

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

دکتر فرخ فرخی (PhD)^۱ - * شیمیا پدروپور واجارگاه (MSc)^۲

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

پست الکترونیک: Shima.Pedarpoor@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۵/۰۴/۲۹ تاریخ ارسال: ۹۵/۷/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۲۸

چکیده

مقدمه: پاراکوات به عنوان علف کش 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 رادیکال‌های آزاد حضور ترکیب‌های سودمند مانند زعفران به دلیل داشتن آثار آنتی اکسیدانی و از بین برنده رادیکال‌های 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 تجربی ۳۰ سر موش سوری نر به طور تصادفی به ۶ گروه ۵ تایی تقسیم شدند: گروه کنترل آب و غذای معمولی و ۵ml/روغن ذرت با گاوآذ دریافت کردند. گروه دوم و سوم به ترتیب پاراکوات با دوز ۲۰ mg/kg و ۴۰ mg/kg در روغن ذرت، گروه چهارم عصاره هیدرو الکلی زعفران با دوز ۸۰ mg/kg، گروه پنجم و ششم به ترتیب پاراکوات با دوز ۲۰ و ۴۰ mg/kg به همراه ۸۰ mg/kg زعفران دریافت کردند. تیمار تمام گروه‌ها به صورت گاوآذ بود. پس از ۳۰ روز تیمار و بیهوش کردن موش‌ها، خون‌گیری از قلب برای مطالعه متغیرهای سرمی انجام شد. سپس، کلیه را از بدن جدا کرده، نیمی از بافت کلیه برای سنجش اکسایشی و نیم دیگر برای مطالعه بافتی به فرمالین انتقال یافت. آنالیز داده‌ها با آزمون یک طرفه ANOVA و آزمایش تقییبی Tukey انجام شد. اختلاف در حد $P < 0.05$ معنی دار تلقی شد.

نتایج: تخریب لوله اپی تلیوم، ایجاد کانون التهاب، آتروفی گلوامرولی، افزایش معنی دار اورده وکراتینی و پراکسیداسیون لیپیدی در کلیه موش‌های تیمار شده با پاراکوات دیده شد. درحالی‌که در کلیه موش‌های تیمار شده با زعفران این شاخص‌ها بهبود یافته بود.

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

کلید واژه‌ها: پاراکوات/زعفران / کلیه/موش‌ها

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست و پنجم، شماره ۱۰۰، صفحات: ۴۷-۵۶

مقدمه

تماس و انتقال در طول گیاه شوند (۳ و ۲). 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 آبی را به خطر بیناندازد (۴). مکانیسم احتمالی سمیت پاراکوات در سیستم‌های بیولوژی

علف‌کش‌ها موادی هستند که آثار سوء زیادی بر روی 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

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

۲. دانشجوی ارشد بافت شناسی جنین شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران ۴۷

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 ۲۴-۳۰ 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 ۲۰-۲۵ 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 ۶ گروه ۵ تایی تقسیم‌بندی شدند: حیوانات گروه کنترل ۳۰ روز با آب و غذای معمولی و ۱/۵ ml روغن ذرت تیمار شدند. گروه دوم پاراکوات را با دز ۲۰ mg/kg، و گروه سوم که پاراکوات را با دوز ۴۰ mg/kg در ۱/۵ ml روغن ذرت حل شده بود، دریافت کردند. گروه چهارم عصاره ۱/۵ ml زعفران با دز ۸۰ mg/kg که در آب حل شده بود (۱۰)، گروه پنجم پاراکوات ۴۰ mg/kg را همراه با زعفران و گروه ششم با پاراکوات 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 گاوژ 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،

بوسیله Bus و Gibson بررسی شده‌است. واکنش احیا اکسیژن منفرد (Single Oxygen Resuscitation) باعث تخلیه NADPH سلولی و تولید آنیون سوپراکسید و ترکیبات اصلی می‌شود. آنیون سوپراکسید 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 گلوکوتاتیون پراکسیداز شده که این عمل نیز باعث افزایش مصرف گلوکوتاتیون می‌شود (۵). با توجه به عوارض سوء 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 (۶ و ۷).

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 پیکروکروسیین است. این ماده بر اثر تجزیه حرارتی یا آنزیمی به آلدیدی بنام سافرانال تبدیل می‌شود. کروسین‌ها مسئول رنگ زعفران محسوب می‌شوند. کاروتنوئیدهای دیگری مانند بتاکاروتن، لیکوپن و گرانترین و ویتامین‌ها به خصوص ریبوفلاوین و تیامین در زعفران یافت می‌شوند. کروسین، کروسیتین، سافرانال مواد موثره‌ی اصلی زعفران هستند که اثرات از بین برنده رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدانی داشته‌اند (۸). برخی از خواص زعفران به علت وجود کاروتنوئیدهاست 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

پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آب اکسیژنه، جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در پایان مقادیر بر حسب $U/\text{gr tissue}$ ($U=\mu\text{mol}$) 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 - Tripyridylrhiazine آبی رنگ از FeIII اکسید شده بی‌رنگ اندازه‌گیری 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 سانتریفیوژ گردید. از محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به لوله آزمایش منتقل گردید و ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP به آن اضافه شد و در بن‌ماری ۳۷ درجه به مدت ۷-۱۰ دقیقه انکوبه گردید. جذب کمپلکس آبی رنگ در ۵۹۳ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر خوانده شد. مقادیر بر حسب $\text{m mol /lit gr tissue}$ 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 شفاف‌سازی در گزبل و تهیه بلوک‌های پارافینی مقاطعی به قطر ۶ میکرون تهیه و بعد از رنگ‌آمیزی با هماوکسیلین-ئوزین با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

طرز تهیه عصاره هیدروالکلی زعفران: برای تهیه عصاره هیدروالکلی زعفران ۳ 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 قبلاً بوسیله الکل ضدعفونی شده بود، 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

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 پراکسیداسیون لیپیدها بر مبنای میزان تشکیل مالون دی‌آلدئید تعیین می‌شود. MDA محصول نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب است و با تیوباریتوری 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 تری‌کلرواستیک اسید 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 تیوباریتوریک 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 تیوباریتوریک اسید ظاهر و با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر در مقابل بلانک ارزیابی شد. میزان مالون‌دی‌آلدئید به کمک ضریب جذبی مالون‌دی‌آلدئید 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 سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعدی ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی سانتریفیوژ شده به ۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات اضافه گردید و

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 Tukey صورت گرفت. اختلاف در حد $P < 0.05$ معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

در بررسی آنزیم کاتالاز، میانگین سطح کاتالاز در گروه کنترل ($16/17 \pm 0/55 \mu \text{mol/gr tissue}$) 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 یافته بود (جدول ۱).

نتایج بدست آمده از آزمون فرپ (FRAP) نشان‌داد که، میانگین سطح فرپ در گروه کنترل ($15/90 \pm 2/18 \text{ mmol/lit/gr tissue}$) 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 تیمار شده با زعفران بیشترین مقدار و در موش‌های دریافت‌کننده همزمان زعفران و پاراکوات تا حدودی افزایش یافته بود (جدول ۱).

در سنجش میزان مالون‌دی‌آلدهید (MDA)، سطح MDA در گروه کنترل ($1/59 \pm 0/21 \text{ nmol/gr tissue}$) بدست آمد. نتایج نشان داد که مقدار MDA در موش‌های تیمار شده با پاراکوات، با دوزهای 40 mg/kg و 20 در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته در حالی که در موش‌هایی که، تواما زعفران و پاراکوات 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 (جدول ۱).

نتایج بدست آمده از سنجش اوره کلیه نشان داد که سطح اوره در گروه کنترل ($131/68 \pm 6/25 \text{ mg/dl}$) 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 دریافت‌کننده پاراکوات با دز 40 بود (جدول ۱).

در بررسی کراتینین کلیه مشاهده شد که سطح کراتینین در گروه کنترل، ($0/97 \pm 0/17 \text{ mg/dl}$) بوده است. مقدار کراتینین در تمامی گروه‌های آزمایش در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار یافته بود و بیشترین افزایش مربوط به گروه دریافت‌کننده پاراکوات با دز 40 می‌باشد (جدول ۱).

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

گروه آزمایش	کاتالاز ($\mu \text{mol/gr tissue}$)	فرپ (mmol/lit/gr)	مالون دی آلدئید (nmol/gr tissue)	اوره (mg/dl)	کراتینین (mg/dl)
کنترل	$16/17 \pm 0/55$	$15/90 \pm 2/18$	$1/59 \pm 0/21$	$131/68 \pm 6/25$	$0/97 \pm 0/17$
پاراکوات 40 mg	$10/50 \pm 7/07$	$11/88 \pm 3/70$	$1/71 \pm 6/13$	$166/04 \pm 453/06$	$1/82 \pm 15/97$
پاراکوات 20 mg	$14/34 \pm 6/82$	$10/29 \pm 4/50$	$1/29 \pm 4/58$	$182/24 \pm 1/30$	$1/82 \pm 10/97$
زعفران و پاراکوات 20 mg	$10/12 \pm 0/68$	$7/75 \pm 0/58$	$3/97 \pm 0/36$	$190/55 \pm 9/64$	$3/25 \pm 1/25$
زعفران و پاراکوات 40 mg	$8/39 \pm 0/14$	$5/02 \pm 0/25$	$0/79 \pm 0/39$	$232/05 \pm 16/14$	$6/25 \pm 2/21$
زعفران 80 mg	$12/67 \pm 0/84$	$12/82 \pm 0/69$	$1/96 \pm 0/16$	$146/54 \pm 19/22$	$1/37 \pm 0/47$

تمامی داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده‌اند

* معنی‌دار است $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل اختلاف در حد

معنی‌دار است $p < 0.05$ در مقایسه با گروه تیمار شده با زعفران و پاراکوات اختلاف در حد

در مقایسه با گروه تیمار شده با زعفران اختلاف در حد $p < 0.05$ معنی‌دار است

موش‌های دریافت‌کننده پاراکوات و زعفران توام، ساختار گلومرول طبیعی شده و کاهش کانون التهاب دیده شد هر چند که 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).

نتایج مطالعات بافتی کلیه، بر پایه‌ی بررسی مشاهده توسط میکروسکوپ 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

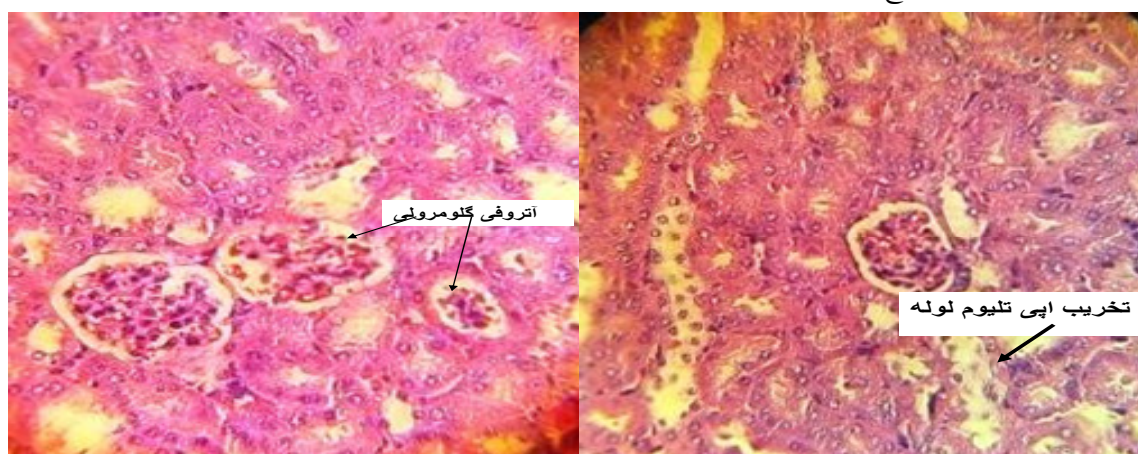
تصویر شماره ۱: مقطع عرضی از بافت کلیه با درشت‌نمایی ۱۰۰× و رنگ‌آمیزی H&E



اندازه گلومرول‌ها طبیعی شده، ولی همچنان تخریب نسبی در اپی‌تلیوم دیده می‌شد. تیمار موش‌ها با زعفران در موش‌های تیمار شده با پاراکوات ۴۰mg کانون التهاب و اتساع عروق دیده شد. در مقاطع بافت کلیه موش‌های تیمار شده با زعفران ۸۰ mg اتساع گلومرولی دیده شد و سایر ساختارها مشابه گروه کنترل بود.

در این تصاویر حضور سلول‌های لنفاوی و کانون التهاب، تخریب اپی‌تلیوم لوله‌های کلیوی در موش‌های تیمار شده با پاراکوات ۴۰mg ایجاد شده و در مقاطع بافت کلیه موش‌های تیمار شده با پاراکوات ۲۰mg تخریب اپی‌تلیوم و آتروفی گلومرول دیده می‌شود. تیمار موش‌ها با زعفران بهبودی نسبی در موش‌های تیمار شده با پاراکوات ۲۰ mg ایجاد شده و

تصویر شماره ۲: مقطع عرضی از بافت کلیه در گروه‌های آزمایش با درشت‌نمایی $\times 400$ و رنگ‌آمیزی H&E



مقطع عرضی از بافت کلیه در گروه تیمار شده با زعفران و پاراکوات ۲۰ mg



زعفران



کنترل

مقطع عرضی از بافت کلیه در گروه تیمار شده با پاراکوات ۴۰ mg با درشت‌نمایی ۴۰۰

بحث و نتیجه گیری

به طور کلی این پژوهش نشان داد که، پاراکوات موجب افزایش اوره و کراتینین و آتروفی گلو مروز و تخریب اپی تلیوم گردید. پاراکوات موجب ایجاد کانون التهاب شده. که طبق مطالعات صورت گرفته این التهاب بیانگر فعال شدن مکانیسم دفاعی بدن علیه تخریب می باشد (۱۲). مطالعات Akerman و همکاران (۲۰۰۳) ثابت می کند که تخلیه بدن از NADPH باعث افزایش تولید آنیون سوپر اکساید و ترکیبات مشابه مانند پراکسید هیدروژن و رادیکال های 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 اپی تلیوم و لوله دیده شد. در مکانیسم های سمیت پاراکوات تولید رادیکال آزاد اکسیژن درگیر است که آن هم منجر به استرس اکسیداتیو می شود و بین ساختار رادیکال آزاد اکسیژن و سیستم آنتی اکسیدانی تعادل برقرار نمی شود. واکنش رادیکال آزاد اکسیژن با اسیدهای چرب اشباع نشده، منجر به تولید متابولیت های سمی آلدئیدی مثل MDA که محصول نهایی لیپید پراکسیداسیون است، می شود (۱۴). در این تحقیق هم گروه های دریافت کننده پاراکوات مقدار MDA نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان می دهد. مطالعه بر روی ماهی در سال ۱۹۸۹ نشان داد که، کلیه، کبد، مغز و آبشش، ارگان های اصلی و قابل توجه هستند که تحت تأثیر انواع سموم قرار می گیرند. سموم روی لوله های کلیوی اثر دارند. چون در این بخش مکانیسم انتقال پیچیده وجود دارد که ممکن است برای انتقال سموم استفاده گردد و می تواند بوسیله سموم آسیب ببیند (۱۵). بسیاری از مواد شیمیایی یک عمل نفروتوکسی مستقیم روی لوله های پروگزیمال حلقوی دارند. حضور نکرز ممکن است مربوط به تخلیه ATP باشد که در نهایت منجر به مرگ سلول ها می شود (۱۵). نفروپاتی عملکرد فیزیولوژی را کاهش می دهد و در ساختار کلیه تغییر ایجاد می کند در نتیجه میزان اوره و کراتینین افزایش می یابد (۱۶). در این تحقیق افزایش میزان اوره و کراتینین نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. انسان ها از دیرباز به خواص درمانی گیاهان پی برد و بیماری خود را با آن درمان و سلامت خود را تامین می نمودند.

زعفران یکی از این گیاهان است. تاکنون فواید مواد آنتی اکسیدانی در پیشگیری از بیماری های قلبی تا کاهش آسیب مغز و چشم به اثبات رسیده است. علاوه بر این آنتی اکسیدان ها جلوی عمل رادیکال های آزاد را که موادی فعال و ویرانگر هستند، می گیرند و آنها را خنثی می کنند لذا تأمین ذخایر آنتی اکسیدان، به منظور کاهش آثار تنش اکسایشی امری مهم تلقی می شود (۱۷). ارزش کالاه خشک شده زعفران به علت وجود سه متابولیت ثانویه اصلی بنام کروسین- پیکروکروسین و سافرانال است. مطالعات نشان می دهد که زعفران بواسطه ترکیبات کاروتنوئیدی خود باعث تنظیم فعالیت پراکسیدازی لیپیدها- آنتی اکسیدان ها و سم زدایی می گردد (۹). مطالعات نشان می دهد که کروسین های زعفران با افزایش غیرمستقیم بیان mRNA انزیم گاماگلو تامل سیستئینیل سنتتاز (GCG-Y) میزان گلو تاتیون احیا شده درون سلول را افزایش می دهند که در تنظیم فعالیت پراکسیدازی لیپیدها و آنتی اکسیدان ها نقش موثری دارد. زعفران با تقویت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی موجب کاهش استرس های اکسیداتیو می گردد (۱۸) به همین دلیل گروه های دریافت کننده هم زمان پاراکوات و زعفران مقدار، FRAP و کاتالاز نسبت به گروه های دریافت کننده پاراکوات افزایش و مقدار MDA کاهش معنی داری را نشان می دهند. که احتمالاً عصاره آبی زعفران به عنوان عامل آنتی اکسیدان عمل کرده و از تولید رادیکال آزاد اکسیژن جلوگیری می کند. همچنین مقدار اوره و کراتینین هم در گروه های دریافت کننده زعفران نسبت به گروه های دریافت کننده پاراکوات کاهش معنی داری را نشان می دهند. همچنین در این تحقیق مشاهده شد که زعفران به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی خود سبب بهبود آسیب بافتی ناشی از مصرف پاراکوات گردید. تحقیقات مشخص کرده که کروسین موجود در زعفران به علت اثر آنتی اکسیدانی سلول های کبدی موش صحرایی را در برابر آسیب های اکسیداتیو محافظت کرده است (۱۹). کروسین یک فلاونوئید است که در انواع گیاهان یافت می شود و پتانسیل خوبی در جلوگیری از فیبروز کلیه دارد. کروسین طیف وسیعی از فعالیت های بیولوژیکی شامل: آنتی اکسیدان، ضد التهاب و ضد توموری دارد. با توجه به اثر مفید کروسین،

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 آنتی اکسیدانی نشان داد که، تجویز زعفران پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش و همزمان سطح آنتی اکسیدانهای آنزیمی هم چون سوپراکسید دیسموتاز کاتالاز و نیز آنتی اکسیدانهای غیر آنزیمی همچون گلوتاتیون احیا شده کبدی را افزایش می دهد (۲۲). در این تحقیق هم افزایش کاتاز و FRAP در موش های تیمار شده با زعفران مشاهده شد. در تحقیق، هم در موش های تیمار شده با زعفران اتساع گلو مریول دیده شد که احتمالا به واسطه افزایش جریان خون در گلو مریول است. به طور کلی این مطالعه نشان می دهد که پاراکوات به عنوان یک سم سبب آسیب و همچنین تخریب بافتی کلیه شده و زعفران به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی سبب بهبود آسیب های ناشی از سم پاراکوات می شود.

نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تضاد منافی ندارند.

در حفاظت در برابر فیروز کبد، ریه، پوست به طور قابل توجه ممکن است که کروسیتین موجب منع فعالیت فیروپلاستی و همچنین فیروز کلیه در موش های مبتلا به نفروپاتی انسدادی شود. مطالعات پیشین نشان می دهد که کروسیتین ممکن است مانع فعالیت فیروپلاست های کشت شده و همچنین بهبود فیروز اندام در کبد، ریه و پوست شود. بعضی از پلی فنول ها مانند کروسیتین می تواند مانع رشد سلول، آنژیوژنز و نشان دادن اثر ضد التهابی در رده های سلولی سرطان روده شوند. کروسیتین همچنین می تواند باعث کاهش سطح استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در کلیه موش هایی که دیابتی شده اند شود. علاوه بر این کروسیتین می تواند سبب بهبود هایپراوریسمی و تخریب عملکرد کلیه در موش هایی که تحت فشار التهاب ایجاد شده بوسیله استرپتوز هستند، گردد (۲۰). در تحقیق حاضر کاهش اوره و کراتینین در موش های تیمار شده با زعفران و همچنین بهبود آسیب های بافتی ناشی از پاراکوات مشاهده شد. ساfranال که یکی از اجزای اصلی زعفران است. دارای اثرات محافظتی بر روی

منابع

- Cooper RL, Kavlock RJ. Endocrine disruptors and reproductive development: a weight of evidence overview. *Journal of Endocrinology* 1997; 152:159-556.
- Grabenese 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.
- 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 Toxicology* 2006; 50:392-397.
- Bus JS, Aust SD, Gibson JE. Lipid peroxidation: a possible mechanism for paraquat toxicity. *Res. Commun. Chem Pathol Pharmacol* 1975; 11:31-38.
- Loliger J, Lambelet P, Aeschbach R, Prior E M. Natural antioxidants: from radical mechanisms food stabilization, in *Food Lipids and Health*. Min, D. B. (Eds) Marcel Dekker, Inc., pharmacology and Toxicology New York 1996; 315-344.
- Pokorny J. Stabilization of fats by phenolic antioxidants. *Can Inst Food Sci Technol* 1971; 4: 68-74.
- Kiyanbakht S. Systematic pharmacological review of saffron (*Crocus sativus* L.) and its compounds. *Medicinal plants* 2008; 7(28): 1-27. [Text in Persian]
- Sravani PV, Kishorebabu N, Gopal KVT, Raghu RRG. Determination of oxidative stress in vitiligo by measuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and non-vitiliginous skin. *Indian J Dermatol Venereal Leprol* 2009; 75(3). [Text in Persian]
- Mohajeri D, Mousavi G, Mesgari M. Subacute toxicity of crocus sativus L. (Saffron) stigma ethanolic extract in rats. *American Journal of pharmacology and Toxicology* 2007; 2(4), 189-193
- Hosseinzadeh H, Sadeghnia RH. Safranin, a constituent of crocus sativus, attenuated cerebral ischemia induced oxidative damage in rat hippocampus. *Pharm pharmacol* 2005; 8(3):394-399.
- Okolie N P, Osagie A U. Liver and kidney lesion and associated enzyme changes induced in rabbits by chronic cyanide exposure. *Food and Chemical Toxicology* 1999; 37(7): 745-750.
- Akerman GA, Amcoff P, Tgarnlund U, Fogelberg K, Torrisen O, Balk L. Paraquat and menadione exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) - Studies of effects on the pentose-phosphate shunt and thiamine levels in liver and kidney. *Chemico-Biological Interactions* 2003; 142:269-283.
- Sanhita R, Amab S, Amitabha R. Effect of paraquat on anti-oxidant system in rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 2007; 43:432-438.

15. Tisher C C, Brenner B M. Renal pathology with 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 Pract* 2008; 13: 46-53.
17. Zurovsky Y, Haber C. Antioxidants attenuate endotoxin generation induced acute renal failure in rats. *Scand J Urol Nephrol* 1995; 29: 147-154.
18. Takashi O, Shinji S, et al. Crocin prevent the death of PC-12 cells through sphingosine myelinase ceramide signaling by increasing glutathione synthesis. *Neurochemistry International* 2004; 44: 321-330.
19. Wang CJ, Shiow SJ, Lin JK. Effects of crocetin on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B1 in rats. *Carcinogenesis* 1991; 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 (*Crocus sativus* 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

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 measurement 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 science student, Faculty of Science, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran