/gr tissue (U=µmol) بیان شد (۱۰).

سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (TAOC): ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام توسط تست FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) بررسی گردید. ارزیابی FRAP تغییر در جذب ۵۹۳ نانومتر به واسطه تشکیل ترکیب FeII–Tripyridyhriazine آبی رنگ از FeIII اکسید شده بی‌رنگ اندازه گیری شد. برای تهیه هموژنای بافت، ۱۰درصد وزن/حجم بافت کبد، Kcl اضافه گردید و در هاون کوبیده شد. سپس هموژنای تهیه شده با دور ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. از محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به لوله آزمایش منتقل گردید و ۳ میلی‌لیتر 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 mol /mgr tissue بیان گردید (۱۰). میزان سمیت هر علف‌کش به تجمع بافتی، نوع و ساختار ماده مورد مطالعه و برهمکنش این ماده با جانور در معرض سم بستگی دارد. باتوجه 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 واکوئل‌های آن از هم گسیخته شده و باعث ایجاد آسیب‌های شدید کبدی می گردد (۱۱).

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-22 و آزمون یک طرفه ANOVA و تست تعقیبی Tukey در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

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

در تمامی گروه ها به‌غیر از گروه چهارم (دریافت کننده عصاره هیدروالکلی زعفران) افزایش معنی دار میزان AST (۲۶/۹۴±۱/۲۱) نسبت به گروه کنترل (۲/۳۲±۲۹/۹۷) مشاهده شد (P<۰/۰۵). بیشترین میزان AST مربوط به گروه سوم (دریافت کننده دوز بالای پاراکوات) بود. در گروه دوم (دریافت کننده دوز کم پاراکوات) نیز این افزایش معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در حالی که مقدار AST درگروه های پنجم و ششم (دریافت کننده همزمان پاراکوات و عصاره هیدروالکلی زعفران) در مقایسه با گروه‌های دوم و سوم به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد (P<۰/۰۵).

میزان ALT در گروه چهارم (۲/۴۹±۶۳/۴۱) نسبت به گروه کنترل (۲/۱۸±۶۷/۱۹) کاهش غیرمعنی‌داری یافت و این میزان در سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۵). بیشترین میزان ALT مربوط به گروه سوم (۵/۶۴±۱۶۳/۴۱) تعیین شد. در گروه‌های پنجم و ششم کاهش معنی‌دار ALT نسبت به گروه‌های دوم و سوم دیده شد.

نتایج به‌دست آمده از تست TAOC نشان داد که بیشترین مقدار مربوط به گروه چهارم (۰/۶۴±۱۱/۶۰) بود و در سایر گروه‌ها کاهش معنی‌دار TAOC نسبت به گروه کنترل (۰/۵۸±۹/۰۸) دیده شد (P<۰/۰۵). در گروه‌های دریافت کننده پاراکوات مقدار TAOC از همه گروه‌ها کمتر بود. در حالی که در گروه های پنجم و ششم افزایش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی دیده شد (P<۰/۰۵).

در تمامی گروه‌ها کاهش معنی‌دار کاتالاز نسبت به گروه کنترل (۲/۳۳±۱۶/۷۰) دیده شد (P<۰/۰۵). در گروه‌های دوم و سوم مقدار کاتالاز از همه گروه‌ها کمتر بود. در حالی که گروه‌های پنجم و

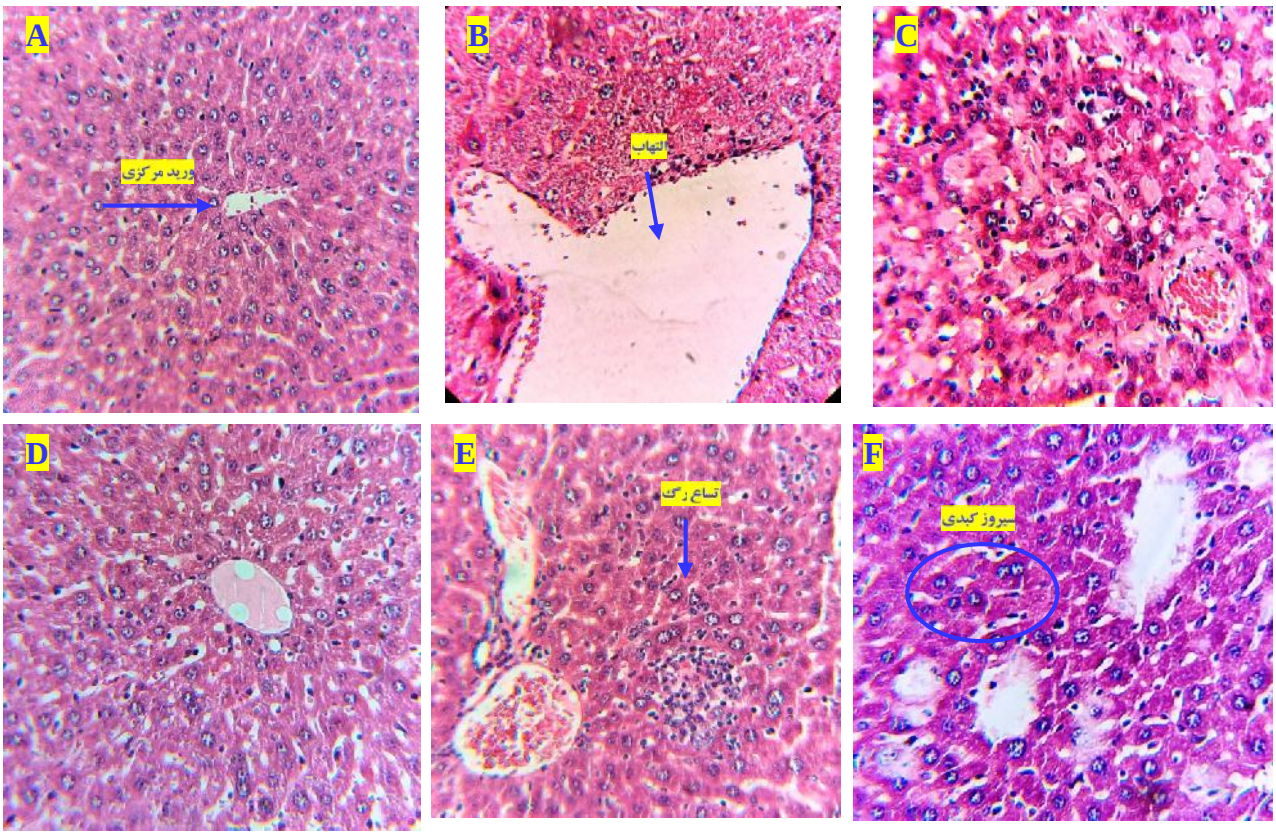
www.SID.ir

Archive of SID

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

	میانگین و انحراف معیار				
	کاتالاز (µ mol /gr tissue)	TAOC (mmol /mgr)	MDA (nmol/gr tissue)	AST (mg/dl)	ALT (mg/dl)
گروه اول	۱۶/۷۰± ۲/۳۳	۹/۰۸± ۰/۵۸	۱/۶۷± ۰/۱۶	۲۹/۹۷± ۲/۳۲	۶۷/۱۹± ۲/۱۸
گروه دوم	۱۱/۲۰± ۱/۹۱* İ	۴/۸۲± ۰/۴۰ *#	۴/۶۴± ۰/۳۶ *#	۶۲/۳۶± ۶/۳۳ * İ	۲۱۷/۹۹± ۶/۴۶ * İ
گروه سوم	۴/۶۲± ۶/۹۰ * İ	۱۴/۰۵± ۰/۳۱ * İ	۵/۵۱± ۰/۲۶ * İ	۷۴/۳۵± ۳/۸۵ * İ	۲۶۰/۱۳±۸/۶۵ * İ
گروه چهارم	۱۱/۰۵± ۱/۱۸ *	۱۱/۶۰± ۰/۶۴ *	۲/۰۴± ۰/۳۲	۲۶/۹۴± ۱/۲۱ *	۶۳/۴۱± ۲/۴۹
گروه پنجم	۱۴/۶۰± ۱/۸۹ #*	۵/۵۵± ۰/۲۶ #*	۳/۸۲± ۰/۱۴ #*	۴۸/۰۷± ۱/۸۵ #*	۱۱۶/۶۱± ۶/۸۹ #*
گروه ششم	۱۰/۴۰± ۱/۵۰ #*	۵/۲۷± ۰/۵۵ #*	۴/۱۵± ۰/۲۸	۶۱/۶۷± ۲/۹۰ #*	۱۶۳/۴۱± ۵/۶۴ #*

گروه اول (کنترل)؛ گروه دوم (پاراکوات با غلظت ۲۰mg/kg/bw)؛ گروه سوم (پاراکوات با غلظت ۴۰mg/kg/bw)؛ گروه چهارم (عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت ۸۰ mg/kg/bw)؛ گروه پنجم (پاراکوات با غلظت ۲۰ mg/kg/bw همراه با عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت ۸۰ mg/kg/bw)؛ گروه ششم (پاراکوات با غلظت ۴۰ mg/kg/bw همراه با عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت ۸۰ mg/kg/bw)
* P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل؛ İ P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه تیمار شده با زعفران و پاراکوات
# P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه تیمار شده با زعفران



شکل ۱ : مقطع عرضی از بافت کبد در گروه‌های مورد مطالعه (بزرگ‌نمایی ۴۰۰ × ، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین –ائوزین)
A) کنترل؛ B) گروه دوم (پاراکوات با غلظت ۲۰mg/kg/bw)؛ C) (پاراکوات با غلظت ۴۰mg/kg/bw)
D) (عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت ۸۰ mg/kg/bw)؛ E) (پاراکوات با غلظت ۲۰ mg/kg/bw همراه با عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت ۸۰ mg/kg/bw)؛ F) (پاراکوات با غلظت ۴۰ mg/kg/bw همراه با عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت ۸۰ mg/kg/bw)

ششم افزایش معنی‌دار کاتالاز دیده شد (P<۰/۰۵).

در تمامی گروه‌ها به‌غیر از گروه چهارم افزایش معنی دار MDA نسبت به گروه کنترل (۰/۱۶±۱/۶۷) مشاهده شد (P<۰/۰۵). بیشترین مقدار MDA مربوط به گروه سوم (۰/۲۶±۵/۵۱) بود. گروه های پنجم و ششم کاهش معنی‌داری در میزان MDA نسبت به گروه‌های دوم و سوم نشان دادند (P<۰/۰۵).

در مطالعه بافتی کبد گروه کنترل، دستجات هپاتوسیت 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 دریافت‌کننده دوز کم پاراکوات به همراه زعفران این التهاب بهبود یافته، اتساع عروقی و

Downloaded from goums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 8th 2018

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from goums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 8th 2018

کاهش ذخایر گلیکوژنی نیز در اغلب حیوانات مشاهده گردید. در همه حیوانات دریافت‌کننده دوز بالای پاراکوات سیروز شدید کبدی و تخریب هپاتوسیت‌ها و در تعدادی از موش‌ها التهاب نیز مشاهده گردید. در اغلب حیوانات گروه دریافت کننده 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 دریافت کننده 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 دریافت کننده زعفران خالص بود. در گروه‌های دریافت کننده 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 دریافت کننده همزمان پاراکوات و زعفران میزان TAOC و کاتالاز نسبت به گروه‌های دریافت کننده پاراکوات افزایش و میزان MDA کاهش معنی‌داری نشان دادند که احتمالاً عصاره آبی زعفران به عنوان عامل آنتی اکسیدان عمل کرده و از تولید رادیکال آزاد اکسیژن جلوگیری کرده است. همچنین مقدار ALT و AST در گروه‌های دریافت کننده زعفران نسبت به گروه‌های دریافت کننده پاراکوات کاهش معنی داری نشان داد. زعفران به‌دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی سبب بهبود آسیب بافتی ناشی از مصرف پاراکوات گردید.

با افزایش غلظت سم پاراکوات، واکوئل های موجود در کبد بزرگ‌تر شده و ضمن پاره شدن غشاء ایجاد سیروز و نکروز کبدی می کند (۱۱). این نتایج ضمن تایید مشاهدات تحقیق حاضر می تواند نشان‌دهنده فرآیند واکوئولاسیون 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 می کند (۱۲). افزایش در فعالیت پلاسمایی آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز به احتمال قوی به علت نقص در عملکرد کبد روی می‌دهد (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 می گردد و این مواد به‌ویژه رادیکال‌های هیدروکسیل موجب آسیب بافتی خواهند شد (۱۳). در مکانیسم های سمیت پاراکوات تولید رادیکال آزاد اکسیژن درگیر است که آن هم منجر به استرس اکسیداتیو می شود. 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 آلدهیدی مثل MDA که محصول نهایی لیپیدپراکسیداسیون است؛ می گردد (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 ارگان های اصلی و قابل توجه هستند که تحت تأثیر انواع سموم قرار می گیرند. سموم روی هپاتوسیت‌ها اثر داشته و سبب تخریب آنها می گردند (۱۵).

تاکنون 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 می کنند. لذا تامین ذخایر آنتی‌اکسیدان، به‌منظور کاهش آثار تنش اکسایشی امری مهم تلقی می‌شود (۱۶). ارزش کلاله خشک شده زعفران به علت وجود سه متابولیت ثانویه اصلی بنام کروسین، پیکروکروسین و سافرانال است. زعفران به‌واسطه ترکیبات کاروتنوئیدی خود باعث تنظیم فعالیت پراکسیدازی لیپیدها،آنتی‌اکسیدان‌ها و سم‌زدایی می گردد (۷). کروسین‌های زعفران با افزایش غیرمستقیم بیان mRNA آنزیم گاماگلوتامیل سیستئینیل سنتتاز (GCG-Y) میزان گلوتاتیون احیا شده درون سلول را افزایش می‌دهند که در تنظیم فعالیت پر اکسیدازی لیپیدها و آنتی‌اکسیدان‌ها نقش موثری دارد. زعفران با تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی موجب کاهش استرس‌های اکسیداتیو می گردد (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 فلاونوئیداست که در انواع گیاهان یافت می شود و پتانسیل خوبی در جلوگیری از فیبروز کبدی و کلیه دارد.کروستین طیف وسیعی از فعالیت های بیولوژیکی شامل آنتی‌اکسیدان، ضدالتهاب و ضدتوموری دارد. با توجه به اثر مفید کروستین در حفاظت در برابر فیبروز کبد، ریه، پوست به‌طور قابل توجه ممکن است کروستین موجب منع فعالیت فیبروبلاستی و همچنین فیبروز کبدی در موش ها شود. کروستین ممکن است مانع فعالیت فیبروبلاست های کشت شده و همچنین بهبود فیبروز اندام در

www.SID.ir

Archive of SID

کبد، ریه و پوست شود. بعضی از پلی‌فنول‌ها مانند کروستین می‌تواند مانع رشد سلول، آنژیوژنزو نشان دادن اثر ضدالتهابی در رده‌های سلولی سرطان روده شوند. کروستین همچنین می‌تواند باعث کاهش سطح استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در کلیه موش‌های دیابتی شده گردد (۱۸).

از محدویت‌های این مطالعه می‌توان به تغذیه حیوان توسط گاواژ با نیدل و سوراخ شدن کام حیوان اشاره نمود که امکان تلف شدن حیوان بیشتر و دسترسی به حیوان کمتر بود. همچنین به‌خاطر 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.

نتیجه‌گیری

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

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه بخشی از پایان‌نامه (شماره ۹۸-ع۲) خانم شیما 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 زیست‌شناسی دانشگاه ارومیه انجام گردید. بدین‌وسیله از آن معاونت محترم و کارکنان آن حوزه صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. 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.

2. 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

3. 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.

4. 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.

5. 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

6. Kianbakht S. [A systematic review on pharmacology of saffron and its active constituents]. J Med Plants. 2008; 4(28): 1-27. [Article in Persian]

7. 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

8. Mohajeri D, Mousavi G, Mesgari M, Doustar Y, Nouri HK. Subacut toxicity of crocus sativus L.(Saffron) stigma ethanolic extract in rats. Am J Pharmacol Toxicol. 2007; 2(4): 189-93.

9. 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

10. 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.

11. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. Indian J Med Res. 2009 Apr; 129(4): 357-67.

12. 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.

13. Akerman G, Amcoff P, Tjärnlund U, Fogelberg K, Torrissen 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.

14. Ray S, Sengupta A, Ray A. Effects of paraquat on anti-oxidant system in rats. Indian J Exp Biol. 2007 May; 45(5): 432-8.

15. Zain AMD. The evalution 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.

16. Ayedh A, Al-Qudsi F. Effect of saffron on liver development in mouse embryo. Life Sci J. 2013; 10(1): 1480-95.

17. Ochiai T, Soeda S. Crocin prevent yhe death of PC-12 cells though sphingo myelinaseceramide signaling by increasingglutathione synthesis. Neurochemistry International. 2004; 44(5): 321-30.

18. 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. doi: https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5

Downloaded from goums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 8th 2018

www.SID.ir

Archive of SID

61 / Journal of Gorgan University of Medical Sciences
2018 Summer / vol 20 / no 2

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]

[1]**M.Sc in Histology & Embryology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.**
[1]**Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.**

Downloaded from goums.ac.ir at 11:04 +0430 on Sunday July 8th 2018

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)

Cite this article as: Pedarpoor Vajargah Sh, Farokhi F. [Regeneration effect of *Saffron* on the liver damaged with paraquat in male mice]. J Gorgan Univ Med Sci. 2018 Summer; 20(2): 55-61. [Article in Persian]

www.SID.ir