Downloaded from journal.gums.ac.ir at 15:33 IRDT on Wednesday May 31st 2017

اثر زعفران(Crocus Sativus) بر آسیب پاراکوات در کلیه موش‌های سوری نر

دکتر فرخ فرخی(PhD)[1]- * شیما پدرپور واجارگاه (MSc)[2]

*نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

پست الکترونیک: Shima.Pedarpoor@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله:۹۵/۰٤/۲۹ تاریخ ارسال:۹۵/۷/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۲۸

چکیده

مقدمه: پاراکوات به عنوان علف‌کش گیاهی، انگیزاننده نیرومندی در تشکیل آنیون‌های سوپراکسید است. این رادیکال‌ها بسیار سمی بوده و می‌توانند سبب آسیب‌هایی در اندام‌ها شوند. با توجه به پیامدهای زیانبار رادیکال های آزاد حضور ترکیب‌های سودمند مانند زعفران به دلیل داشتن آثار آنتی اکسیدانی و از بین برنده رادیکال های آزاد، بایسته به نظر می‌رسد.

هدف: بررسی اثر آنتی اکسیدانی زعفران بر آسیب کلیه موش‌های سوری نر که با پاراکوات تیمار شده اند

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی۳۰ سر موش سوری نر به طور تصادفی به ٦ گروه ٥ تایی تقسیم شدند: گروه کنترل آب و غذای معمولی و ۱/٥ml روغن ذرت با گاواژ دریافت کردند. گروه دوم وسوم به ترتیب پاراکوات با دوز mg/kg ۲۰و ٤۰محلول در روغن ذرت ، گروه چهارم عصاره هیدرو الکلی زعفران با دوز mg/kg ۸۰، گروه پنجم وششم به ترتیب پاراکوات با دوز kg/mg ٤۰ و۲۰ به همراه دزmg/kg ۸۰ زعفران دریافت کردند. تیمار تمام گروه‌ها به صورت گاواژ بود. پس از ۳۰ روز تیمار و بیهوش کردن موش‌ها ، خون‌گیری از قلب برای مطالعه متغییرهای سرمی انجام شد. سپس، کلیه را از بدن جدا کرده، نیمی از بافت کلیه برای سنجش اکسایشی ونیم دیگربرای مطالعه بافتی به فرمالین انتقال یافت. آنالیز داده ها باآزمون یک طرفه ANOVA و آزمایش تعقیبی Tukeyانجام شد. اختلاف در حد P<۰/۰٥ معنی دار تلقی شد.

نتایج: تخریب لوله اپی تلیوم، ایجاد کانون التهاب، آتروفی گلومرولی، افزایش معنی دار اوره وکراتی‌نین وپراکسیداسیون لیپیدی در کلیه موش های تیمار شده با پاراکوات دیده شد. درحالی‌که در کلیه موش های تیمار شده با زعفران این شاخص ها بهبود یافته بود.

نتیجه‌گیری: مصرف زعفران در حد معمول می تواند آثار سوء ناشی از سموم علف کش مثل پاراکوات را کاهش دهد.

کلید واژه‌ها: پاراکوات/ زعفران / کلیه/ موش ها

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست و پنجم، شماره ۱۰۰، صفحات: ٥٦-٤٧

مقدمه

علف‌کش‌ها موادی هستند که آثار سوء زیادی برروی گونه‌ها و جمعیت‌های حیات وحش دارند. بسیاری از آلوده‌کننده‌های محیطی قادرند سیستم‌های درون‌ریز حیوانات را بر هم بزنند و بر تکوین و تولید مثل آن‌ها اثر بگذارند(۱). پاراکوات(گراماکسون) یک علف‌کش تماسی گیاهی است که در بسیاری از کشورها استفاده می‌شود. این سم از گروه بای‌پیریدی لیوم‌ها است که برای کنترل علف‌های هرز پهن برگ استفاده می‌شود. احتمال می‌دهند که پاراکوات یک محرک قوی در تشکیل آنیون‌های سوپراکسید باشد این رادیکال‌ها بسیار سمی بوده و به شدت با ماکرومولکول‌ها ترکیب می‌شوند و ممکن است باعث آسیب‌های جدی در اندام‌های مختلف و تخریب بافت‌های گیاهان سبز در اثر تماس و انتقال در طول گیاه شوند(۲و۳). پاراکوات قادر است از راه دهان یا تماس با پوست جذب بدن شده و در صورت تماس با مقادیر زیاد می‌تواند ظرف مدت سه ساعت و نیم 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 اندام‌هایی مانند سیستم اعصاب مرکزی، کبد، کلیه، چشم و سیستم ایمنی مشکلاتی ایجاد کند، بنابراین این ماده شیمیایی می‌تواند سلامت انسان، حیوانات و حتی موجودات آبزی را به خطر بیاندازد(٤). مکانیسم احتمالی سمیت پاراکوات در سیستم‌های بیولوژی

۱. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. دانشجو ارشد بافت شناسی جنین شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 15:33 IRDT on Wednesday May 31st 2017

بوسیله Bus و Gibson بررسی‌شده‌است. واکنش احیا اکسیژن منفرد(Single Oxygen Resuscitation) باعث تخلیه NADPH سلولی و تولید آنیون سوپراکسید و ترکیبات اصلی می‌شود. آنیون‌سوپراکسید به هیدروژن پراکسید و رادیکال‌های هیدروژنی ۱ و اکسیدان‌های به شدت قوی تبدیل شده که می‌تواند به پروتئین‌ها-پلی‌ساکاریدها و اسیدهای نوکلئیک آسیب برساند. رادیکال‌های هیدروکسیل باعث افزایش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسید از شده که این عمل نیز باعث افزایش مصرف گلوتاتیون می‌شود(۵). با توجه به عوارض‌سوء رادیکال‌های آزاد حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی ضروری به نظر می‌رسد. آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با کاهش سرعت اکسیداسیون، دوره‌ی اکسیداسیون کند را افزایش می‌دهند. این مواد ممکن است به‌طور طبیعی وجود داشته باشند مثل آنتوسیانین(Anthocyanin) در گلبرگ زعفران به صورت سنتزی به ماده غذایی اضافه شوند(٦ و ٧).

انسان‌ها از دیر باز به خواص درمانی گیاهان پی‌برده‌اند و بیماری خود را با آن درمان و سلامت خود را با آن تامین می‌نمودند. زعفران یکی از این گیاهان می‌باشد. زعفران و مواد موثره‌ی آن اثرات ضدتومور، آنتی‌اکسیدان و از بین برنده رادیکال‌های آزاد، تقویت‌کننده حافظه، ضد درد و التهاب، پایین آورنده‌ی فشار خون و چربی خون را دارد(۸). طعم تلخ زعفران ناشی از وجود ماده‌ای بنام پیکروکروسین است. این ماده بر اثر تجزیه حرارتی یا آنزیمی به آلدییدی بنام سافرانال تبدیل می‌شود. کروسین‌ها مسئول رنگ زعفران محسوب می‌شوند. کاروتنوییدهای دیگری مانند بتاکاروتن، لیکوپن و گزانتین و ویتامین‌ها به خصوص ریبوفلاوین و تیامین در زعفران یافت می‌شوند. کروسین، کروستین، سافرانال مواد موثره‌ی اصلی زعفران هستند که اثرات از بین برنده رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدانی داشته‌اند(۸). برخی از خواص زعفران به علت وجود کاروتنوییدهاست که اثرات محافظتی خود را توسط تعدیل پراکسیداسیون لیپید- آنتی‌اکسیدان‌ها و سیستم خنثی‌کنندگی سموم اعمال می‌نمایند. کاهش معنی‌دار در اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها، در بیماران با بیماری سرخرگ کرونر، پتانسیل زعفران را به عنوان یک آنتی‌اکسیدان نشان داده‌است(۹). با توجه به مکانیسم انتقال پیچیده که در لوله‌های کلیوی وجود دارد و ممکن است از این مکانیسم برای انتقال سموم استفاده شود. به دلیل عوارض مضر سموم بخصوص پاراکوات، که می‌تواند سبب ایجاد رادیکال آزاد و آسیب در لوله‌های کلیوی گردد، در این مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی زعفران بر روی آسیب ایجاد شده در کلیه‌ی موش‌های سوری نر که با پاراکوات تیمار شده‌اند، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی ۳۰ سر موش سوری نر در دامنه وزنی ٢٤-۳۰ گرم انتخاب شدند. موش‌ها از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات دانشکده علوم دانشگاه ارومیه 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 ۲۰ـ۲۵ درجه، رطوبت نسبی) نگهداری شدند. قبل از شروع تیمار موش‌ها به مدت ۷ روز به منظور سازگاری در شرایط محیط قرار گرفتند.

گروه‌بندی حیوانات: موش‌ها بعد از یک هفته انطباق با محیط مرکز نگهداری به طور تصادفی در ٦ گروه ۵ تایی تقسیم‌بندی شدند: حیوانات گروه کنترل ۳۰ روز با آب و غذای معمولی و ۱/۵ml روغن ذرت تیمار شدند. گروه دوم پاراکوات را با دز ۲۰mg/kg، و گروه سوم که پاراکوات را با دوز ٤۰mg/kg که در ۱/۵ml روغن ذرت حل شده بود، دریافت کردند. گروه چهارم عصاره ml ۱/۵ زعفران با دز۸۰mg/kg که در آب حل شده بود(۱۰)، گروه پنجم پاراکوات ٤۰ mg/kg را همراه با زعفران و گروه ششم با پاراکوات دز ۲۰ mg/kg و زعفران گرفتند. برای رقیق نمودن پاراکوات که یک علف‌کش روغنی بود،از روغن ذرت استفاده شد. تیمار به مدت ۳۰ روز و در ساعات مشخص، ۸ صبح هر روز و به صورت گاواژ دهانی، برای تمامی گروه‌ها انجام شد. بعد از پایان تیمار موش‌ها بوسیله کتامین- زایلازین به صورت تزریق داخل صفاقی بی‌هوش شدند.

بعد از بی‌هوش نمودن موش‌ها، شکم حیوانات باز شد، سریعاً خون‌گیری از قلب موش‌ها صورت گرفت. نمونه خون بلافاصله بعد از سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه،

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 15:33 IRDT on Wednesday May 31st 2017

سرم حاصل از خون تا زمان اندازه‌گیری اوره و کراتینین در فریز ۲۰- نگهداری شد.

نیمی از بافت کلیه در هر سمت در فویل آلومینیومی قرار داده برای سنجش مالون دی‌آلدئید(**MDA**) کاتالاز، فرپ(سنجش اکسایشی) به دمای ۸۰- انتقال داده شد.

سنجش میزان مالون دی‌آلدئید: درجه پرکسیداسیون لیپیدها بر مبنای میزان تشکیل مالون دی‌آلدئید تعیین می‌شود. MDA محصول نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب است و با تیوباربیوتوری اسید وارد واکنش می‌شود و تولید کمپلکس رنگی می‌نماید. اساس روش، اندازه‌گیری اسپکتوفتومتری رنگ ایجاد شده است. در این روش نمونه بافت کلیه وزن گردید و ۱۰ درصد وزن/حجم به آن بافر فسفات اضافه گردید و در هاون کوبیده شد. سپس هموژنای تهیه شده به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد ۱۵۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته و به لوله آزمایش منتقل گردید. سپس ۳۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰ درصد به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از محلول روئی به لوله‌ی آزمایش منتقل و با ۳۰۰ میکرولیتر از تیوباربیوتوریک اسید ۰/۶۷% در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۵ دقیقه انکوبه شد. ۵ دقیقه بعد از خنک شدن محلول، رنگ صورتی ناشی از واکنش مالون‌دی‌آلدئید با تیوباربیوتوریک اسید ظاهر و با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر در مقابل بلانک ارزیابی شد. میزان مالون‌دی‌آلدئید به کمک ضریب جذبی مالون دی‌آلدئید محاسبه و به صورت **nmol/gr tissue** بیان شد(۱۱).

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 بررسی می‌شود. در این روش نمونه بافت کلیه وزن گردید و ۱۰٪ 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 گردید(۱۱).

سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی 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. در این روش،جهت تهیه هموژنای بافت، ۱۰٪ وزن/حجم بافت کلیه به آن Kcl اضافه گردید و در هاون کوبیده شد. سپس هموژنای تهیه شده با دور ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. از محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به لوله آزمایش منتقل گردید و ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP به آن اضافه شد ودر بن‌ماری ۳۷ درجه به مدت ۷-۱۰دقیقه انکوبه گردید. جذب کمپلکس آبی رنگ در ۵۹۳ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر خوانده شد. مقادیر بر حسبm mol /lit gr tissue بیان گردید(۱۱).

همچنین، نیمی دیگر از بافت کلیه در هر سمت برای مطالعات بافتی جدا شده به مدت یک هفته و در دمای اتاق به فرمالین ۱۰٪ انتقال داده شد. بعد از تثبیت بافت و آبگیری بوسیله الکل و شفاف سازی در گزیلل و تهیه بلوک‌های پارافینی مقاطعی به قطر ۶ میکرون تهیه و بعد از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین-ائوزین با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

طرز تهیه عصاره هیدروالکلی زعفران: برای تهیه عصاره هیدروالکلی زعفران۳ گرم زعفران خریداری شده از بازار ارومیه در تاریخ ۳ آبان ۱۳۹۴ را با آسیاب دستی پودر کرده و 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 را با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف نموده و مایع حاصل در پلیت‌هایی که قبلا بوسیله الکل ضدعفونی شده‌بود، انتقال داده شد. سپس پلیت را به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا الکل آن تبخیر شود. سپس پودر حاصله وزن و تا زمان استفاده داخل فویل آلومینیومی و در یخچال نگهداری شد. قابل ذکر

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 15:33 IRDT on Wednesday May 31st 2017

است که عصاره در محل آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه تهیه گردید.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: آنالیز آماری حاصل از این مطالعه، نسخه ۲۲ نرم‌افزار SPSS و آزمون یک طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی Tukeyصورت گرفت. اختلاف در حد P<۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

در بررسی آنزیم کاتالاز، میانگین سطح کاتالاز در گروه کنترل(۱۶/۱۷±۰/۵۵µ mol/gr tissue) بدست آمد. در تمامی گروه‌های آزمایش مقدار کاتالاز نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌دار کمتر بود. مقدار کاتالاز کلیه در موش‌های دریافت‌کننده پاراکوات کمترین و در موش‌های تیمار شده با زعفران افزایش یافته‌بود(جدول۱).

نتایج بدست آمده از آزمون فرپ(FRAP) نشان‌داد که، میانگین سطح فرپ در گروه کنترل(mmol/lit/gr tissue ۱۵/۹۰±۲/۱۸) بود. مقدار فرپ در بافت کلیه در تمام گروه‌های آزمایش کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل نشان داد. مقدار فرپ بافت کلیه در موش‌های تیمار شده با پاراکوات کمترین و در موش‌های تیمارشده با زعفران بیشترین مقدار و در موش‌های دریافت کننده همزمان زعفران و پاراکوات تا حدودی افزایش یافته‌بود(جدول۱).

در سنجش میزان مالون‌دی‌آلدهید(MDA)، سطح MDA در گروه کنترل(۱/۵۹±۰/۲۱nmol/gr tissue) بدست آمد. نتایج نشان داد که مقدار MDA در موش‌های تیمار شده با پاراکوات، با دوزهای ۴۰ mg/kg و ۲۰در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته در حالی که در موش‌هایی که، تواما زعفران وپاراکوات را دریافت نموده بودند، مقدار MDA در مقایسه با موش‌های گروه دوم و سوم، کاهش معنی‌دار نشان‌داد، هر چند که در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان‌می‌داد. مقدار MDA در موش‌هایی که فقط زعفران دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه کنترل، به طور معنی‌دار کاهش یافته بود(جدول۱).

نتایج بدست آمده از سنجش اوره کلیه نشان داد که سطح اوره در گروه کنترل(۱۳۱/۶۸ ±۶/۲۵mg/dl) بدست آمد. نتایج نشان داد که مقدار اوره در تمامی گروه‌های آزمایش در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار یافته بود و بیشترین افزایش مربوط به گروه دریافت‌کننده‌ی پاراکوات با دز۴۰ بود(جدول۱).

در بررسی کراتینین کلیه مشاهده شد که سطح کراتینین در گروه کنترل، (۰/۹۷±۰/۱۷mg/dl) بوده است. مقدار کراتینین در تمامی گروه‌های آزمایش در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار یافته بود و بیشترین افزایش مربوط به گروه دریافت کننده‌ی پاراکوات با دز۴۰ می‌باشد(جدول ۱).

جدول ۱. جدول تغییرات متغیرهای سرمی و سنجش اکسایشی بافت کلیه درگروههای آزمایش

گروه آزمایش	کاتالاز (µ mol /gr tissue)	فرپ (mmol /lit/gr)	مالون دی آلدهید (nmol/gr tissue)	اوره(mg/dl)	کراتینین(mg/dl)
کنترل	۱۶/۱۷±۰/۵۵	۱۵/۹۰±۲/۱۸	۱/۵۹±۰/۲۱	۱۳۱/۶۸±۶/۲۵	۰/۹۷±۰/۱۷
پاراکوات۴۰mg	*##۰/۵۰±۷/۰۷	*##۰/۱۸±۳/۷۰	*##۰/۷۱±۶/۱۳	*###۶۶/۰۴±۴۵۳/۰۶	*##۱/۸۲±۱۵/۹۷
پاراکوات۲۰mg	*##۴/۳۴±۶/۸۲	*#۰/۲۹±۴/۵۰	*#۰/۲۹±۴/۵۸	*###۹/۸۲±۲۴۱/۳۰	*##۱/۸۲±۱۰/۹۷
زعفران وپاراکوات۲۰mg	#*۱۰/۱۲±۰/۶۸	#*۷/۷۵±۰/۵۸	#*۳/۹۷±۰/۳۶	#*۱۹۰/۵۵±۹/۶۴	#*۳/۲۵±۱/۲۵
زعفران وپاراکوات۴۰mg	#*۸/۳۹±۰/۱۴	#*۵/۰۲±۰/۲۵	۰/۷۹±۰/۳۹	#*۲۳۲/۰۵±۱۶/۱۴	#*۶/۲۵±۲/۲۱
زعفران۸۰mg	*۱۲/۶۷±۰/۸۴	*۱۲/۸۲±۰/۶۹	۱/۹۶±۰/۱۶	*۱۴۶/۵۴±۱۹/۲۲	۱/۳۷±۰/۴۷

تمامی داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار بیان شده‌اند

*معنی دار است >p۰/۰۵ درمقایسه با گروه کنترل اختلاف در حد

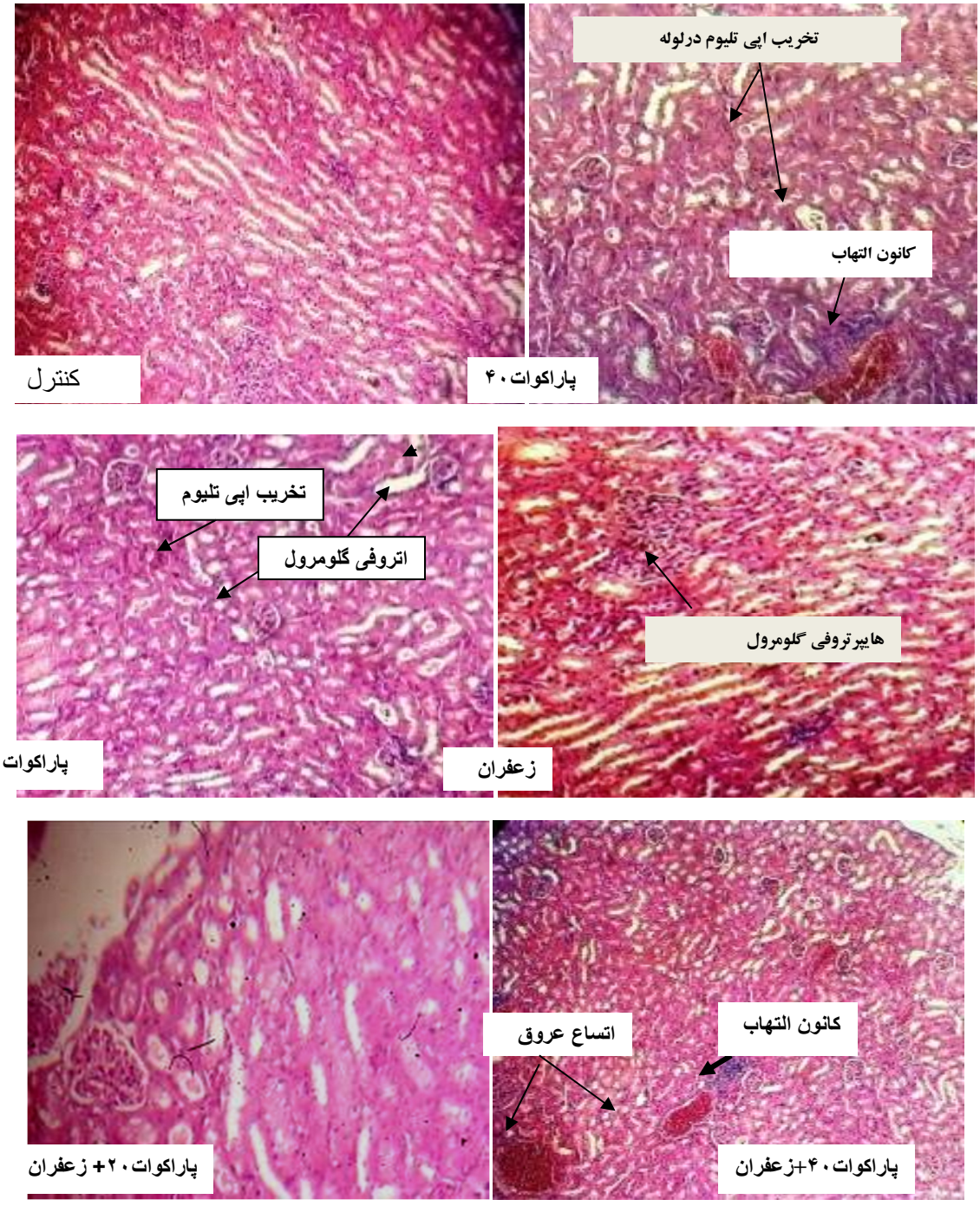
##معنی دار است >p۰/۰۵ درمقایسه با گروه تیمار شده با زعفران و پاراکوات اختلاف در حد

درمقایسه با گروه تیمار شده با زعفران اختلاف در حد p<۰۵ معنی دار است

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 15:33 IRDT on Wednesday May 31st 2017

نتایج مطالعات بافتی کلیه، بر پایه‌ی بررسی مشاهده توسط میکرسکوپ نوری در بافت کلیه گروه کنترل، گلومرول طبیعی و هم چنین لوله پیچیده دور و نزدیک طبیعی بودند. در تمام مقاطع بافت کلیه موش‌های تیمار شده با پاراکوات ۴۰، کانون التهاب و تخریب اپیتلیوم در لوله‌های کلیه نسبت به گروه کنترل دیده شد. در تمام مقاطع بافت کلیه موش‌های تیمار شده با پاراکوات ۲۰، افزایش تخریب اپی‌تلیوم و آتروفی گلومرولی نسبت به گروه کنترل دیده شد. مقطع بافت کلیه در موش‌های دریافت‌کننده پاراکوات و زعفرات توام، ساختار گلومرول طبیعی شده و کاهش کانون التهاب دیده شد هر چندکه تخریب اپی‌تلیوم در لوله‌های کلیوی دیده می‌شود. تمام مقاطع بافتی در موش‌های تیمار شده با زعفران، افزایش هیپرتروفی گلومرولی نسبت به گروه کنترل دیده شده ولی ساختار لوله‌های کلیوی همه سالم و طبیعی‌اند(تصاویر شماره ۱ و ۲).

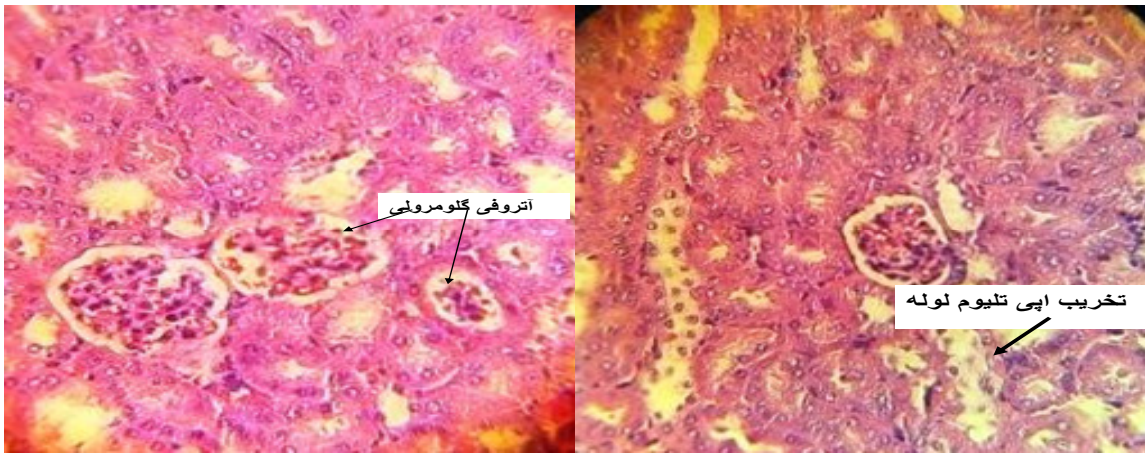
تصویر شماره ۱:مقطع عرضی از بافت کلیه با درشت‌نمایی ۱۰۰ × و رنگ‌آمیزی H&E



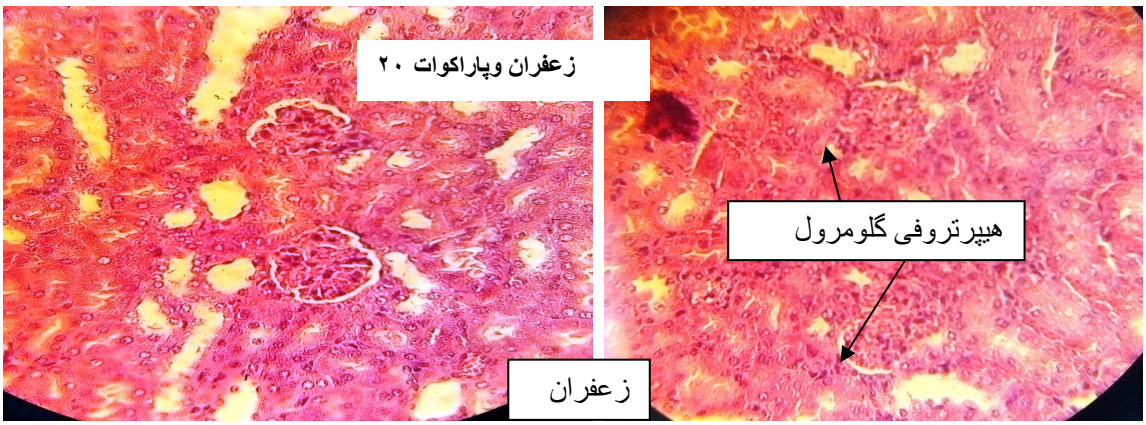
Downloaded from journal.gums.ac.ir at 15:33 IRDT on Wednesday May 31st 2017

در این تصاویر حضور سلول‌های لنفاوی وکانون التهاب، تخریب اپی‌تلیوم لوله‌های کلیوی در موش‌های تیمار شده با پاراکوات ٤٠mg ایجاد شده ودر مقاطع بافت کلیه موش‌های تیمار شده با پاراکوات ٢٠mg تخریب اپی‌تلیوم و آتروفی گلومرول دیده می‌شود. تیمار موش‌ها با زعفران بهبودی نسبی در موش‌های تیمار شده با پاراکوات٢٠mgایجاد شده و اندازه گلومرول‌ها طبیعی شده ، ولی همچنان تخریب نسبی در اپی‌تلیوم دیده می‌شد. تیمار موش‌ها با زعفران در موش‌های تیمار شده با پاراکوات ٤٠mg کانون التهاب و اتساع عروق دیده شد. در مقاطع بافت کلیه موش‌های تیمار شده با زعفران ٨٠ mg اتساع گلومرولی دیده شد و سایر ساختارها مشابه گروه کنترل بود.

تصویر شماره ٢:مقطع عرضی از بافت کلیه در گروه‌های آزمایش با درشت‌نمایی٤٠٠× و رنگ‌آمیزی H&E



مقطع عرضی از بافت کلیه در گروه تیمار شده بازعفران وپاراکوات ٢٠mg



مقطع عرضی از بافت کلیه در گروه تیمار شده با پاراکوات 40 mgبادرشنمایی400

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 15:33 IRDT on Wednesday May 31st 2017

بحث و نتیجه‌گیری

به‌طورکلی این پژوهش نشان داد که، پاراکوات موجب افزایش اوره و کراتینین و آتروفی گلومرول و تخریب اپی‌تلیوم گردید. پاراکوات موجب ایجاد کانون التهاب شده. که طبق مطالعات صورت گرفته این التهاب بیانگر فعال شدن مکانیسم دفاعی بدن علیه تخریب می‌باشد(۱۲). مطالعات Akerman و همکاران(۲۰۰۳)ثابت می‌کند که تخلیه بدن از NADPH باعث افزایش تولید آنیون سوپر اکساید و ترکیبات مشابه مانند پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل شده که این مواد بویژه رادیکال های هیدروکسیل موجب آسیب بافتی خواهند شد(۱۳) در این مطالعه هم آسیب بافتی ایجاد شده توسط پاراکوات از جمله تخریب اپی‌تلیوم و لوله دیده شد. در مکانیسم‌های سمیت پاراکوات تولید رادیکال آزاد اکسیژن درگیر است که آن هم منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود و 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، می‌شود(۱٤). در این تحقیق هم گروه‌های دریافت‌کننده پاراکوات مقدار MDA نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. مطالعه بر روی ماهی در سال ۱۹۸۹ نشان داد که، کلیه، کبد، مغز و آبشش ،ارگان‌های اصلی و قابل توجه هستند که تحت تأثیر انواع سموم قرار می‌گیرند. سموم روی لوله‌های کلیوی اثر دارند. چون در این بخش مکانیسم انتقال پیچیده وجود دارد که ممکن است برای انتقال سموم استفاده گردد و می‌تواند بوسیله سموم آسیب ببیند(۱۵). بسیاری از مواد شیمیایی یک عمل نفروتوکسی مستقیم روی لوله‌های پروگزیمال حلقوی دارند. حضور نکروز ممکن است مربوط به تخلیه ATP باشد که در نهایت منجر به مرگ سلول‌ها می‌شود(۱۵). نفروپاتی عملکرد فیزیولوژی را کاهش می‌دهد و در ساختار کلیه تغییر ایجاد می‌کند در نتیجه میزان اوره و کراتینین افزایش می‌یابد(۱٦). در این تحقیق افزایش میزان اوره و کراتینین نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. انسان‌ها از دیرباز به خواص درمانی گیاهان پی برد و بیماری خود را با آن درمان و سلامت خود را تامین می‌نمودند. زعفران یکی از این گیاهان است. 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 که موادی فعال و ویرانگر هستند، می‌گیرند و آنها را خنثی می‌کنند لذا تأمین ذخایر آنتی‌اکسیدان، به‌منظور کاهش آثار تنش اکسایشی امری مهم تلقی می‌شود(۱۷). ارزش کلاله خشک شده زعفران به علت وجود سه متابولیت ثانویه اصلی بنام کروسین-پیکروکروسین و سافرانال است. مطالعات نشان می‌دهد که زعفران بواسطه ترکیبات کاروتنوئیدی خود باعث تنظیم فعالیت پراکسیدازی لیپیدها-آنتی‌اکسیدان‌ها و سم‌زدایی می‌گردد(۹). مطالعات نشان می‌دهد که کروسین های زعفران با افزایش غیرمستقیم بیان mRNA انزیم گاماگلوتامیل سیستئینیل‌سنتتاز(GCG-Y) میزان گلوتاتیون 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(۱۸) به همین دلیل گروه‌های دریافت‌کننده هم‌زمان پاراکوات و زعفران مقدار، FRAP و کاتالاز نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده پاراکوات افزایش و مقدار MDA کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهند. که احتمالا عصاره آبی زعفران به عنوان عامل آنتی‌اکسیدان عمل کرده و از تولید رادیکال آزاد اکسیژن جلوگیری می‌کند. همچنین مقدار اوره و کراتینین هم در گروه‌های دریافت کننده زعفران نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده پاراکوات کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهند. همچنین در این تحقیق مشاهده شد که زعفران به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود سبب بهبود آسیب بافتی ناشی از مصرف پاراکوات گردید. تحقیقات مشخص کرده که کروستین موجود در زعفران به علت اثر آنتی‌اکسیدانی سلول‌های کبدی موش صحرایی را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت کرده‌است(۱۹). کروستین یک فلاونوئیداست که در انواع گیاهان یافت می‌شود و پتانسیل خوبی در جلوگیری از فیبروز کلیه دارد. کروستین طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی شامل: آنتی‌اکسیدان، ضدالتهاب و ضدتوموری دارد. با توجه به اثر مفید کروستین،

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 15:33 IRDT on Wednesday May 31st 2017

در حفاظت در برابر فیبروز کبد، ریه، پوست به طور قابل توجه ممکن است که کروستین موجب منع فعالیت فیبروبلاستی و همچنین فیبروز کلیه در موش‌های مبتلا به نفروپاتی انسدادی شود. مطالعات پیشین نشان‌می‌دهد که کروستین ممکن است مانع فعالیت فیبروبلاست‌های کشت شده و همچنین بهبود فیبروز اندام در کبد، ریه و پوست شود.بعضی از پلی فنول‌ها مانند کروستین می‌تواند مانع رشد سلول،آنژیوژنزو نشان دادن اثر ضد التهابی در رده‌های سلولی سرطان روده شوند. کروستین همچنین می‌تواند باعث کاهش سطح استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در کلیه موش‌هایی که دیابتی شده‌اند شود. علاوه بر این کروستین می‌تواند سبب بهبود هایپراوریسمی و تخریب عملکرد کلیه در موش‌هایی که تحت فشار التهاب ایجاد شده بوسیله استرپتوز هستند، گردد(۲۰). درتحقیق حاضر کاهش اوره و کراتینین در موش‌های تیمار شده با زعفران و همچنین بهبود آسیب‌های بافتی ناشی از پاراکوات مشاهده شد. سافرانال که یکی از اجزای اصلی زعفران است. دارای اثرات محافظتی بر روی پراکسیداسیون لیپیدها است(۲۱). به همین علت در این پژوهش میزان پراکسیداسیون لیپیدها کاهش یافته است. از جمله آثار زعفران بر تغییرات پراکسیداسیون لیپید و وضعیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که، تجویز زعفران پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش و همزمان سطح آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی هم چون سوپراکسید دیسموتاز کاتالاز و نیز آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی همچون گلوتاتیون احیا شده کبدی را افزایش می‌دهد(۲۲). در این تحقیق هم افزایش کاتاز و FRAP در موش‌های تیمار شده با زعفران مشاهده شد. در تحقیق، هم در موش‌های تیمار شده با زعفران اتساع گلومرول دیده شد که احتمالا به واسطه افزایش جریان خون در گلومرول است. به طور کلی این مطالعه نشان می‌دهد که پاراکوات به عنوان یک سم سبب آسیب و همچنین تخریب بافتی کلیه شده و زعفران به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی سبب بهبود آسیب‌های ناشی از سم پاراکوات می‌شود.

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

1. Cooper RL, Kavlock RJ. Endocrine disruptorsand reproductive development aweight of evidence over view .Journal of Endocrinolog 1997; 152:159-556.
2. Grabenesee B, Borchard F,Muertz R,Veltman G.Paraquat poisoning .Disch Med Wschr 2003; 96:498-506.
Pasi A.(Ed).The Toxicity of Paraquat. Bern ;Diquat , 3. Morfamquat Hans Huber, 1978.
4. Parvez S, Raisuddin S.Effect of Paraquat on the Freshwater fish Channa punctata(Bloch):Non-Enzymatic Antioxidant as Biomarkers of Exposure.Archives of Environmental Contamination and Toxicology2006 ;50:392-397.
5.BusJS,AustSD,GibsonJE.Lipidperoxidation:apossible mechanismforparaquat,toxicity.Res.Communic.Chem Pathol Pharmacol 1975;11,31-38.
6. Loliger J, Lambelet P, Aeschbach R, Prior E M. Natural antioxidants: from radicalmechanismsfoodstabilization,inFoodLipidsandHealth.Min,D.B.(Eds)Marcel Dekker,Inc., pharmacology and Toxicology New York1996; 315-344.
7. PokornyJ. Stabilization of fats by phenolic antioxidants. Can Inst Food Sci Technol 1971; 4: 68-74.
8. Kiyanbakht S. Systematic pharmacological review of saffron (Crocus sativus L.) and itcompounds. Medicinal plants 2008; 7(28): 1-27 .[Text in Persian]
9. Sravani PV,Kishorebabu N,Gopal KVT,Raghu RRG.Determination of oxidative stress in vitiligo by ,aesuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and non –vitiliginous skin.Indian J Dermatol Venereal Leprol 2009;75(3). [Text in Persian]
10. Mohajeri D, Mousavi G, Mesgari M.Subacut toxicity of crocus sativus L.(Saffron) stigma ethanolic extract in rats. American Journal of pharmacology and Toxicology 2007; 2(4), 189-193
11. Hosseinzadeh H, Sadeghnia RH. Safranal ,aconstituent of crocus sativus ,attenuated cerebral ischemia induced oxidative damage in rat hippocampus. Pharm pharmaceut2005; 8(3):394-399.
12. Okolie N P, Osagie A U. Liver and kidneylesion and associated enzyme changes induced inrabbits by chronic cyanide exposure. Food and Chemical Toxicology1999; 37(7): 745-750.
13. AkermanGA,Amcoff P,Tgarnlund U,Fogelberg K,Torrissen O, Balk L. Paraquat and menadion exposure of rain bow trout(Oncorhynchus mykiss)-Studies of effects on the pentose-phosphate shunt and thiamine levels in liver andkidney.Chemico-Biological Interactions2003;142:269-283..
14. Sanhita R,Amab S,Amitabha R.Effect of paraquat on anti-oxidant system in rats.Indian Journal of Exprimantal Biology2007;432-438.

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 15:33 IRDT on Wednesday May 31st 2017

15. Tisher C C, Brenner B M.Renal pathologywith clinical and functional correlation. V1. Philadelphia; J.B Lippincott , 1989: 149-154.
16. Rosolowsky ET, Niewczas MA, Ficociello LH, Perkins BA, Warram JH, et al. Between hyperfiltration and impairment: demystifying early renal functional changes in diabetic nephropathy. Diabetes Res Clin Pract2008; 13: 46-53.
17. Zurovsky Y, Haber C.Antioxidants attenuateendotoxingeneration induced acute renal failure inrats. Scand J Urol Nephrol 1995; 29: 147-154.
18. Takashi O, Shinji S,etal.Crocin prevent yhe death of PC-12 cells though sphingo myelinaseceramide signaling by increasingglutathione synthesis.Neurochemistry International 2004; 44:321-330.
19. Wang CJ,Shiow SJ ,Lin JK.Effects of crocetine on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B1 in rats.Carcinogenesis1991;12(3):459-62.
20. Jiafa R, Jianzhong L, Xin L, Ye , Yuan G, Junwei Y, Weichun H &Chunsun D. Quercetin Inhibits Fibroblast Activation and Kidney Fibrosis Involving the Suppression of Mammalian Target of Rapamycin and β-catenin Signaling chemico-Biological Interactions. Neurochemistry International. 2016; 18(6):614.
21. Fadzilah A, Abd M, Roji M, et al. Impact of saffron as an anti-cancer and anti-tumor herb.
Afr J Pharm Pharmacol 2010; 4(11): 834-840.
22. Premkumar K, Abraham SK, Santhiya ST, Ramesh A. Protective effects of saffron (Crocussativus Linn.) on genotoxins-induced oxidative stress in Swiss albino mice. Phytother Res 2003; 17(6):614.

The Effect of Saffron on Renal Dysfunction in Male Mice Treated with Paraquat

Farokhi F (Phd)[1], * Pedarpoor Vajargah Sh (Msc)[2]

***Corresponding Address:** Faculty of Science, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Email: Shima.Pedarpoor@yahoo.com

Received: 19/Jul/2016 Revised: 8/Oct/2016 Accepted: 19/Oct/2016

Downloaded from journal.gums.ac.ir at 15:33 IRDT on Wednesday May 31st 2017

Abstract

Introduction: Paraquat is a common agricultural herbicide that is a strong stimulus in superoxide anions foundation. This radical is very toxic and may cause serious damages to different organs. Given the adverse effects of the free radicals, the anti oxidant compounds seem necessary. Anthocyanin in Saffron is a natural anti oxidant with active anti-tumor effects, antioxidants and removing free radicals, anti-pain and inflammation, and lowering blood pressure.

Objective: The aim of this study was to evaluate the antioxidant effect of saffron on changes in kidney tissues in mice that were treated with paraquat.

Materials and Methods: : 30 male mice were assigned into 6 groups.group1 received normal food,water and corn oil. Two groups of mice were treated at a dose of 40,20mg/kg paraquat.one of these groups received Saffron at a dose of 80mg/kg.Two groups of mice were treated with paraquat and Saffron orally per day. At the end of 30 days, the mice were anesthetized and blood samples were prepared for measurement of serum parameters and kidneys were dissected out for measurment of MDA concentration and half of kidney was transferred into formalin for histological study. All data were analyzed by SPSS software.P value less than 0.05 was considered significant.

Results: Kidney sections showed acute tubular necrosis and atrophy of glomerular capillaries in the mice treated with paraquat .Moreover, the rate of serum creatinine, urea and MDA concentration significantly increased in mice treated with Paraquat. While in kidney tissues of the mice treated with saffron these indicators were improved.

Conclusion: The results suggest that saffron treats renal dysfunction in rats treated with paraquat.

Conflict of interest: None declared.

Key words: Crocus \ Kidney\ Mice \ paraquat

Please cite this article as Farokhi F., Pedarpoor Vajargah Sh., The effect of Saffron on renal dysfunction in male mice that were treated with paraquat. J of Guilan Univ of Med Sci 2016; 25(100):47-56. [Text in Persian]

1. Associated professor, Faculty of Science, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
2. Master of scienc student, Faculty of Science, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran