

Assessment of Crocin Toxicity on the Rat Liver

Fatemeh Taheri¹, S. Zahra Bathaie^{2*}, Mahboobe Ashrafi³, Elham Ghasemi⁴

- 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

بررسی آثار سمیت کبدی کروسین در رت

فاطمه طاهری^۱، سیده زهرا بطحائی^{۲*}، محبوبه اشرافی^۳، الهام قاسمی^۴

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

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۴/۲۵

دریافت مقاله: ۹۳/۰۳/۱۹

چکیده

هدف: کروسین کاروتنوئید استخراج شده از زعفران است که دارای خواص درمانی بسیاری از جمله آثار آنتی‌اکسیدانی است. ترکیبات آنتی‌اکسیدان از جمله کاروتنوئیدها 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 ۴ گروه تقسیم شدند. به گروه ۱ (کنترل)، نرمال سالین و به گروه‌های ۲-۴ به ترتیب کروسین با دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هفته‌ای یک بار به مدت ۴ هفته به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. رت‌ها یک هفته بعد از آخرین تزریق کشته شدند. پارامترهای بیوشیمیایی آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز، اوره، اسیداوریک و کراتینین در سرم و میزان گلوکوتایون احیا، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکوتایون پراکسیداز و میزان اکسید شدن پروتئین‌ها و لیپیدها با اندازه‌گیری میزان گروه‌های کربونیل و مالون‌دی‌آلدید 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، گلوکوتایون احیا، مالون‌دی‌آلدید، گروه‌های کربونیل پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در بافت کبد ایجاد نشد. همچنین هیچ تغییر بافتی در کبد مشاهده نشد. تنها در ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث اندکی کاهش در فعالیت گلوکوتایون 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: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، صفحات: ۶۷-۷۹

مقدمه

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

کروسین‌ها (Crocic) که در حدود ۳/۵ درصد وزن کلاله خشک زعفران را تشکیل می‌دهد، مهم‌ترین عامل ایجاد کننده رنگ زعفران بوده و جزء معدود کاروتنوئیدهای محلول در آب

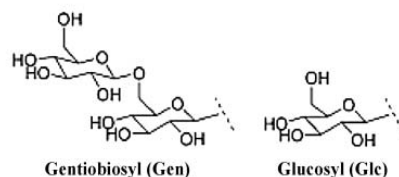
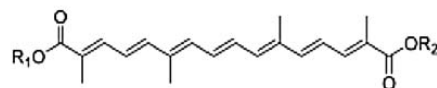
بررسی اثرات سمیت کبدی کروسین در رت

این صورت که با افزایش فشار اکسیژن یا غلظت کاروتنوئید، یک کاروتنوئید ممکن است فعالیت آنتی‌اکسیدانی یا پیش‌اکسیدانی داشته باشد [۳].

سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در حالت طبیعی دائماً در تعادل با سرعت تولید رادیکال‌های فعال است تا بتواند هموستاز (Homestasis) را در بدن برقرار کند. تنش اکسیداتیو (Oxidative Stress) حاصل به هم خوردن تعادل بین این دو عامل است که در اثر افزایش مواجهه با مواد اکسیدان یا کاهش حفاظت در برابر آن‌ها ایجاد می‌شود و می‌تواند منجر به تغییر ساختار مولکول‌های مهم زیستی نظیر چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شود. تنش اکسیداتیو تغییرات زیادی را در ساختار پروتئین‌ها ایجاد می‌کند؛ از جمله شکسته شدن پیوندهای پپتیدی، ایجاد اتصالات عرضی جدید در یک رشته پروتئینی یا بین رشته‌های پلی‌پپتیدی مختلف و تشکیل مجموعه‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالا، تغییر در میزان گروه‌های تیول پروتئین‌ها و تشکیل گروه‌های کربونیل در زنجیر جانبی آمینواسیدها به‌ویژه در آمینواسیدهای پرولین، لیزین، آرژنین و ترئونین [۴]. در حال حاضر اندازه‌گیری میزان گروه‌های کربونیل به‌عنوان یک شاخص اساسی برای بررسی میزان اکسید شدن پروتئین‌ها به کار می‌رود. ارجحیت اندازه‌گیری گروه‌های کربونیل نسبت به سایر روش‌ها به‌منظور بررسی اکسید شدن پروتئین‌ها، به علت تشکیل گروه‌های کربونیل در مراحل اولیه اکسید شدن و پایداری نسبی آن‌هاست [۵].

مهم‌ترین محصولات ایجاد شده در اثر پراکسید شدن چربی‌ها عبارتند از لیپید هیدروپراکسیدها، محصولات فلورسانس، آلکان‌های فرار و دی‌ان‌های کونژوگه (Conjugated Dienes) [۶]. لیپید هیدروپراکسیدها که اغلب در اثر اکسید شدن اسیدهای چرب غیراشباع موجود در فسفولیپیدها و استرکسترول تشکیل می‌شود، ناپایدار است و به محصولات ثانویه‌ای نظیر مالون‌دی‌آلدید (Malondialdehyde: MDA) تبدیل می‌شود. مالون‌دی‌آلدید یک دی‌آلدید سه کربنه و یکی از محصولات مهم و عمده ناشی از پراکسید شدن لیپیدهاست که اغلب برای بررسی سنجش میزان پراکسید شدن لیپیدی

خواص کروسین‌ها می‌توان به آثار ضد آتروژنی (Antiathergenic) و ضد لخته، محافظت‌کنندگی سیستم عصبی و نورون‌ها، بهبود رفتارهای یادگیری و حافظه، کاهش لیپیدهای سرم، بهبود کارکرد کلیه، بهبود جریان خون در شبکه و عملکرد چشم، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان، ضدسرطان و ضدتومور اشاره کرد که به‌طور مبسوط در یک مقاله مروری به آن‌ها اشاره شده است [۱]. کروسین به دلیل ساختمان ویژه کاروتنوئیدی خود، رادیکال‌های آزاد را به دام انداخته و بنابراین یک آنتی‌اکسیدان بالقوه به‌شمار می‌رود و براساس همین ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن آزمونی به نام CBA (Crocic Bleaching Assay) برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی طراحی شده است [۲].



Name	R group
crocic-1 or α -crocic	digentiobioside crocetin
crocic-2 or tricrocic	gentioglucoside crocetin
crocic-3	gentiobioside crocetin
crocic-4	glucoside crocetin
crocic-5 or dirocic	diglucoside crocetin
crocetin	H

شکل ۱ ساختار انواع کروسین [۱]

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاروتنوئیدها تحت شرایطی ممکن است به سمت فعالیت پیش‌اکسیدانی تغییر یابد به این ترتیب که کاروتنوئیدها ممکن است تعادل پیش‌اکسیدان-آنتی‌اکسیدان را به سمت فعالیت اکسیدانی پیش ببرد و با کاهش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، منجر به آسیب اکسیداتیو بافت‌ها شود. فعالیت احتمالی پیش‌اکسیدانی کاروتنوئیدها اولین بار توسط بارتون و اینگولد (Burton & Ingold) مطرح شد، به

روش بولحسنی و همکاران انجام گرفت [۱۹].

تهیه، نگهداری و نحوه تیمار حیوانات آزمایشگاهی

رت‌های ماده ویستار آلبینو (Wistar Albino) دو ماهه با وزن 20 ± 180 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 به منظور سازگاری با محیط جدید، رت‌ها به‌طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند (هر گروه ۶ رت). گروه ۱ گروه کنترل بود و به اعضای آن حلال کروسین که نرمال سالین است، تزریق شد. به گروه‌های ۲ تا ۴، کروسین با دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هفته‌ای یک بار به مدت ۴ هفته به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. رت‌ها یک هفته بعد از آخرین تزریق کشته شدند، نمونه خون از قلب جمع‌آوری شد و به مدت 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 ازلت مایع، در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی سرم

پارامترهای سرمی عملکرد کبد شامل سطوح آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات 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

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 مالون‌دی‌آلدید- 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 متابولیزه‌کننده است؛ در نتیجه کبد به‌عنوان مهم‌ترین اندام در متابولیسم و حذف مواد خارجی عمل می‌کند [۸]. مطالعاتی که در جوانگان انجام شده نشان داده است که کروسین دریافت شده به‌صورت خوراکی قبل از جذب یا در حین جذب در روده به کروسیتین (Croctin) تبدیل شده و کروسیتین 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 [۱۴]، دیابت نوع ۱ و ۲ [۱۵، ۱۶] 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

بررسی اثرات سمیت کبدی کروسین در رت

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 نیتروبلوترازولیوم (Nitrobluetetrazolium) به رنگ فورمازان (Formazan) می‌شود. این ترکیب در طول موج ۴۵۰ 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 هموزن 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 سوپراکسید 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 هموزن ۲۰ درصد کبد ریخته شد. حجم نهایی این مخلوط با آب مقطر به ۴ 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 ۴ میلی‌لیتر محلول متافسفریک اسید (Metaphosphoric acid) اضافه شد. در مرحله بعد

۱۰ درصد انداخته شد. رنگ‌آمیزی لام‌ها به روش همتوکسیلین و اتوزین صورت گرفت.

سنجش پارامترهای بیوشیمیایی در کبد

برای اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی کبد از هموزن ۱۰ درصد یا ۲۰ درصد تهیه شده با بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH: ۷/۴) 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 هموزن ۲۰ درصد بافت کبد، ۴/۶ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر محلول تری‌کلورو استیک اسید 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 ۰/۴ مولار حاوی EDTA (Ethylene di-amine tetra acetic acid) ۰/۲ مولار (pH=۸/۹) و ۲۵ میکرولیتر محلول دی‌تیو نیترو بنزویک اسید (5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoic acid: DTNB) ۰/۰۱ مولار مخلوط شد و جذب آن توسط اسپکتروفتومتر در مقابل شاهد در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

هموزن ۱۰ درصد کبد به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰g در دمای ۴ 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 ۲۴۰ نانومتر در مقابل شاهد در مدت ۱ دقیقه اندازه‌گیری

رسم شد و با استفاده از آن غلظت مالون‌دی‌آلدیدید در نمونه‌های مجهول براساس نانومول مالون‌دی‌آلدیدید در هر گرم بافت کبد به دست 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 هموزن 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 دی‌نیتروفیل 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 به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. هر ۱۵ دقیقه میکروتیوب‌ها ورتکس شد. بعد از یک ساعت، مقدار ۶۰۰ میکرولیتر تری کلرو اسیداستیک ۲۰ درصد به هر دو میکروتیوب اضافه و کاملاً مخلوط شد. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۳ دقیقه با دور $\times 11000$ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب تشکیل شده با ۱ میلی‌لیتر محلول اتانول-اتیل استات (۱:۱) به منظور 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 ۰/۶ میلی‌لیتر اوره ۱۰ مولار حل شد. برای حل شدن کامل پروتئین‌ها، رسوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس جذب نمونه‌ها علیه شاهد در طول موج ۳۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. با استفاده از ضریب جذب مولی ۲۲۰۰۰ مقدار گروه‌های کربونیل پروتئین‌ها به دست آمد و مقدار آن بر اساس میکروگرم بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

۲ میلی‌لیتر از این محلول جدید به ۲ میلی‌لیتر محلول Na_2HPO_4 ۰/۴ مولار و ۱ میلی‌لیتر محلول DTNB اضافه شد و جذب در ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. برای به دست آوردن غلظت گلوکاتینون 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 گلوکاتینون به‌طور غیرآنزیمی اکسید شود، لازم است تا میزان اکسید شدن غیرآنزیمی گلوکاتینون نیز به دست 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 به دست آید. فعالیت آنزیم گلوکاتینون پراکسیداز با استفاده از معادله ارایه شده توسط تسوبی (Tsuboi) و همکاران $10 (\log C_0 - \log C_6) =$ فعالیت آنزیم (Activity) به دست آمد [۲۳].

اندازه‌گیری مقدار TBARS در بافت کبد

اندازه‌گیری میزان TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) براساس روش اوکاوا (Ohkawa) و همکاران انجام شد [۲۴]. ۱۰۰ میکرولیتر از هموزن بافتی ۱۰ درصد برداشته شد و به آن ۲۰۰ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات، ۱/۵ میلی‌لیتر اسید استیک و ۱/۵ میلی‌لیتر محلول آبی تیوباربتوریک اسید اضافه شد. حجم این مخلوط با آب مقطر به ۴ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس این مخلوط به مدت ۶۰ 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 ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، لایه آلی برداشته شد و در دستگاه فلوریمتر (طول موج تحریکی: ۵۱۵ نانومتر، طول موج نشری: ۵۵۳ نانومتر) ارزیابی شد. نمودار استاندارد مالون‌دی‌آلدیدید با استفاده از رقت‌های مختلف محلول تترامتوکسی پروپان (Tetramethoxypropane) ۱۰ نانومتر

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 ($P < 0/05$) در نظر گرفته شد.

نتایج

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

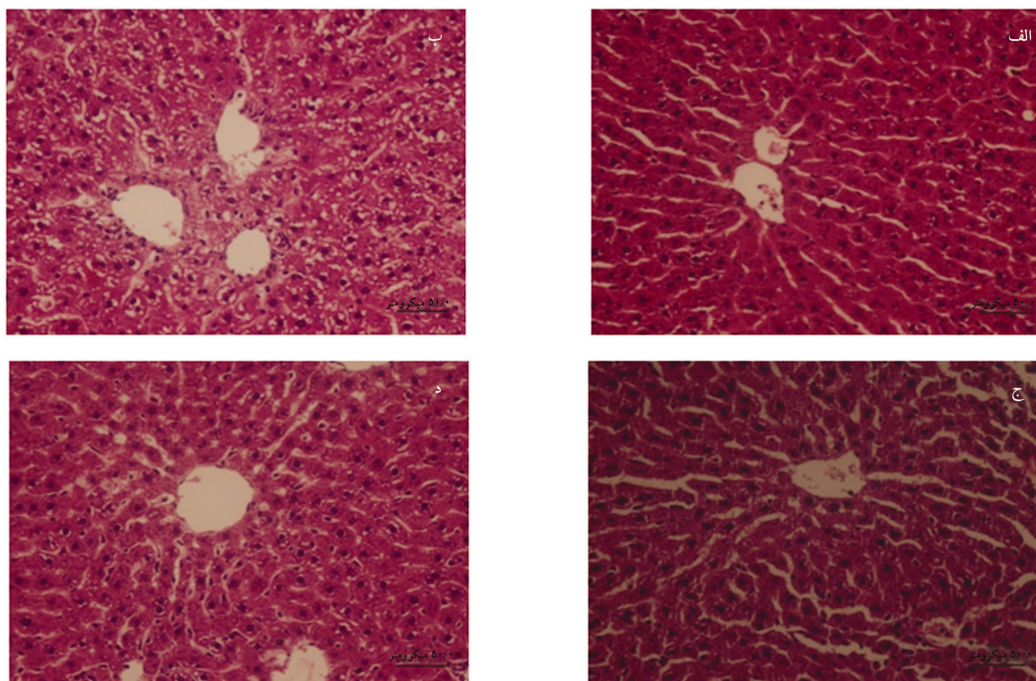
جدول ۱ اثر کروسیس بر پارامترهای آسیب کبدی و کلیوی در رت طبیعی

گروه‌ها	دز (میلی گرم بر کیلوگرم)	آلانین آمینوترانسفراز (واحد بین‌المللی بر لیتر)	آسپاراتات آمینوترانسفراز (واحد بین‌المللی بر لیتر)	آلکالین فسفاتاز (واحد بین‌المللی بر لیتر)	اوره (میلی گرم بر دسی لیتر)	اوریک اسید (میلی گرم بر دسی لیتر)	کراتینین (میلی گرم بر دسی لیتر)
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	۱/۸±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 به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

تغییر قابل توجه اعم از نکروز و غیره در بافت کبد گروه‌های تحت تیمار با کروسیس مشاهده نشد (شکل ۲).

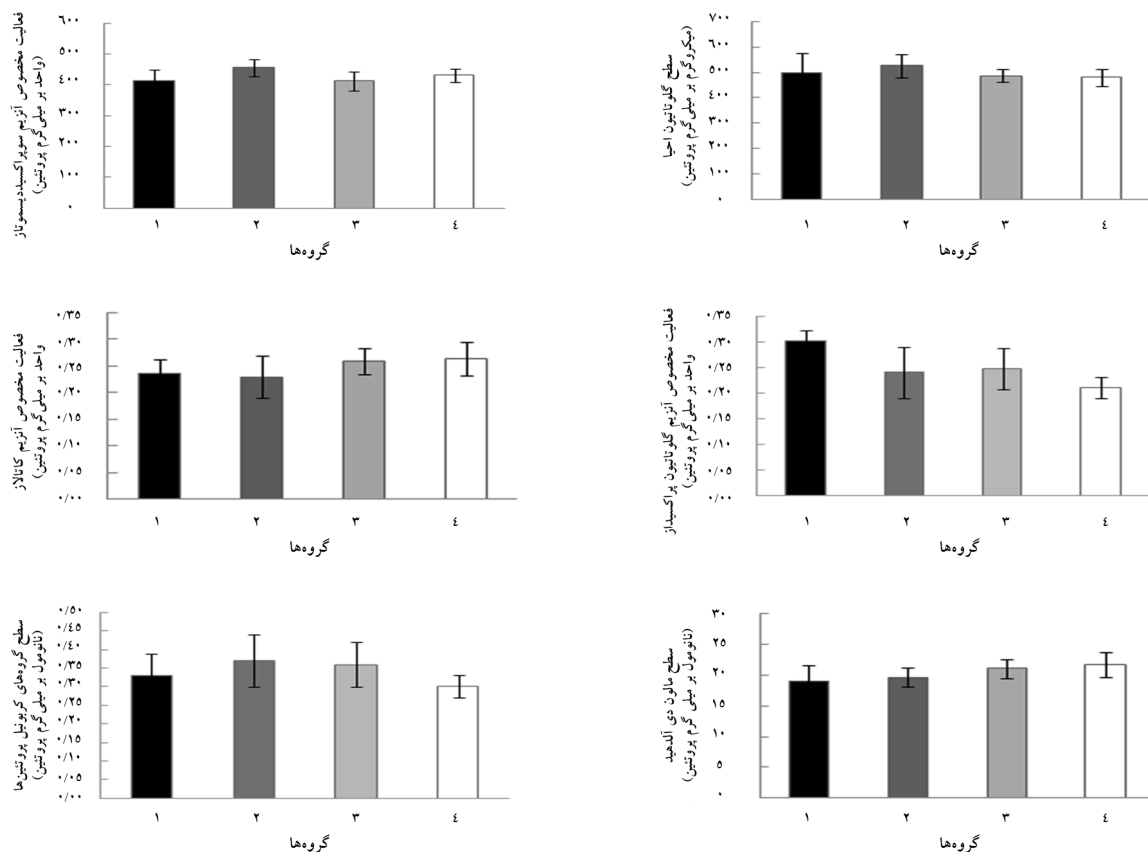
نتایج حاصل از بررسی بافت‌شناسی بافت کبد نشان داد که تمامی نمونه‌ها از نظر بافت‌شناسی کاملاً طبیعی بود و هیچ‌گونه



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

کربونیل پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز ایجاد نکرد و تنها دز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز شد ($P < 0/05$).

نتایج حاصل از سنجش پارامترهای بیوشیمیایی کبد (شکل ۳) نشان داد که دریافت دزهای مورد بررسی کروسین، تغییر معنی‌داری در میزان گلوکوتاتیون احیا، مالون دی‌آلدید و گروه‌های



شکل ۳ نتایج حاصل از سنجش پارامترهای بیوشیمیایی در کبد رت طبیعی؛ شماره ۱ نشان‌دهنده گروه کنترل و شماره‌های ۲، ۳ و ۴ به ترتیب نشان‌دهنده گروه‌هایی است که کروسین با دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرده‌اند. ستاره اختلاف معنی‌دار در سطح ($P < 0/05$) را نشان می‌دهد.

بحث

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود کروسین یک دی‌استر تشکیل شده از دی‌ساکارید جنتیوبیوز (Gentiobiose) و کربوکسیلیک اسید کروسستین (دی‌جنتیوبیوزیل ۸ و ۸'-دی آپوکاروتن-۸ و ۸'-اوات) است. این ماده یکی از مهم‌ترین کاروتنوئیدهای 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 [۲۶، ۲۷]. بارتون و اینگولد در سال ۱۹۸۴ بیان کردند که کاروتنوئیدهای ۴۰ کربنه تحت شرایطی ممکن است فعالیت پیش‌اکسیدانی داشته باشند [۳]. غلظت اکسیژن، غلظت مولکول کاروتنوئید و آثار متقابل سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدان، مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده قدرت آنتی‌اکسیدانی/پیش‌اکسیدانی یک کاروتنوئید است [۲۸]. دو مکانیسم برای فعالیت پیش‌اکسیدانی این کاروتنوئیدها پیشنهاد شده است [۲۹]:

می‌تواند باعث بیرنگ شدن حاد کبد شود. همچنین دزهای بالای ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به مدت ۲ هفته، آسیب کبدی و رنگدانه‌های سیاه ایجاد کرده، در صورتی که در دزهای پایین‌تر آثار قابل ملاحظه‌ای نداشته است. درحالی که استفاده طولانی مدت (۴ ماه) از ۱ درصد کروسین در رژیم رت‌ها، باعث اختلال جزئی در عملکرد کبد و رنگیزه‌دار شدن آن شده است. البته رنگدانه‌های سیاه و آسیب حاد کبدی به همراه بیرنگ شدن، کاملاً قابل جبران و بازگشت بوده است [۳۳]. اما نتایج هیستوپاتولوژی حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که کروسین با دزهای مورد استفاده هیچ تغییر قابل توجهی در بافت کبد ایجاد نمی‌کند که با نتایج هیستوپاتولوژیکی گزارش شده توسط حسین‌زاده و همکاران [۱۲] و گارسیا-اولمو و همکاران [۳۲] مطابقت دارد. نتایج گزارش شده توسط گارسیا-اولمو و همکاران و همچنین نتایجی که نشان دهنده آثار کروسین بر ایجاد رنگدانه‌ها در کبد است، به دلیل دز بسیار بالای مورد استفاده از این ماده در مدت بسیار طولانی است که بر اساس نظر ونگ و همکاران [۳۳] برگشت‌پذیر است؛ هر چند که با توجه به بررسی‌های محققان حاضر اساساً تجویز چنین دزهای بالایی به مدت طولانی برای آثار بهبودی بخش ضرورتی ندارد.

مطالعات زیادی درباره اثر کروسین بر عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی در حضور استرس اکسیداتیو صورت گرفته و نشان داده است که کروسین می‌تواند با جلوگیری از پراکسید شدن لیپیدها و پروتئین‌ها، ممانعت از کاهش مقدار گلوکاتایون و اصلاح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان یا به عبارت دیگر بالا بردن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، آثار ناشی از استرس اکسیداتیو ایجاد شده تحت شرایط مختلف را کاهش دهد و باعث بهبود وضعیت سلول برای مقابله با شرایط ایجاد شده شود [۳۴-۳۷]. همچنین مطالعات زیادی درباره اثر کاروتنوئیدهای ۴۰ کربنه محلول در چربی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سیستم آنتی‌اکسیدانی انجام گرفته است. برای مثال دیده شده است که کانتازانتین (Canthaxanthin) با دز

- کاروتنوئید با (Reactive Oxygen Species) ROS و (Reactive Nitrogen Species) RNS واکنش داده و محصولات پراکسیداتیو تولید می‌کند [۳۰].

- غلظت‌های بالای کاروتنوئید می‌تواند نفوذپذیری غشا را نسبت به رادیکال‌های آزاد و مواد سمی بالا ببرد.

به‌عنوان مثال دیده شده است که لیکوپن و بتاکاروتن در غلظت‌های بسیار پایین (۱-۳ میکرومولار) توانایی محافظت از آسیب به DNA در برابر صدمات اکسیداتیو را دارد؛ در صورتی که در غلظت‌های بالاتر (۴-۱۰ میکرومولار) این توانایی کاهش یافته و برعکس آسیب اکسیداتیو را افزایش می‌دهد [۳۱].

کروسین کاروتنوئید محلول در آب و ۲۰ کربنه است. دزهای کروسین که در این تحقیق بررسی شد، دزهایی است که به‌طور معمول در آزمایشگاه محققان حاضر و سایر محققین در موارد فوق مطالعه و آثار مفید آن‌ها نشان داده شده است. در این تحقیق مشاهده شد که دزهای کروسین مورد استفاده (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تغییر معنی‌داری در مقدار اوره، اوریک‌اسید، کراتینین، آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز سرم رت‌ها ایجاد نکرد. حسین‌زاده و همکاران دزهای ۱۵، ۴۵، ۹۰ و ۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین را روزانه به مدت ۲۱ روز به رت و موش طبیعی دادند و مشاهده کردند که دز ۱۵ و ۴۵ باعث کاهش ALP و دز ۱۸۰ باعث کراتینین شد ولی سایر پارامترها (اوره، ALT و AST) تغییر نکرد [۸]. همچنین گارسیو اولمو (Garcia-Olmo) و همکاران دز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین را هفته‌ای یک بار به مدت ۱۳ هفته به رت طبیعی دادند و با بررسی پارامترهای عملکرد کبد و کلیه مشاهده کردند که اوره، فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و آسپاراتات آمینوترانسفراز در رت‌های نر و کراتینین در رت‌های ماده افزایش یافت [۳۲].

ونگ (Wang) و همکاران گزارش کرده‌اند که دریافت خوراکی کروسین با دز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به مدت ۸ روز تغییری در عملکرد کبد در رت ایجاد نکرده است؛ اما

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 گلوکاتایون 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 گلوکاتایون 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.

۱۴ میکروگرم بر گرم به مدت ۱۵ روز در موش‌های Balb/c باعث کاهش فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز و افزایش فعالیت کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در بافت کبد [۳۸] و بتاکاروتن ۰/۰۲ درصد به مدت ۲ هفته در رژیم غذایی رت باعث افزایش فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز در بافت کبد می‌شود [۳۹]. در تحقیق حاضر کروسین با دزهای مورد استفاده تغییری در میزان گلوکاتایون احیا، مالون دی‌آلدید، 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 گلوکاتایون پراکسیداز شد. کاروتنوئیدهای مختلف می‌تواند تأثیرات متفاوتی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان داشته باشد. پاسخ متفاوت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به کاروتنوئیدهای مختلف ممکن است به دلیل نقش متفاوت آنزیم‌ها در فرآیند اکسیداتیو و همچنین جایگاه سلولی آن‌ها باشد. نکته مهم دیگر این است که خواص پیش‌اکسیدانی (Prooxidant) ذکر شده در بالا در کاروتنوئیدهای ۴۰ کربنه و محلول در چربی گزارش شده است، در حالی که کروسین یک کاروتنوئید ۲۰ کربنه و محلول در آب است. دز کاروتنوئید مصرفی و حضور همزمان استرس اکسیداتیو دو عامل مهم دیگری است که بر چگونگی تأثیر این کاروتنوئید بر فعالیت

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.

- [7] Frankel EN, Neff WE. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochimica 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, a constituent of *Crocus Sativus* L. (Saffron), in mice and rats. *Pharmacology Online* 2010; 2: 943-51.
- [13] Ashrafi M. Investigation on crocin, crocetin and picrocrocetin 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, Sadeghzadeh 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. PhD 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 Rezaei 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

- 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"

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.