Original Article

Assessment of Crocin Toxicity on the Rat Liver

Fatemeh Taheri[1], S. Zahra Bathaie[2*], Mahboobe Ashrafi[3], Elham Ghasemi[4]

1- M.Sc. Student, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Associated Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
4- M.Sc., Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: bathai_z@modares.ac.ir

Received: 09/June/2014, Accepted: 16/Jul/2014

Abstract

Objective: Crocin, the carotenoid isolated from saffron, has numerous medicinal properties which include anticancer and antioxidant activities. Some antioxidants, such as carotenoids, can act as pro-oxidants at higher dosages and therefore induce tissue damage. In this situation antioxidant defense systems in the liver activate to prevent tissue damage. This study investigates the possible toxic effects of crocin on the liver of normal rats.

Methods: Normal rats were randomly divided into four groups. Group 1 was treated with normal saline as the control and groups 2 to 4 were treated different doses of 50, 100 and 200 mg/kg crocin intraperitoneally once a week for four weeks. Animals were killed one week after the last injection. Serum profile of the rats that included ALT, AST, ALP, urea, uric acid and creatinine, as well as the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPx), GSH content, and lipid and protein oxidation by measurement of MDA and protein carbonyl levels were assessed in the liver. In addition, we conducted histopathological examinations of the liver specimens.

Results: We studied different crocin concentrations that have been used to treat various diseases. There were no significant changes in serum parameters, GSH, MDA, protein carbonyls and activities of CAT and SOD at the different crocin concentrations. Histopathological examination did not show any changes in the liver. Only the higher dose (200 mg/kg) decreased GPx activity which might be reversible over the long-term.

Conclusion: Crocin, at the studied doses showed no toxic effects on the rat liver.

Keywords: Crocin, Saffron, Hepatic toxicity, Antioxidant defense system, Pro-oxidant

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 17, No 3, Autumn 2014, Pages: 67-79

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

مقاله اصیل

بررسی آثار سمیت کبدی کروسین در رت

فاطمه طاهری[1]، سیده زهرا بطحائی[2*]، محبوبه اشرافی[3]، الهام قاسمی[4]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۴- کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی
Email: bathai_z@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۳/۰۳/۱۹ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۴/۲۵

چکیده

هدف: کروسین کاروتنویید استخراج شده از زعفران است که دارای خواص درمانی بسیاری از جمله آثار آنتی‌اکسیدانی است. ترکیبات آنتی‌اکسیدان از جمله کاروتنوییدها ممکن است در دزهای بالا به‌عنوان پیش‌اکسیدان عمل کند و باعث تخریب بافت‌ها شود که در این شرایط مهم‌ترین سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی در کبد وارد عمل می‌شود تا از آسیب بافت‌ها ممانعت به عمل آورد. در این مطالعه آثار سمی احتمالی کروسین بر کبد رت طبیعی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: رت‌های طبیعی به‌طور تصادفی به ٤ گروه تقسیم شدند. به گروه ۱ (کنترل)، نرمال سالین و به گروه‌های ۲-٤ به‌ترتیب کروسین با دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هفته‌ای یک بار به‌مدت ٤ هفته به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. رت‌ها یک هفته بعد از آخرین تزریق کشته شدند. پارامترهای بیوشیمیایی آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز، اوره، اسیداوریک و کراتینین در سرم و میزان گلوتاتیون احیا، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و میزان اکسید شدن پروتئین‌ها و لیپیدها با اندازه‌گیری میزان گروه‌های کربونیل و مالون‌دی‌آلدیید در کبد ارزیابی شد. نمونه‌های کبد از نظر هیستوپاتولوژی نیز بررسی شد.

نتایج: کروسین با دزهای مختلف مورد استفاده در درمان بیماری‌ها بررسی شد. هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در پارامترهای بیوشیمیایی سرم، گلوتاتیون احیا، مالون‌دی‌آلدیید، گروه‌های کربونیل پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در بافت کبد ایجاد نشد. همچنین هیچ تغییر بافتی در کبد مشاهده نشد. تنها دز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث اندکی کاهش در فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز شد که شاید در درازمدت جبران شود.

نتیجه‌گیری: کروسین در دزهای مورد استفاده هیچ اثر سمی بر کبد رت نداشت.

کلیدواژگان: کروسین، زعفران، سمیت کبدی، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، پیش‌اکسیدان

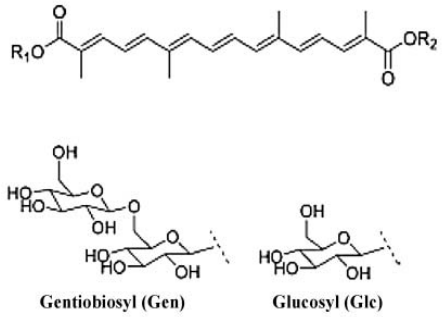
مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، صفحات: ۶۷-۷۹

مقدمه

کروسین‌ها (Crocin) که در حدود ۳/۵ درصد وزن کلاله خشک زعفران را تشکیل می‌دهد، مهم‌ترین عامل ایجاد کننده رنگ زعفران بوده و جزء معدود کاروتنوییدهای محلول در آب موجود در طبیعت است (شکل ۱). مطالعات متعدد نشان داده‌است که کروسین‌های زعفران دارای آثار دارویی گوناگونی بوده و برای درمان‌های بالینی قابل استفاده است. از جمله

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

خـواص کروسـین‌هـا مـی‌تـوان بـه آثـار ضـد آتروژنـی (Antiathergenic) و ضد لختـه، محافظـت کننـدگی سیسـتم عصبی و نورون‌ها، بهبود رفتارهای یادگیری و حافظـه، کـاهش لیپیدهای سرم، بهبود کارکرد کلیه، بهبود جریان خون در شبکیه و عملکرد چشـم، ضـد التهـاب، آنتـی‌اکسـیدان، ضدسـرطان و ضدتومور اشاره کرد که به‌طور مبسوط در یک مقاله مروری بـه آن‌ها اشاره شده است [۱]. کروسـین بـه دلیـل سـاختمان ویـژه کاروتنوییـدی خـود، رادیکـال‌هـای آزاد را بـه دام انداختـه و بنابراین یک آنتی‌اکسیدان بـالقوه بـه‌شـمار مـی‌رود و براسـاس همین ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن آزمونی به نام CBA (Crocin Bleaching Assay) برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتـی‌اکسـیدانی طراحی شده است [۲].



Name	R group
crocin-1 or α-crocin	digentiobioside crocetin
crocin-2 or tricrocin	gentioglucoside crocetin
crocin-3	gentiobioside crocetin
crocin-4	glucoside crocetin
crocin-5 or dicrocin	diglucoside crocetin
crocetin	H

شکل ۱ ساختار انواع کروسین [۱]

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاروتنوییدها تحت شـرایطی ممکـن است به سمت فعالیت پیش‌اکسیدانی تغییر یابد به ایـن ترتیـب کـه کاروتنوییـدها ممکـن اسـت تعـادل پـیش‌اکسـیدان- آنتـی اکسیدان را به سمت فعالیت اکسیدانی پیش ببـرد و بـا کـاهش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، منجر به آسیب اکسـیداتیو بافـت‌هـا شود. فعالیت احتمالی پیش‌اکسـیدانی کاروتنوییـدها اولـین بـار توسط بارتون و اینگولد (Burton & Ingold) مطرح شـد، بـه این صورت که با افزایش فشار اکسیژن یا غلظـت کاروتنوییـد، یـک کاروتنوییـد ممکـن اسـت فعالیـت آنتـی‌اکسـیدانی یـا پیش‌اکسیدانی داشته باشد [۳].

سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در حالت طبیعی دائماً در تعـادل با سرعت تولید رادیکال‌های فعـال اسـت تـا بتوانـد هموسـتاز (Homestasis) را در بـدن برقـرار کنـد. تـنش اکسـیداتیو (Oxidative Stress) حاصل به هم خوردن تعادل بین ایـن دو عامل است که در اثر افزایش مواجهه با مواد اکسیدان یا کـاهش حفاظت در برابر آن‌ها ایجاد می‌شود و می‌تواند منجر بـه تغییـر ساختار مولکول‌های مهم زیستی نظیر چربی‌هـا، پـروتئین‌هـا و اسیدهای نوکلئیک شود. تنش اکسیداتیو تغییـرات زیـادی را در ساختار پـروتئین‌هـا ایجـاد مـی‌کنـد؛ از جملـه شکسـته شـدن پیوندهای پپتیدی، ایجاد اتصالات عرضی جدید در یـک رشـته پروتئینی یـا بـین رشـته‌هـای پلـی‌پپتیـدی مختلـف و تشـکیل مجموعه‌های پروتئینی بـا وزن مولکـولی بـالا، تغییـر در میـزان گروه‌های تیول پـروتئین‌هـا و تشـکیل گـروه‌هـای کربونیـل در زنجیر جانبی آمینواسـیدها بـه‌ویـژه در آمینواسـیدهای پـرولین، لیزین، آرژنین و ترئونین [٤]. در حال حاضر اندازه‌گیری میـزان گروه‌های کربونیل به‌عنوان یک شاخص اساسـی بـرای بررسـی میزان اکسیدشدن پروتئین‌ها به‌کار می‌رود. ارجحیت اندازه‌گیری گروه‌های کربونیل نسبت به سـایر روش‌هـا بـه‌منظـور بررسـی اکسید شدن پروتئین‌ها، به علت تشکیل گروه‌هـای کربونیـل در مراحـل اولیـه اکسـید شـدن و پایـداری نسـبی آن‌هاسـت [۵]. مهم‌ترین محصولات ایجاد شده در اثر پراکسید شدن چربـی‌هـا عبارتنـد از لیپیـد هیدروپراکسـیدها، محصـولات فلورسـانس، آلکان‌های فرار و دی‌ان‌های کونژوگه (Conjugated Dienes) [٦]. لیپیـد هیدروپراکسـیدها کـه اغلـب در اثـر اکسـید شـدن اسـیدهای چـرب غیراشـباع موجـود در فسـفولیپیدها و استرکلسترول تشکیل می‌شود، ناپایدار اسـت و بـه محصـولات ثانویه‌ای نظیر مالون‌دی‌آلدییـد (Malondialdehyde: MDA) تبدیل می‌شود. مالون‌دی‌آلدیید یک دی‌آلدیید سه کربنه و یکـی از محصولات مهم و عمده ناشی از پراکسید شـدن لیپیدهاسـت که اغلب برای بررسی سـنجش میـزان پراکسـید شـدن لیپیـدی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

استفاده می‌شود. روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری این ترکیب وجود دارد؛ یکی از روش‌های متداول، واکنش آن با تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituric acid) است که با تشکیل کمپلکس مالون‌دی‌آلدیید- تیوباربیتوریک اسید از طریق طیف‌سنجی اندازه‌گیری می‌شود [۷].

کبد از لحاظ آناتومی (Anatomic) در جایی قرار گرفته است که بین محل جذب مواد از روده و گردش خون سیستمی است و نیز از لحاظ فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دارای انواع متعددی از آنزیم‌های متابولیزه کننده است؛ در نتیجه کبد به‌عنوان مهم‌ترین اندام در متابولیسم و حذف مواد خارجی عمل می‌کند [۸]. مطالعاتی که در جوندگان انجام شده نشان داده است که کروسین دریافت شده به‌صورت خوراکی قبل از جذب یا در حین جذب در روده به کروستین (Crocetin) تبدیل شده و کروستین جذب شده هم در روده و هم در کبد به مشتقات گلوکورونید متابولیزه می‌شود [۹-۱۱]. همچنین دیده شده که کروسین پس از تزریق داخل صفاقی یا دریافت به‌صورت خوراکی در کبد تجمع می‌یابد و سپس از طریق کلیه‌ها دفع می‌شود [۱۲]. در مطالعه حاضر آثار سمی احتمالی دزهای مؤثر کروسین در درمان بیماری‌های مختلف مثل سرطان پستان [۱۳] و سرطان معده [۱٤]، دیابت نوع ۱ و ۲ [۱۵، ۱٦] و درد مزمن [۱۷، ۱۸] که همگی اخیراً در آزمایشگاه محققان حاضر در رت القا و مطالعه شده است، بر کبد رت طبیعی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و کیت‌ها

کلیه مواد شیمیایی و کیت‌های مورد استفاده در این تحقیق از شرکت‌های معتبر Sigma (آمریکا) و Merck (آلمان) خریداری شد.

استخراج کروسین

استخراج و خالص‌سازی کروسین از زعفران براساس روش بولحسنی و همکاران انجام گرفت [۱۹].

تهیه، نگهداری و نحوه تیمار حیوانات آزمایشگاهی

رت‌های ماده ویستار آلبینو (Wistar Albino) دو ماهه با وزن ۲۰ ± ۱۸۰ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و در حیوان‌خانه دانشگاه تربیت مدرس تحت شرایط استاندارد نور، دما و رطوبت قرار گرفتند. رت‌ها دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. بعد از تقریباً ۲ هفته به‌منظور سازگاری با محیط جدید، رت‌ها به‌طور تصادفی به ٤ گروه تقسیم شدند (هر گروه ٦ رت). گروه ۱ گروه کنترل بود و به اعضای آن حلال کروسین که نرمال سالین است، تزریق شد. به گروه‌های ۲ تا ٤، کروسین با دزهای۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هفته‌ای یک بار به‌مدت ٤ هفته به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. رت‌ها یک هفته بعد از آخرین تزریق کشته شدند، نمونه خون از قلب جمع‌آوری شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و سپس سرم جداسازی شد. همچنین بافت کبد رت‌ها پس از شستشو در نرمال سالین و انجماد سریع در ازت مایع، در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی سرم

پارامترهای سرمی عملکرد کبد شامل سطوح آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) و نیز پارامترهای سرمی عملکرد کلیه شامل اوره، اوریک اسید و کراتینین در سرم رت‌ها با استفاده از کیت‌های تشخیصی پارس آزمون اندازه‌گیری شد.

بررسی هیستوپاتولوژی کبد

برای انجام مطالعات آسیب‌شناسی، مقداری از بافت کبد موش‌های مورد مطالعه بلافاصله بعد از باز کردن شکم و شستشو در نرمال سالین برداشته و در محلول فرمالین

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

۱۰ درصد انداخته شد. رنگ‌آمیزی لام‌ها به روش هماتوکسیلین و ائوزین صورت گرفت.

سنجش پارامترهای بیوشیمیایی در کبد

برای اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی کبد از هموژن ۱۰ درصد یا ۲۰ درصد تهیه شده با بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH: ۷/٤) استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان گلوتاتیون احیا

در این تحقیق از روش سدلاک و لیندسی (Sedlak & Lindsay) برای اندازه‌گیری مقدار گلوتاتیون احیا استفاده شد [۲۰]. به ۵۰۰ میکرولیتر از هموژن ۲۰ درصد بافت کبد، ٤/٦ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر محلول تری‌کلرو استیک‌اسید ۵۰ درصد اضافه شد و به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه مخلوط شد. سپس به‌منظور رسوب دادن پروتئین‌های بافتی، مخلوط به‌دست آمده با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۹۷۵ میکرولیتر بافر تریس ۰/٤ مولار حاوی EDTA (Ethylene di-amine tetra acetic acid) ۰/۲ مولار (pH=۸/۹) و ۲۵ میکرولیتر محلول دی‌تیو نیترو بنزوئیک اسید (5,5′-Dithiobis 2-nitrobenzoic acid: DTNB) ۰/۰۱ مولار مخلوط شد و جذب آن توسط اسپکتروفتومتر در مقابل شاهد در طول موج ٤۱۲ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

هموژن ۱۰ درصد کبد به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰g در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. از محلول رویی نمونه‌های سانتریفوژ شده برای اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز استفاده شد. ۲۵ میکرولیتر از محلول رویی با ۹۷۵ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار مخلوط شده و با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ میلی‌مولار، کاهش جذب در ۲٤۰ نانومتر در مقابل شاهد در مدت ۱ دقیقه اندازه‌گیری شد و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز طبق فرمول $K= (2.3/\Delta t) (\log A_1/A_2)$ محاسبه شد [۲۱].

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

برای تعیین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از کیت اندازه‌گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شرکت Sigma استفاده شد. در این کیت از سیستم زانتین- زانتین اکسیداز (Xanthine- Xanthine Oxidase) به‌عنوان تولید کننده آنیون سوپراکسید استفاده شده است که سبب احیای ترکیب نیتروبلوتترازولیوم (Nitrobluetetrazolium) به رنگ فورمازان (Formazan) می‌شود. این ترکیب در طول موج ٤۵۰ نانومتر بیشترین جذب را دارد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به‌صورت میزان مهار این واکنش بیان می‌شود. اندازه‌گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز براساس روش شرح داده شده در کیت و با استفاده از هموژن ۱۰ درصد کبد انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز از روش شرح داده شده توسط هافمن (Hoffman) که به‌طور مستقیم میزان سوبسترای باقیمانده (گلوتاتیون مصرف نشده) را طی فواصل زمانی مشخص در حضور مقادیر کم پراکسید اندازه‌گیری می‌کند، استفاده شد [۲۲]. در یک لوله آزمایش ۱ میلی‌لیتر گلوتاتیون ۲ میلی‌مولار، ۱ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات حاوی EDTA، ۰/۵ میلی‌لیتر سدیم آزاید ۰/۰۱ مولار و ۳۰ میکرولیتر هموژن ۲۰ درصد کبد ریخته شد. حجم نهایی این مخلوط با آب مقطر به ٤ میلی‌لیتر رسانده شد. مخلوط به‌دست آمده به‌مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱/۲۵ میلی‌مولار به آن اضافه شد و در فواصل ۳ دقیقه‌ای، ۱ میلی‌لیتر از این مخلوط برداشته شد و به ٤ میلی‌لیتر محلول متافسفریک اسید (Metaphosphoric acid) اضافه شد. در مرحله بعد

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

۲ میلی‌لیتر از این محلول جدید به ۲ میلی‌لیتر محلول Na_2HPO_4 ۰/٤ مولار و ۱ میلی‌لیتر محلول DTNB اضافه شد و جذب در ٤۱۲ نانومتر خوانده شد. برای به‌دست آوردن غلظت گلوتاتیون در زمان صفر، تمامی مواد بالا در یک لوله آزمایش دیگر اضافه شد؛ با این تفاوت که به جای پراکسید هیدروژن آب اضافه شد. از آن‌جایی که ممکن است گلوتاتیون به‌طور غیرآنزیمی اکسید شود، لازم است تا میزان اکسید شدن غیرآنزیمی گلوتاتیون نیز به‌دست آید. بدین منظور تمامی مواد ذکر شده در بالا به جز نمونه در یک لوله آزمایش جداگانه ریخته شد و در فواصل ۳ دقیقه‌ای کاملاً مانند بالا عمل شد تا میزان اکسید شدن غیرآنزیمی به‌دست آید. فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از معادله ارایه شده توسط تسوبی (Tsuboi) و همکاران [$10\ (\log C_0 - \log C_6)$ = فعالیت آنزیم (Activity)] به‌دست آمد [۲۳].

اندازه‌گیری مقدار TBARS در بافت کبد

اندازه‌گیری میزان TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) براساس روش اوکاوا (Ohkawa) و همکاران انجام شد [٢٤]. ۱۰۰ میکرولیتر از هموژن بافتی ۱۰ درصد برداشته شد و به آن ۲۰۰ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات، ۱/۵ میلی‌لیتر اسید استیک و ۱/۵ میلی‌لیتر محلول آبی تیوباربیتوریک اسید اضافه شد. حجم این مخلوط با آب مقطر به ٤ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس این مخلوط به‌مدت ٦۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از خنک کردن لوله آزمایش در زیر آب سرد، ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه و ۵ میلی‌لیتر نرمال بوتانول (n-Butanol) به آن اضافه و به شدت هم زده شد. بعد از سانتریفوژ با سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه، لایه آلی برداشته شد و در دستگاه فلوریمتر (طول موج تحریکی: ۵۱۵ نانومتر، طول موج نشری: ۵۵۳ نانومتر) ارزیابی شد. نمودار استاندارد مالون‌دی‌آلدیید با استفاده از رقت‌های مختلف محلول تترامتوکسی پروپان (Tetramethoxypropane) ۱۰ نانومتر رسم شد و با استفاده از آن غلظت مالون‌دی‌آلدیید در نمونه‌های مجهول براساس نانومول مالون‌دی‌آلدیید در هر گرم بافت کبد به‌دست آمد.

سنجش محتوای کربونیل پروتئین‌ها در بافت کبد

برای اندازه‌گیری محتوای کربونیل پروتئین‌ها از روش معرفی شده توسط لوین (Levine) و همکاران با اندکی تغییر استفاده شد [۲۵]. ۱۰۰ میکرولیتر از هموژن ۱۰ درصد کبد در دو میکروتیوب ریخته شد. یکی از میکروتیوب‌ها به‌عنوان نمونه مجهول و دیگری به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. به میکروتیوب نمونه، ۵۰۰ محلول میکرولیتر دی نیتروفنیل هیدرازین (DNPH) ۱۰ میلی‌مولار و به میکروتیوب شاهد، ۵۰۰ میکرولیتر حلال DNPH یعنی اسید کلریدریک ۲ مولار اضافه شد. میکروتیوب‌ها کاملاً ورتکس (Vortex) شد و به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. هر ۱۵ دقیقه میکروتیوب‌ها ورتکس شد. بعد از یک ساعت، مقدار ٦۰۰ میکرولیتر تری کلرو اسیداستیک ۲۰ درصد به هر دو میکروتیوب اضافه و کاملاً مخلوط شد. سپس میکروتیوب‌ها به‌مدت ۳ دقیقه با دور g× ۱۱۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب تشکیل شده با ۱ میلی‌لیتر محلول اتانول- اتیل استات (۱:۱) به‌منظور حذف DNPH اضافی شستشو داده شد. عمل شستشو دو بار انجام شد. هربار قبل از سانتریفوژ و دور ریختن محلول رویی، ۱۰ دقیقه میکروتیوب‌ها در دمای اتاق نگهداری شد. در انتها رسوب حاصل در ۰/٦ میلی‌لیتر اوره ۱۰ مولار حل شد. برای حل شدن کامل پروتئین‌ها، رسوب‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس جذب نمونه‌ها علیه شاهد در طول موج ۳٦۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. با استفاده از ضریب جذب مولی ۲۲۰۰۰ مقدار گروه‌های کربونیل پروتئین‌ها به‌دست آمد و مقدار آن بر اساس میکروگرم بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way Analysis of Variance: ANOVA) استفاده شد. برای انجام آزمون‌های تکمیلی آزمون Tukey استفاده شد. سطح معنی‌داری در کلیه آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

نتایج

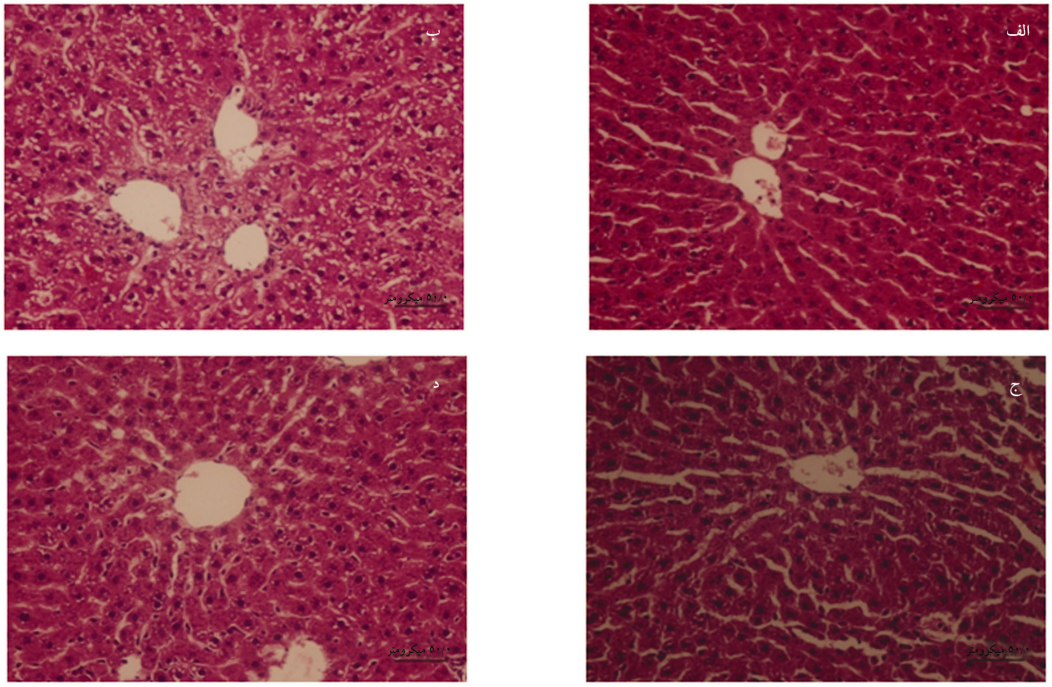
نتایج حاصل از اندازه‌گیری پارامترهای آسیب کبدی و کلیوی رت‌ها در جدول ۱ آورده شده است. دریافت دزهای مختلف کروسین اختلاف معنی‌داری در هیچ کدام از پارامترهای بررسی شده در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نکرد.

جدول ۱ اثر کروسین بر پارامترهای آسیب کبدی و کلیوی در رت طبیعی

گروه‌ها	دز (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	آلانین آمینوترانسفراز (واحد بین‌المللی بر لیتر)	آسپارتات آمینوترانسفراز (واحد بین‌المللی بر لیتر)	آلکالین فسفاتاز (واحد بین‌المللی بر لیتر)	اوره (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	اوریک اسید (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	کراتینین (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
۱	–	۵۷±۱۵/۷	۱۲۳/۶±۱۴/۲	۲۰۶/۳±۷۹/۷	۴۳±۵/۵	۱/۶±۰/۴	۰/۴۵±۰/۰۷
۲	۵۰	۴۲/۲±۱۴/۵	۱۱۲/۴±۳۱/۹	۲۸۷/۲±۹۹/۸	۴۲/۴±۵/۹	۱/۷±۰/۴	۰/۳±۰/۰۱
۳	۱۰۰	۴۸/۵±۱۲/۴	۱۳۵/۱±۴۶/۳	۲۶۲/۳±۹۸/۴	۴۴/۳±۵/۲	۱/۳±۰/۱۶	۰/۳۷±۰/۰۱
۴	۲۰۰	۴۸/۵±۱۱/۶	۱۵۶±۳۷/۵	۲۵۷±۷۲/۳	۴۲/۲±۷/۴	۲/۱۷±۰/۵	۰/۵۲±۰/۰۶

* تمامی داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

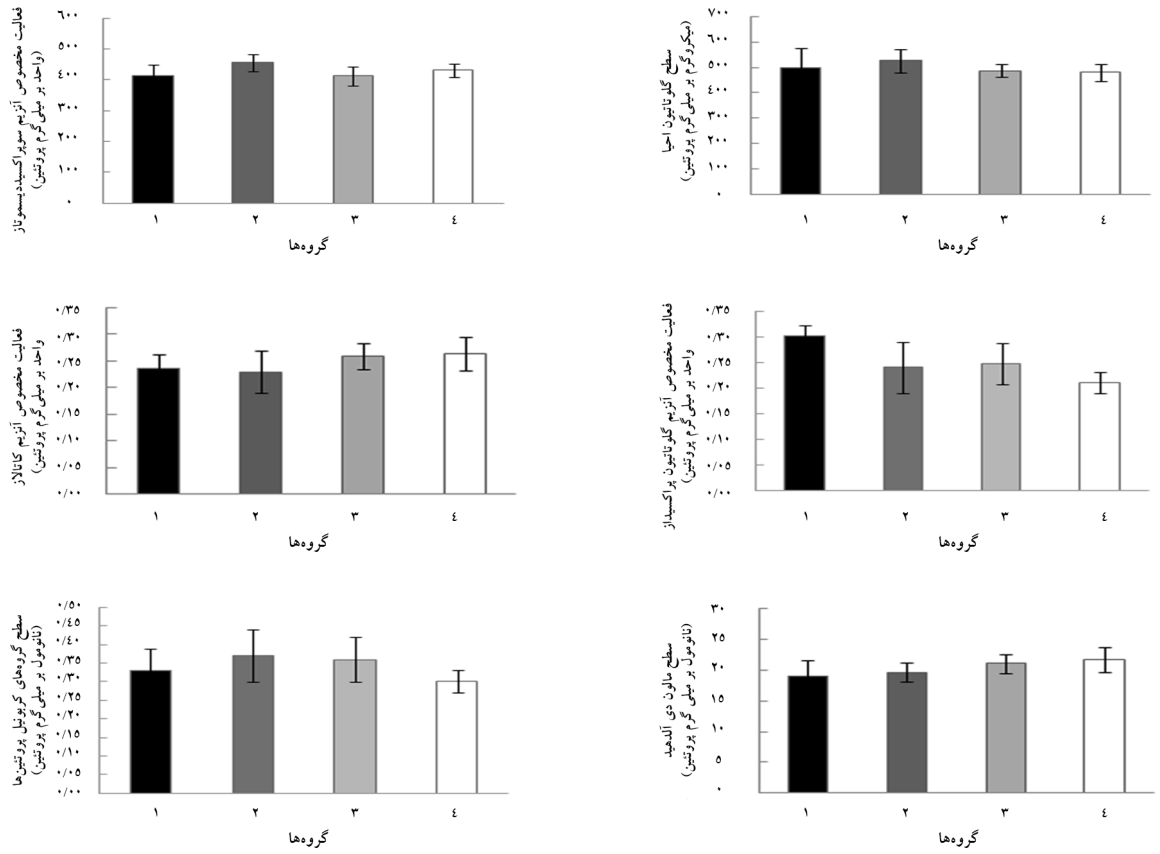
نتایج حاصل از بررسی بافت‌شناسی بافت کبد نشان داد که تمامی نمونه‌ها از نظر بافت‌شناسی کاملاً طبیعی بود و هیچ‌گونه تغییر قابل توجه اعم از نکروز و غیره در بافت کبد گروه‌های تحت تیمار با کروسین مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۲ بررسی هیستوپاتولوژیک بافت کبد در گروه‌های مختلف تحت مطالعه؛ الف) نشان‌دهنده گروه کنترل و ب–د) به‌ترتیب نشان‌دهنده گروه‌هایی است که کروسین با دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرده‌اند. (بزرگنمایی ۱۰۰ برابر)

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

نتایج حاصل از سنجش پارامترهای بیوشیمیایی کبد (شکل ۳) نشان داد که دریافت دزهای مورد بررسی کروسین، تغییر معنی‌داری در میزان گلوتاتیون احیا، مالون دی آلدیید و گروه‌های کربونیل پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز ایجاد نکرد و تنها دز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز شد (P<۰/۰۵).



شکل ۳ نتایج حاصل از سنجش پارامترهای بیوشیمیایی در کبد رت طبیعی؛ شماره ۱ نشان‌دهنده گروه کنترل و شماره‌های ۲، ۳ و ٤ به‌ترتیب نشان‌دهنده گروه‌هایی است که کروسین با دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرده‌اند. ستاره اختلاف معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) را نشان می‌دهد.

بحث

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود کروسین یک دی‌استر تشکیل شده از دی‌ساکارید جنتیوبیوز (Gentiobiose) و کربوکسیلیک اسید کروستین (دی جنتیوبیوزیل ۸ و ´۸- دی آپوکاروتن- ۸ و ´۸- اوئات) است. این ماده یکی از مهم‌ترین کاروتنویید‌های موجود در زعفران (تقریباً ۸۰ درصد) است. کروسین خواص درمانی متعددی دارد و به دلیل محلول بودن در آب، ایمن بودن و عدم ایجاد آثار جانبی به‌عنوان یک داروی گیاهی بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۲٦، ۲۷].

بارتون و اینگولد در سال ۱۹۸٤ بیان کردند که کاروتنویید‌های ٤۰ کربنه تحت شرایطی ممکن است فعالیت پیش اکسیدانی داشته باشند [۳]. غلظت اکسیژن، غلظت مولکول کاروتنویید و آثار متقابل سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدان، مهم‌ترین عوامل تعیین کننده قدرت آنتی‌اکسیدانی/ پیش‌اکسیدانی یک کاروتنویید است [۲۸]. دو مکانیسم برای فعالیت پیش‌اکسیدانی این کاروتنویید‌ها پیشنهاد شده است [۲۹]:

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

– کاروتنوییـد بـا ROS (Reactive Oxygen Species) و RNS (Reactive Nitrogen Species) واکـــنش داده و محصولات پراکسیداتیو تولید می‌کند [۳۰].

– غلظت‌های بالای کاروتنوییـد مـی‌توانـد نفوذپـذیری غشـا را نسبت به رادیکال‌های آزاد و مواد سمی بالا ببرد.

به‌عنوان مثال دیده شـده اسـت کـه لیکـوپن و بتاکـاروتن در غلظت‌های بسیار پایین (۱–۳ میکرومـولار) توانـایی محافظـت از آسیب به DNA در برابر صدمات اکسیداتیو را دارد؛ در صـورتی که در غلظت‌های بالاتر (٤–۱۰ میکرومولار) این توانـایی کـاهش یافته و برعکس آسیب اکسیداتیو را افزایش می‌دهد [۳۱].

کروسـین کاروتنوییـد محلـول در آب و ۲۰ کربنـه اسـت. دزهای کروسین که در این تحقیق بررسی شد، دزهایی است که به‌طور معمول در آزمایشگاه محققان حاضر و سایر محققـین در موارد فوق مطالعه و آثار مفید آن‌ها نشـان داده شـده اسـت. در این تحقیق مشاهده شد که دزهای کروسین مورد اسـتفاده (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تغییـر معنـی‌داری در مقـدار اوره، اوریک‌اسید، کراتینین، آلانـین آمینوترانسـفراز، آسـپارتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسـفاتاز سـرم رت هـا ایجـاد نکـرد. حسین‌زاده و همکاران دزهای ۱۵، ٤۵، ۹۰ و ۱۸۰ میلی‌گرم بـر کیلوگرم کروسین را روزانه بـه‌مـدت ۲۱ روز بـه رت و مـوش طبیعی دادند و مشاهده کردنـد کـه دز ۱۵ و ٤۵ باعـث کـاهش ALP و دز ۱۸۰ باعث کاهش کراتینین شد ولی سایر پارامترهـا (اوره، ALT و AST) تغییر نکرد [۸]. همچنین گارسیو اولمـو (Garcia-Olmo) و همکاران دز ٤۰۰ میلـی‌گـرم بـر کیلـوگرم کروسین را هفته‌ای یک بار بـه‌مـدت ۱۳ هفتـه بـه رت طبیعـی دادند و با بررسـی پارامترهـای عملکـرد کبـد و کلیـه مشـاهده کردند که اوره، فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسـفاتاز و آسـپارتات آمینوترانسـفراز در رت‌هـای نـر و کـراتینین در رت‌هـای مـاده افزایش یافت [۳۲].

ونگ (Wang) و همکاران گزارش کـرده‌انـد کـه دریافـت خوراکی کروسین با دز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به‌مـدت ۸ روز تغییری در عملکرد کبد در رت ایجاد نکـرده اسـت؛ امـا می‌تواند باعث بیرنگ شدن حـاد کبـد شـود. همچنـین دزهـای بالای ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به‌مدت ۲ هفتـه، آسـیب کبدی و رنگدانه‌های سیاه ایجاد کرده، در صورتی که در دزهای پایین‌تر آثار قابل ملاحظه‌ای نداشته است. درحالی کـه اسـتفاده طولانی‌مدت (٤ مـاه) از ۱ درصـد کروسـین در رژیـم رت‌هـا، باعث اختلال جزئی در عملکرد کبد و رنگیزه‌دار شدن آن شـده است. البته رنگدانه‌های سـیاه و آسـیب حـاد کبـدی بـه همـراه بیرنگ‌شدن، کاملاً قابل جبران و بازگشت بوده اسـت [۳۳]. امـا نتایج هیستوپاتولوژی حاصـل از تحقیـق حاضـر نشـان داد کـه کروسین با دزهای مورد استفاده هـیچ تغییـر قابـل تـوجهی در بافت کبد ایجاد نمی‌کند که با نتایج هیستوپاتولوژیکی گـزارش شده توسـط حسـین‌زاده و همکـاران [۱۲] و گارسـیا–اولمـو و همکاران [۳۲] مطابقت دارد. نتایج گزارش شده توسط گارسیا–اولمو و همکـاران و همچنـین نتـایجی کـه نشـان دهنـده آثـار کروسین بر ایجاد رنگدانه‌ها در کبد اسـت، بـه دلیـل دز بسـیار بالای مورد استفاده از این ماده در مدت بسیار طولانی است کـه بر اساس نظر ونگ و همکاران [۳۳] برگشـت‌پـذیر اسـت؛ هـر چند که با توجه به بررسی‌های محققـان حاضـر اساسـاً تجـویز چنین دزهای بالایی به‌مدت طولانی برای آثـار بهبـودی بخـش ضرورتی ندارد.

مطالعات زیادی درباره اثـر کروسـین بـر عملکـرد سیسـتم آنتی‌اکسیدانی در حضور اسـترس اکسـیداتیو صـورت گرفتـه و نشـان داده اسـت کـه کروسـین مـی‌توانـد بـا جلـوگیری از پراکسیدشدن لیپیدها و پروتئین‌هـا، ممانعـت از کـاهش مقـدار گلوتاتیون و اصلاح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان یا به‌عبـارت دیگر بالا بردن ظرفیت آنتـی‌اکسـیدانی، آثـار ناشـی از اسـترس اکسیداتیو ایجاد شده تحت شـرایط مختلـف را کـاهش دهـد و باعث بهبود وضعیت سلول برای مقابله با شـرایط ایجـاد شـده شـــود [۳٤–۳۷] همچنـــین مطالعـــات زیـــادی دربـــاره اثـــر کاروتنوییدهای ٤۰ کربنه محلول در چربی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سیستم آنتی‌اکسیدانی انجام گرفتـه اسـت. بـرای مثال دیده شده است که کانتـازانتین (Canthaxanthin) بـا دز

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

۱٤ میکروگرم بر گرم به‌مدت ۱۵ روز در موش‌های Balb/c باعث کاهش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و افزایش فعالیت کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در بافت کبد [۳۸] و بتاکاروتن ۰/۰۲ درصد به‌مدت ۲ هفته در رژیم غذایی رت باعث افزایش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در بافت کبد می‌شود [۳۹]. در تحقیق حاضر کروسین با دزهای مورد استفاده تغییری در میزان گلوتاتیون احیا، مالون دی آلدیید، میزان گروه‌های کربونیل پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در بافت کبد رت‌های طبیعی ایجاد نکرد و تنها باعث اندکی کاهش در فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز شد. کاروتنویید‌های مختلف می‌تواند تأثیرات متفاوتی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان داشته باشد. پاسخ متفاوت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به کاروتنویید‌های مختلف ممکن است به دلیل نقش متفاوت آنزیم‌ها در فرآیند اکسیداتیو و همچنین جایگاه سلولی آن‌ها باشد. نکته مهم دیگر این است که خواص پیش اکسیدانی (Prooxidant) ذکر شده در بالا در کاروتنویید‌های ٤۰ کربنه و محلول در چربی گزارش شده است، در حالی که کروسین یک کاروتنویید ۲۰ کربنه و محلول در آب است. دز کاروتنویید مصرفی و حضور همزمان استرس اکسیداتیو دو عامل مهم دیگری است که بر چگونگی تأثیر این کاروتنویید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اثر می‌گذارد.

تفاوت‌های میان پارامترهای بیوشیمیایی مورد مطالعه در تحقیق حاضر با مطالعات ذکر شده می‌تواند به دلیل تعداد دفعات مورد استفاده و فاصله زمانی بین دزها باشد. با توجه به این که دزهای مورد استفاده هیچ تغییر معنی‌داری در پارامترهای بیوشیمیایی سرم و پارامترهای آنتی‌اکسیدانی کبد به جز گلوتاتیون پراکسیداز ایجاد نکرد و نیز هیچ تغییر پاتولوژیک در بافت کبد ایجاد نشد، می‌توان گفت که کروسین با دزهای مورد استفاده کاملاً ایمن است و احتمالاً کاهش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در طولانی‌مدت برگشت‌پذیر و قابل جبران است. بنابراین دز مناسب کروسین نه تنها می‌تواند استرس اکسیداتیو را مهار نماید، بلکه خودش نیز اثر سمی ایجاد نمی‌کند. این تحقیق برای بررسی آثار سمی احتمالی کروسین در بیماری‌های مختلف که در بالا به آن‌ها اشاره شد، ادامه دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی بالینی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است و با حمایت مالی این دانشگاه به انجام رسیده است.

منابع

[1] Bathaie SZ, Mousavi SZ. New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. Crit Rev Food Sci Nutr 2010; 50(8): 761-86.

[2] Bathaie SZ, Shams A, Moghadas Zadeh Kermani F. Crocin Bleaching Assay Using Purified Di-gentiobiosyl Crocin (-crocin) from Iranian Saffron. Iran J Basic Med Sci 2011; 14(5): 399-406.

[3] Burton GW, Ingold KU. beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. Science 1984; 224(4649): 569-73.

[4] Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. FASEB J 1997; 11(7): 526-34.

[5] Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta 2003; 329(1-2): 23-38.

[6] Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr 1993; 57(5 Suppl): 715S-724S.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

[7] Frankel EN, Neff WE. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. Biochimia et Biophysica Acta 1983; 754(3): 264-70.

[8] Russmann S, Kullak-Ublick GA, Grattagliano I. Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. Curr Med Chem 2009; 16(23): 3041-53.

[9] Asai A, Nakano T, Takahashi M, Nagao A. Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice. J Agric Food Chem 2005; 53(18): 7302-6.

[10] Chryssanthi DG, Lamari FN, Georgakopoulos CD, Cordopatis P. A new validated SPE-HPLC method for monitoring crocetin in human plasma--application after saffron tea consumption. J Pharm Biomed Anal 2011; 55(3): 563-8.

[11] Xi L, Qian Z, Du P, Fu J. Pharmacokinetic properties of crocin (crocetin digentiobiose ester) following oral administration in rats. Phytomedicine 2007; 14(9): 633-6.

[12] Hosseinzadeh H, Shariaty VM, Sameni AK, Vahabzadeh M. Acute and sub-acute toxicity of crocin, aconstituent of Crocus Sativus L.(Saffron), in mice and rats. Pharmacology Online 2010; 2: 943-51.

[13] Ashrafi M. Investigation on crocin, crocetin and picrocrocin effects on cell cycle (Cyclin D1 and P21 expression) on NMU-induced breast cancer in rat. PhD Thesis, Tehran: Tarbiat Modares University, 2012. (Persian)

[14] Hoshyar R, Bathaie SZ, Sadeghizadeh M. Crocin triggers the apoptosis through increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase activation in human gastric adenocarcinoma, AGS, cells. DNA Cell Biol 2013; 32(2): 50-7.

[15] Bahmani F. Mechanisms of the effects of chemical chaperones on diabetic rats and their inhibitory effects on prevention of cataract. Ph.D Thesis, Tehran: Tarbiat Modares University, 2012. (Persian)

[16] Shirali S, Zahra Bathaie S, Nakhjavani M. Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. Phytother Res 2013; 27(7): 1042-7.

[17] Karami M, Bathaie SZ, Tiraihi T, Habibi Rezaie M, Arab-Kheradmand J, Faghihzadeh S. The Effect of Crocin and its Mechanism of Action on Chronic Pain Induced by Spinal Cord Contusion in a Rat Model. Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology 2013; 16(1): 63-73. (Persian)

[18] Karami M, Bathaie SZ, Tiraihi T, Habibi-Rezaei M, Arabkheradmand J, Faghihzadeh S. Crocin improved locomotor function and mechanical behavior in the rat model of contused spinal cord injury through decreasing calcitonin gene related peptide (CGRP). Phytomedicine 2013; 21(1): 62-7.

[19] Bolhasani A, Bathaie SZ, Yavari I, Moosavi-Movahedi AA, Ghaffari M. Separation and Purification of some Components of Iranian Saffron. Asian J Chem 2005; 17(2): 727-9.

[20] Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem 1968; 25(1): 192-205.

[21] Jung CH, Seog HM, Choi IW, Choi HD, Cho HY. Effects of wild ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer) leaves on lipid peroxidation levels

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

and antioxidant enzyme activities in streptozotocin diabetic rats. J Ethnopharmacol 2005; 98(3): 245-50.

[22] Hafeman DG, Sunde RA, Hoekstra WG. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. J Nutr 1974; 104(5): 580-7.

[23] Tsuboi KK, Penefsky ZJ, Hudson PB. Enzymes of the human erythrocyte. III. Tripeptidase, purification and specific properties. Arch Biochem Biophys 1957; 68(1): 54-68.

[24] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95(2): 351-8.

[25] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol 1990; 186: 464-78.

[26] Singla RK, Bhat VG. Crocin: An Overview. Indo Global J Pharm Sci 2011; 1(4): 281-6.

[27] Bolhassani A, Khavari A, Bathaie SZ. Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. Biochim Biophys Acta 2014; 1845(1): 20-30.

[28] Palozza P. Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. Nutr Rev 1998; 56(9): 257-65.

[29] Lowe GM, Vlismas K, Young AJ. Carotenoids as prooxidants? Mol Aspects Med 2003; 24(6): 363-9.

[30] Fiedor J, Fiedor L, Haessner R, Scheer H. Cyclic endoperoxides of beta-carotene, potential pro-oxidants, as products of chemical quenching of singlet oxygen. Biochim Biophys Acta 2005; 1709(1): 1-4.

[31] Lowe GM, Bilton RF, Davies IG, Ford TC, Billington D, Young AJ. Carotenoid composition and antioxidant potential in subfractions of human low-density lipoprotein. Ann Clin Biochem 1999; 36 (Pt 3): 323-32.

[32] García-Olmo DC, Riese HH, Escribano J, Ontañón J, Fernandez JA, Atiénzar M, García-Olmo D. Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (*Crocus sativus* L.): an experimental study in the rat. Nutr Cancer 1999; 35(2): 120-6.

[33] Wang CJ, Hwang LS, Lin JK. Reversible hepatic black pigmentation and enzyme alteration induced by prolonged feeding of high dose of crocin dyes in rats. Proc Natl Sci Counc Repub China B 1984; 8(3): 246-53.

[34] Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, 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.

[35] Hosseinzadeh H, Modaghegh MH, Saffari Z. Crocus sativus L. (Saffron) extract and its active constituents (crocin and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. Evid Based Complement Alternat Med 2009; 6(3): 343-50.

[36] Asdaq SM, Inamdar MN. Potential of Crocus sativus (saffron) and its constituent, crocin, as hypolipidemic and antioxidant in rats. Appl Biochem Biotechnol 2010; 162(2): 358-72.

[37] El-Beshbishy HA, Hassan MH, Aly HA, Doghish AS, Alghaithy AA. Crocin "saffron"

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]

protects against beryllium chloride toxicity in rats through diminution of oxidative stress and enhancing gene expression of antioxidant enzymes. Ecotoxicol Environ Saf 2012; 83: 47-54.

[38] Palozza P, Calviello G, Emilia De Leo M, Serini S, Bartoli GM. Canthaxanthin supplementation alters antioxidant enzymes and iron concentration in liver of Balb/c mice. J Nutr 2000; 130(5): 1303-8.

[39] van Lieshout EM, Peters WH, Jansen JB. Effect of oltipraz, alpha-tocopherol, beta-carotene and phenethylisothiocyanate on rat oesophageal, gastric, colonic and hepatic glutathione, glutathione S-transferase and peroxidase. Carcinogenesis 1996; 17(7): 1439-45.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-27]