مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۱، شماره ۴، زمستان ۹۰، صفحات ۲۵۱ تا ۲۶۱

Original Article

اثرات حفاظتی عصاره الکلی کلاله زعفران در مقابل سمیّت کبدی سیسپلاتین در موش صحرایی

داریوش مهاجری[۱]، یوسف دوستار[۲]

[۱] دانشیار پاتولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز
[۲] استادیار پاتولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز

چکیده

سابقه و هدف: *سیسپلاتین به‌عنوان یک داروی ضدسرطانی مهم، برای کبد به شدت سمّی می‌باشد. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات محافظتی عصاره الکلی کلاله زعفران در برابر سمیّت کبدی سیسپلاتین در موش‌صحرایی می‌باشد.*

روش بررسی: *۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار به‌طور تصادفی در پنج گروه هشت‌تایی، شامل ۱- شاهد سالم، ۲-شاهد مسموم ۳- شاهد مثبت، ۴ و ۵-تیمار با عصاره، توزیع گردیدند. سیسپلاتین (۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) روزانه و به مدت ۸ هفته به‌صورت داخل صفاقی به گروه‌های ۲ تا ۵ تزریق شد. هم‌زمان، به گروه‌های ۱ و ۲ نرمال سالین (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم)، به گروه ۳ سیلیمارین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و به گروه‌های ۴ و ۵، عصاره الکلی کلاله زعفران (به ترتیب ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) گاواژ گردید. در پایان، سطح سرمی شاخص‌های آسیب کبد و عملکرد آنتی‌اکسیدان‌ها در هموژنات بافت کبد موش‌ها مورد سنجش قرار گرفت. آسیب‌شناسی بافتی نیز جهت ارزیابی درجات مختلف آسیب کبد انجام شد.*

یافته‌ها: *در موش‌های دریافت کننده سیسپلاتین، عصاره الکلی کلاله زعفران و سیلیمارین، به‌طور معنی‌داری میزان آنزیم‌های شاخص عملکرد کبد و بیلی‌روبین تام را کاهش و سطوح آلبومین و پروتئین تام سرم را افزایش دادند. در این موش‌ها، عصاره و سیلیمارین به طور معنی‌داری میزان پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش و سطوح آنتی‌اکسیدان‌ها را به صورت وابسته به دوز افزایش دادند. در آسیب‌شناسی بافتی، سیلیمارین و عصاره الکلی کلاله زعفران، آسیب کبدی ناشی از سیسپلاتین را بهبود بخشیدند، به‌طوری که تغییرات بافتی در توافق با یافته‌های بیوشیمیایی بودند.*

نتیجه‌گیری: *عصاره کلاله زعفران احتمالاً با خواص آنتی‌اکسیدانی خود، کبد موش‌های صحرایی را در برابر اثرات توکسیک سیسپلاتین محافظت می‌کند.*

واژگان کلیدی: *زعفران، سیسپلاتین، سمیّت کبدی، آنتی‌اکسیدان، موش صحرایی.*

مقدمه

سیسپلاتین یکی از مهم‌ترین داروهای ضدسرطان است که به‌وفور برای درمان انواع مختلف سرطان‌ها به‌کار برده می‌شود. این دارو دارای خاصیت قوی ضدسرطانی علیه طیف وسیعی از بدخیمی‌ها از جمله سرطان‌های تخمدان، بیضه، ناحیه گردن، مثانه، ریه و همچنین سایر تومورهای مقاوم به رژیم‌های درمانی ضدسرطان می‌باشد (۱). با وجود اثرات مفید بالینی سیسپلاتین در درمان سرطان، این دارو دارای اثرات جانبی توکسیک متعددی نظیر اثرات نفروتوکسیک (Nephrotoxic)، نوروتوکسیک (Neurotoxic) و توکسیک سیستم شنوایی (Ototoxic) می‌باشد (۲). اثرات توکسیک کلیوی سیسپلاتین بسیار جدّی بوده و استفاده از آن را محدود به دز می‌نماید،

آدرس نویسنده مسئول: تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، بخش آسیب شناسی، دکتر داریوش مهاجری (**email**: daryoushmohajeri@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۹/۳۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۰/۳/۳۱

به‌طوری‌که در استفاده از دزهای بالا، آب‌درمانی و تجویز توام داروهای مدرّ برای کاهش اثرات توکسیک کلیوی آن، توصیه می‌گردد (۳). در پروتکل‌های درمانی حمله‌ای (Aggressive)، که دزهای بالای سیسپلاتین جهت مهار تومور مورد استفاده قرار می‌گیرد، اثرات توکسیک کبدی دارو نیز بروز می‌کند (۴). لازم به ذکر است زمانی‌که دزهای پائین دارو به طور مکرّر مورد استفاده قرار می‌گیرد، اثرات توکسیک کبدی همچنان بروز می‌کند (۵). سمیّت کبدی سیسپلاتین کمتر مورد توجه قرار گرفته و اطلاعات اندکی در مورد مکانیسم‌های زمینه‌ساز این آسیب در دسترس می‌باشد. گزارش گردیده است که استرس‌های اکسیداتیو از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species; ROS) (۶)، کاهش عملکرد سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (۷) و مولکول غیرآنزیمی گلوتاتیون احیاء (Non-enzymatic molecule reduced glutathione; GSH) در سمیّت سیسپلاتین رخ می‌دهند (۸). همچنین اختلال در ساختار و عملکرد میتوکندری، وقوع آپوپتوز، آشفتگی در هومئوستاز کلسیم (۹) و درگیری ژن‌های پیش‌آماسی نظیر COX-2 (Cyclo-oxygenase-2) و iNOS (inducible Nitric Oxide Synthetase) ممکن است نقشی اساسی را در مکانیسم سمیّت کبدی سیسپلاتین داشته باشند (۱۰).

با توجه به اثرات متعدد توکسیک سیسپلاتین، جستجو برای یافتن دارویی مفید در جهت پیش‌گیری از سمیّت آن ارزشمند بوده و تلاش برای یافتن هر فرآورده طبیعی در این زمینه از اهمیت بالینی ویژه‌ای برخوردار است. تحقیقات زیادی با مواد و ترکیبات مختلف در راستای جلوگیری از اثرات توکسیک کبدی سیسپلاتین انجام شده است. متاسفانه نکته مهم این است که بعضی از ترکیباتی که به‌عنوان کموپروتکتور (Chemoprotector) جهت کاهش اثرات سوء و توکسیک سیسپلاتین در پروتکل‌های درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند، باعث کاهش اثرات ضد سرطانی آن می‌گردند و برخی دیگر به‌طور کامل اثرات توکسیک این دارو را برطرف نمی‌کنند (۱۱). مواد بیولوژیک با منشأ گیاهی به علت سهولت دسترسی، کاهش عوارض جانبی و قیمت مناسب، به عنوان جایگزین‌های شایسته داروهای صناعی، همواره مورد بحث بوده و از چند دهه اخیر به‌طور خاص مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند.

زعفران به‌عنوان گرانترین چاشنی در جهان، متعلق به خانواده زنبق (Iridaceous) بوده و به‌طور گسترده‌ای در ایران، هندوستان و یونان کشت داده می‌شود. به‌عنوان یک گیاه دارویی، زعفران برای درمان اختلالات معدی و سوء هاضمه و همچنین افزایش اشتهاء و ضد اسپاسم کاربرد دارد. گزارش شده است که زعفران دارای اثرات کاهش چربی خون، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان، زداینـدگی (Scavengering) رادیکال‌های آزاد و ضد سرطان نیز می‌باشد. همچنین از زعفران برای درمان اختلالات عصبی و آسم نیز استفاده می‌شود (۱۴-۱۲). عصاره آبی زعفران و کروسین در پیش‌گیری از آسیب اکسیداتیو ناشی از ایسکمی برقراری مجدد خون (Ischemia-reperfusion) در موش‌های صحرایی، مفید می‌باشند (۱۵). Goyal و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داده‌اند که کروسین موجود در زعفران، قلب موش‌های صحرایی را در برابر اثرات توکسیک ایزوپروترنول (Isoproterenol) از طریق تعدیل تنش‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند (۱۶). تحقیقات نشان داده است که عصاره زعفران هپاتوسیت‌های اولیه را نیز در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند. همچنین مشخص شده است که زعفران سمیّت آفلاتوکسین ب۱ (Aflatoxin B1) را تعدیل کرده و ضایعات کبدی ناشی از آن‌را کاهش می‌دهد (۱۷). ثابت شده است که عصاره زعفران، مثانه را در برابر سمیّت داروی ضدسرطانی سیکلوفسفامید بدون تغییر در اثرات ضدتوموری آن محافظت می‌کند (۱۸). بررسی‌ها نشان داده است که عصاره زعفران همراه با سیستئین اثرات جانبی نفروتوکسیک سیسپلاتین را نیز کاهش می‌دهد (۱۹). عصاره کلاله زعفران طول عمر موش‌هایی را که با سیسپلاتین درمان شده بودند افزایش داده و تا حدودی از کاهش وزن، کاهش تعداد لکوسیت‌ها و هموگلوبین جلوگیری کرده است (۲۰،۲۱). همچنین پیش‌درمانی با عصاره آبی زعفران در موش‌های سفید سوئیسی (Swiss albino mice) مانع از بروز اثرات ژنوتوکسیک سیسپلاتین، سیکلوفسفامید (Cyclophosphamide)، میتومایسین (Mitomycin) و یورِتان (Urethane) شده است (۲۲). در هر صورت، با بررسی منابع، مطالعه‌ای در رابطه با اثرات محافظتی زعفران در برابر سمیّت کبدی سیسپلاتین یافت نشد.

با توجه به مجموعه فوق‌الذّکر و با در نظر گرفتن خواص مستند آنتی‌اکسیدانی زعفران، به‌خصوص جزء فعال فارماکولوژیک آن یعنی کروسین (۲۳)، فرض بر این است که زعفران می‌تواند کبد را در برابر اثرات اکسیداتیو سمّی سیسپلاتین محافظت کند. بنابراین، مطالعه حاضر برای اولین بار برای ارزیابی اثرات محافظتی عصاره الکلی کلاله زعفران در برابر سمیّت کبدی سیسپلاتین در موش صحرایی، در مقایسه با داروی سیلیمارین (Silymarin) به‌عنوان عاملی استاندارد با

منشا گیاهی در زمینه حفاظت از کبد در برابر عوامل توکسیک (۲۴)، طراحی و اجرا گردید.

مواد و روشها

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی در سال ۱۳۸۹، در مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام گرفت و کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تائید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی این مرکز بود. برای انجام تحقیق، تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۰±۲۰۰ گرم و سن ۱۰ هفته که از محل پرورش و نگه‌داری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند، به طور تصادفی در ۵ گروه ۸ سَری شامل گروه‌های ۱- شاهد سالم، ۲- شاهد مسموم (Toxicant Control)، ۳-شاهد مثبت (Positive Control)، ۴- تیمار با دز پائین عصاره (میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ۵-تیمار با دز بالای عصاره (میلی‌گرم بر کیلوگرم) توزیع گردیدند. شرایط نگه‌داری برای تمام گروه‌ها یکسان و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای ۲±۲۱ درجه سانتی‌گراد در قفس‌های مخصوص و در بستری از پوشال در نظر گرفته شد. جیره غذایی و آب نیز به‌طور آزاد در دسترس قرار گرفت. پس از یک هفته عادت به وضعیت جدید، مطالعه روی موش‌ها انجام گردید. زعفران مورد استفاده در این مطالعه از شرکت نوین زعفران (مشهد، ایران) تهیه گردید. برای تهیه عصاره، ابتدا کلاله زعفران توسط آسیاب مکانیکی کاملاً پودر گردید. سپس به کمک حلال اتانولی اقدام به عصاره‌گیری به‌روش ماسراسیون (Maceration) گردید. در این روشِ عصاره‌گیری، ۱۰ گرم پودر کلاله زعفران در ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درجه به مدت ۳ روز خیسانده شد. پس از صاف کردن محلول به‌دست آمده با صافی، عصاره‌های حاصله توسط دستگاه روتاری اواپوراتور تحت خلأ و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک گردید. عصاره خشک شده تا زمان استفاده در یخچال و در دمای زیر صفر درجه نگه‌داری شد (۲۵).

برای ایجاد آسیب کبدی، سیسپلاتین (Dabur India Ltd., dissolved in 0.9% saline) به‌میزان ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه و به مدت ۸ هفته به صورت داخل صفاقی به گروه‌های ۲ تا ۵ تزریق شد (۵). گروه ۱ (شاهد سالم) و گروه ۲ (شاهد مسموم) نرمال سالین را به میزان ۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم، گروه ۳ (شاهد مثبت)، سیلیمارین (Silymarin) را به‌عنوان رفرانس به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در ۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم سالین نرمال و گروه‌های ۴ و ۵ (تیمار با عصاره)، عصاره الکلی کلاله زعفران را به‌ترتیب با دزهای ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در ۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم سالین نرمال از طریق گاواژ (Gavage)، هم‌زمان و به‌مدت ۸ هفته دریافت کردند.

در پایان دوره آزمایش و ۲۴ ساعت پس از آخرین تیمار، برای اندازه‌گیری برخی فاکتورهای بیوشیمیایی شاخص عملکرد کبد، شامل آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) (۲۶) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) (۲۷) و آلبومین، پروتئین تام (۲۸) و بیلی‌روبین تام (۲۹)، نمونه خون از سینوس پشت کره چشم (Retro-orbital plexus) اخذ گردید. سرم نمونه‌های خون توسط سانتریفیوژ با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد جدا شد. هم‌زمان همه موش‌ها با ایجاد دررفتگی در مهره های گردن راحت‌کُشی شدند. کبد موش‌ها سریعاً خارج و قسمتی از آن در سالین بسیار سرد شستشو و هموژنات ۱۰ درصد در ۱/۱۵ درصد (w/v) کلرور پتاسیم تهیه گردید. هموژنات با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و محلول شناور جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی از طریق اندازه گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde) و گلوتاتیون احیاء (Reduced Glutathion; GSH) و همچنین برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase)، کاتالاز (Catalase)، گلوتاتیون پرکسیداز (Glutathione peroxidase) و گلوتاتیون ردوکتاز (Glutathione reductase) مورد استفاده قرار گرفت. مالون‌دی‌آلدئید، به عنوان مقیاسی از پراکسیداسیون چربی، در قالب TBARS (Thiobarbituric acid reacting substances) و با استفاده از روش Esterbauer و Cheesman مورد سنجش قرار گرفت و مقدار TBARS به صورت نانومول در میلی‌گرم پروتئین بیان گردید (۳۰). فعالیت سوپراکسید دیسموتاز توسط روش Nishikimi (۳۱) مورد سنجش و توسط روش Kakkar (۳۲) نیز تعدیل گردید. هر واحد از فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به صورت غلظت آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از تولید رنگ تا ۵۰ درصد در ۱ دقیقه، تحت شرایط مطالعه، تعیین گردید. فعالیت کاتالاز توسط روش Claiborne (۳۳) و براساس تجزیه پراکسید هیدروژن در ۲۴۰nm، به شکل "فعالیت کاتالاز در دقیقه" محاسبه گردید. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از روش Rotruck و همکاران (۳۴) و بر اساس واکنش:

جدول ۱- تاثیر عصاره الکلی کلاله زعفران و سیلیمارین بر پارامترهای بیوشیمیایی سرم موش صحرایی در آسیب کبدی ناشی از سیسپلاتین

گروه تیمار	پارامترهای بیوشیمیایی					
	آلانین آمینو ترانسفراز (U/L)	آسپارتات آمینوترانسفراز (U/L)	لاکتات دهیدروژناز (U/L)	بیلی‌روبین تام سرم (mg/dl)	آلبومین (g/dl)	پروتئین تام سرم (g/dl)
۱ سالین نرمال	۵۴/۸۲±۲/۳۶^{bd}	۶۸/۹۰±۱/۷۱^{bd}	۶۸۵/۸۷±۲۸/۷۲^{bd}	۰/۸۱±۰/۰۳^{bd}	۴/۳۸±۰/۴۲^{bd}	۸/۲۸±۰/۵۸^{bd}
۲ سیسپلاتین	۷۶/۴۵±۳/۶۵^{acde}	۱۰۱/۱۹±۳/۸۶^{acde}	۱۰۸۳/۶۰±۳۱/۵۵^{acde}	۱/۴۴±۰/۰۸^{acde}	۲/۸۷±۰/۳۰^{ace}	۵/۱۵±۰/۴۸^{ace}
۳ سیسپلاتین+ سیلیمارین	۵۵/۹۰±۲/۴۷^{b}	۶۸/۲۱±۱/۳۴^{b}	۷۱۱/۸۲±۳۳/۲۸^{b}	۰/۸۷±۰/۰۶^{b}	۴/۳۲±۰/۳۶^{b}	۷/۲۶±۰/۴۷^{b}
۴ سیسپلاتین+ عصاره (۴۰ mg/kg)	۶۲/۵۶±۲/۹۵^{ab}	۷۸/۳۰±۲/۶۱^{ab}	۷۳۵/۷۲±۳۵/۲۲^{ab}	۱/۰۶±۰/۰۵^{ab}	۳/۷۳±۰/۲۹^{ab}	۶/۱۶±۰/۴۳^{ab}
۵ سیسپلاتین+ عصاره (۸۰ mg/kg)	۵۶/۳۰±۲/۶۴^{b}	۶۹/۹۱±۲/۱۵^{b}	۷۱۶/۸۴±۲۶/۵۰^{b}	۰/۸۵±۰/۴۰^{b}	۴/۳۱±۰/۳۴^{b}	۷/۲۱±۰/۵۲^{b}
نتیجه آزمون آنالیز واریانس یکطرفه	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار برای ۸ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است. a: اختلاف معنی‌دار با گروه ۱، b: اختلاف معنی‌دار با گروه ۲، c: اختلاف معنی‌دار با گروه ۳، d: اختلاف معنی‌دار با گروه ۴، e: اختلاف معنی‌دار با گروه ۵ ($p<۰/۰۵$).

$H2O2 + 2GSH$(گلوتاتیون احیاء)$\rightarrow 2H2O + GSSG$ (گلوتاتیون اکسید)

مورد سنجش قرار گرفت و به صورت میکرومول گلوتاتیون اکسید/دقیقه/میلی گرم پروتئین بیان گردید.

فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز با استفاده از روش Mohandas و همکاران (۳۵) بر اساس واکنش:

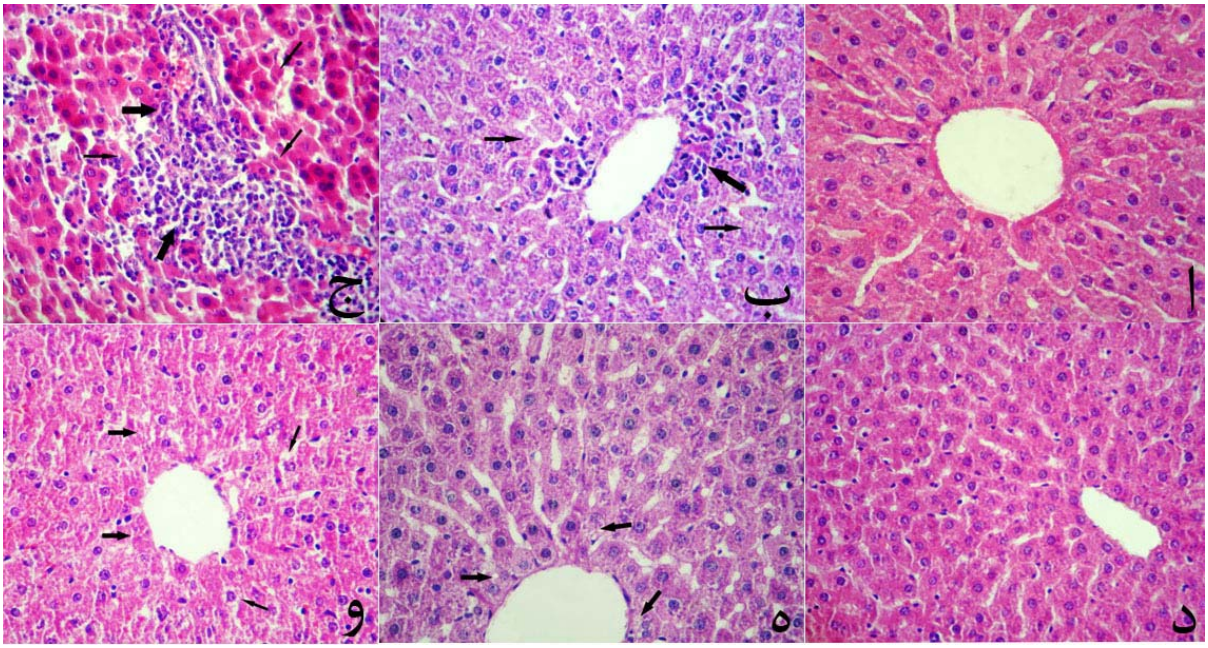
$$NADPH + H^+ + GSSG \rightarrow NADP^+ + 2GSH$$

محاسبه گردید. گلوتاتیون توسط روش Sedlak و Lindsay (۳۶) با اسپکتروفتومتر و شدت جذب در ۴۰۵ nm (نانومتر) اندازه‌گیری شد.

قسمت باقی‌مانده کبد موش‌ها جهت پایدارسازی در فرمالین بافری ۱۰ درصد قرار داده شدند. از سمت دیافراگماتیک لوب چپ نمونه‌های کبدی فوق با استفاده از شیوه‌های رایج پاساژ بافت و تهیه مقاطع آسیب‌شناسی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون و با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین تهیه شد (۳۷). بررسی مقاطع آسیب‌شناسی توسط یک مقیاس نیمه کمّی (Semiquantitative scale) و به‌صورت دوسو کور جهت ارزیابی آسیب انجام شد. تغییرات هیستوپاتولوژی مورد مشاهده بر اساس شدت ضایعه، از صفر تا ۳ (صفر: حالت طبیعی، ۱: دژنرسانس هیدروپیک خفیف، عدم پرولیفراسیون سلول‌های کوپفر و عدم نکروز، ۲: دژنرسانس هیدروپیک متوسط، پرولیفراسیون سلول‌های کوپفر و عدم نکروز یا نکروز جزئی، ۳: دژنرسانس هیدروپیک شدید، پرولیفراسیون سلول‌های کوپفر و نکروز) رتبه‌بندی شد (۳۸). کلیه درجه‌بندی‌ها با بزرگنمایی ۱۰۰× و در ۵ میدان میکروسکوپی از هر برش، به‌طور تصادفی، با میکروسکوپ نوری مدل نیکون (ECLIPSE E200، ساخت کشور ژاپن) انجام گردید.

برای تعیین سمّیت حادّ عصاره به‌دست آمده، ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم و سن ۱۰ هفته در ۶ گروه چهارتایی توزیع گردید و عصاره الکلی زعفران با دزهای ۵، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلو گرم وزن بدن و به شکل محلول در سالین نرمال (۱۰ml/kg) به صورت خوراکی به موش‌ها خورانده شد. سپس موش‌ها به مدت ۶ ساعت به فواصل یک ساعته و بالاخره در پایان ۲۴ ساعت از لحاظ رفتارهای ظاهری، علایم عصبی، میزان مصرف غذا، وضعیت مدفوع و ادرار و مرگ تحت نظر بودند. تعداد مرگ و میر بعد از ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد.

برای تحلیل داده‌ها از بسته نرم‌افزاری SPSS-13 استفاده شد. داده‌های به‌دست آمده کمّی به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون آماری



شکل ۱- نمای ریزبینی از کبد موش‌های صحرایی مورد آزمایش (هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ۴۰۰×). (الف) نمای ریزبینی از کبد گروه شاهد سالم که ساختار آن طبیعی است. (ب) - نمای ریزبینی از کبد گروه تیمار با سیسپلاتین که در آن نکروز هپاتوسیت‌ها (پیکان‌های نازک) توام با پرولیفراسیون سلول‌های کوپفر و ارتشاح تک هسته‌ای‌ها (پیکان ضخیم) در اطراف وریدچه مرکزی مشخص می‌باشد. (ج) نمای ریزبینی دیگر از کبد گروه تیمار با سیسپلاتین که پرخونی (پیکان نازک) و ارتشاح تک هسته‌ای‌ها (پیکان ضخیم) در فضای پورتال آن دیده می‌شود. (د) نمای ریزبینی از کبد گروه شاهد مثبت که بافت آن نسبتاً سالم به‌نظر رسیده و تغییر پاتولوژیک خاصی ندارد. (هـ) نمای ریزبینی از کبد گروه تیمار با سیسپلاتین و دز بالای عصاره الکلی کلاله زعفران که دژنرسانس هیدروپیک خفیفی (پیکان‌ها) در اطراف وریدچه مرکزی دیده می‌شود. (و) نمای ریزبینی از گروه تیمار با سیسپلاتین و دز پائین عصاره الکلی کلاله زعفران که دژنرسانس هیدروپیک (پیکان‌های نازک) و نکروز هپاتوسیت‌ها (پیکان‌های ضخیم) با شدت کمتر در اطراف وریدچه مرکزی مشاهده می‌شود.

آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) مورد بررسی قرار گرفت. آزمون همگنی واریانس‌ها در مورد داده‌های هیستوپاتولوژی اختلاف معنی‌داری را نشان داد، لذا آزمون ناپارامتری کروسکال والیس (Kruskal-Wallis) و سپس آزمون یو من-ویتنی (Mann-Whitney U Test) برای ارزیابی مقایسه‌ای دو به دو، جهت مقایسه نتایج درجه‌بندی شده هیستوپاتولوژی مورد استفاده قرار گرفت. اختلافات در سطح $p<0/05$ معنی‌دار تلقی شدند.

یافته‌ها

در مرحله تعیین سمّیت حاد عصاره الکلی کلاله زعفران، با مصرف خوراکی دوزهای مختلف (۵، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) عصاره هیچ گونه اثر توکسیک و یا مرگی در موش‌های صحرایی مشاهده نشد.

در موش‌های گروه ۲، سیسپلاتین سطوح سرمی آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز و بیلی‌روبین تام سرم را در مقایسه با گروه ۱ (شاهد سالم)، به‌طور معنی‌داری ($p<0/001$) افزایش و میزان پروتئین تام و آلبومین سرم را به‌طور معنی‌داری ($p<0/001$) کاهش داد. در گروه ۳ (شاهد مثبت)، سیلیمارین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و در گروه ۵، دز بالای عصاره الکلی کلاله زعفران (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، سطوح سرمی افزایش یافته آنزیم‌های شاخص آسیب کبد و بیلی‌روبین تام سرم در اثر سیسپلاتین را به‌طور معنی‌دار ($p<0/001$) و تا حدّ طبیعی کاهش و مقادیر کاهش یافته پروتئین تام و آلبومین سرم در اثر سیسپلاتین را به‌طور معنی‌دار ($p<0/001$) و تا سطوح طبیعی خود (۳۹) افزایش دادند. در گروه ۴ نیز دز پائین عصاره (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) مقادیر افزایش یافته آنزیم‌های شاخص آسیب کبد و بیلی‌روبین تام سرم در اثر سیسپلاتین را به‌طور معنی‌داری ($p<0/05$) کاهش و مقادیر کاهش یافته پروتئین تام و آلبومین سرم را به‌طور معنی‌داری ($p<0/05$) افزایش داد، هرچند که به حدّ طبیعی خود نرسیدند. (جدول ۱).

در گروه ۲، سیسپلاتین مقادیر گلوتاتیون احیاء و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز را در مقایسه با گروه شاهد سالم، به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) کاهش و میزان مالون‌دی‌آلدئید را به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) افزایش داد. در گروه ۳، سیلیمارین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و در گروه ۵ دز بالای عصاره الکلی کلاله زعفران (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، مقادیر گلوتاتیون احیاء و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی فوق را که در اثر سیسپلاتین کاهش یافته بود، به طور معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) و تا حد طبیعی خود افزایش دادند. تغییرات فوق در گروه ۴ با دز پائین عصاره الکلی کلاله زعفران (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نیز معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بود، اما این میزان مصرف عصاره نتوانست مقادیر گلوتاتیون احیاء و آنزیم‌های مذکور را تا حد طبیعی خود افزایش دهد. در گروه ۵، دز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره و در گروه ۳، سیلیمارین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) مقدار افزایش‌یافته مالون‌دی‌آلدئید در اثر سیسپلاتین را به‌طور معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) و تا حد طبیعی خود کاهش دادند. میزان مصرف ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره الکلی کلاله زعفران نتوانست کاهش معنی‌داری را در مقدار افزایش یافته مالون‌دی‌آلدئید ایجاد کند (جدول ۲).

تغییرات آسیب‌شناسی بافتی تمامی گروه‌ها در جدول ۳، درجه‌بندی و مقایسه گردیده است. در مشاهدات ریزبینی بافت کبد موش‌های گروه ۱ (شاهد سالم) ساختار بافت کبد سالم و طبیعی بود (شکل ۱-الف). در نمونه‌های بافتی کبد موش‌های گروه ۲ (سیسپلاتین)، تغییرات دژنراتیو متوسط تا شدید در نواحی مرکز لوبولی که تا نواحی پورتال نیز کشیده شده بود، مشاهده گردید. در موارد شدید، نکروز سلول‌های کبدی در اطراف وریدچه مرکزی نیز مشاهده گردید. افزایش منتشر سلول‌های کوپفر همراه با ارتشاح تک‌هسته‌ای‌ها در اطراف وریدچه‌های مرکزی و برخی فضاهای پورتال و پرخونی

جدول ۲- تاثیر عصاره الکلی کلاله زعفران و سیلیمارین بر فعالیت آنتی اکسیداتیوی کبد موش صحرایی‌در آسیب ناشی از سیسپلاتین

گروه	تیمار	پارامترهای بیوشیمیایی					
		گلوتاتیون احیاء (µg/mg protein)	مالون‌دی‌آلدئید (nmol/g protein)	سوپراکسید دیسموتاز (U/mg protein)	کاتالاز (U/mg protein)	گلوتاتیون پراکسیداز (U/mg protein)	گلوتاتیون ردوکتاز (U/mg protein)
۱	سالین نرمال	$۹/۲۵\pm۰/۸۵^{bd}$	$۳/۵۴\pm۰/۱۶^{bd}$	$۱۳/۶۴\pm۰/۵۴^{bd}$	$۶۴/۶۶\pm۲/۱۳^{bd}$	$۲۲/۸۴\pm۱/۶۵^{bd}$	$۱۲۳/۳۷\pm۵/۶۵^{bd}$
۲	سیسپلاتین	$۴/۵۲\pm۰/۵۹^{acde}$	$۵/۲۴\pm۰/۳۱^{acde}$	$۸/۹۳\pm۰/۴۱^{acde}$	$۳۹/۹۴\pm۱/۰۵^{acde}$	$۱۶/۳۷\pm۰/۹۳^{acde}$	$۸۴/۱۷\pm۲/۹۲^{acde}$
۳	سیسپلاتین + سیلیمارین	$۸/۷۵\pm۰/۷۴^{b}$	$۳/۵۹\pm۰/۱۸^{b}$	$۱۲/۵۳\pm۰/۵۲^{b}$	$۶۰/۸۴\pm۱/۷۴^{b}$	$۲۱/۹۵\pm۱/۵۴^{b}$	$۱۱۶/۱۳\pm۳/۴۲^{b}$
۴	سیسپلاتین+ عصاره (۴۰ mg/kg)	$۷/۱۴\pm۰/۶۳^{ab}$	$۴/۸۶\pm۰/۲۸^{ace}$	$۱۰/۷۴\pm۰/۴۷^{ab}$	$۵۲/۱۴\pm۱/۸۵^{ab}$	$۱۹/۱۲\pm۱/۱۴^{ab}$	$۱۰۶/۵۷\pm۳/۱۲^{ab}$
۵	سیسپلاتین+ عصاره (۸۰ mg/kg)	$۸/۳۸\pm۰/۶۹^{b}$	$۳/۶۲\pm۰/۱۹^{b}$	$۱۲/۹۵\pm۰/۵۳^{b}$	$۶۲/۱۲\pm۱/۸۱^{b}$	$۲۰/۳۵\pm۱/۳۴^{b}$	$۱۱۸/۳۲\pm۴/۰۲^{b}$
	نتیجه آزمون آنالیز واریانس یکطرفه	$<۰/۰۰۰۱$	$۰/۰۰۵$	$<۰/۰۰۰۱$	$<۰/۰۰۰۱$	$<۰/۰۰۰۱$	$<۰/۰۰۰۱$

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار برای ۸ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است. a: اختلاف معنی‌دار با گروه ۱، b: اختلاف معنی‌دار با گروه ۲، c: اختلاف معنی‌دار با گروه ۳، d: اختلاف معنی‌دار با گروه ۴، e: اختلاف معنی‌دار با گروه ۵ ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳- تاثیر عصاره الکلی کلاله زعفران و سیلیمارین بر آسیب بافت کبد موش صحرایی ناشی از سیسپلاتین

گروه	تیمار	درجه آسیب بافت	نتیجه‌آزمون کروسکال والیس
۱	نرمال‌سالین	$۰/۰\pm۰/۰^{a}$	$p<۰/۰۰۱$
۲	سیسپلاتین	$۲/۸۳\pm۰/۶۲^{b}$	
۳	سیسپلاتین+ سیلیمارین	$۰/۱۶\pm۰/۰۸^{a}$	
۴	سیسپلاتین+ عصاره (۴۰ mg/kg)	$۲/۲\pm۰/۲۵^{b}$	
۵	سیسپلاتین+ عصاره (۸۰ mg/kg)	$۰/۲۴\pm۰/۱۵^{a}$	

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار برای ۸ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است. a و b: حروف غیر مشابه نشانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

سینوزوئیدها در این گروه قابل مشاهده بود (شکل‌های ۱-ب و ۱-ج). در نمونه‌های بافتی گروه‌های ۳ (سیسپلاتین + سیلیمارین) و ۵ (سیسپلاتین + دز بالای عصاره)، آسیب بافتی فقط به شکل تغییرات دژنراتیو خفیف در تعدادی از موش‌ها مشاهده گردید (شکل‌های ۱-د و ۱-ه) که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین این گروه‌ها و گروه شاهد برآورد نگردید (جدول ۳). در گروه ۴ (سیسپلاتین + دز پائین عصاره)، آسیب بافتی نسبت به گروه ۲ از شدت کمتری برخوردار بود (شکل ۱-و). در این گروه تغییرات خفیف تا شدید دژنراتیو همراه با مناطق کوچک نکروز به‌صورت کانونی در نواحی مرکز لوبولی مشاهده گردید که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با گروه ۲ نداشت (جدول ۳).

بحث

نتایج بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژی بررسی حاضر حاکی از آسیب توکسیک کبد در اثر سیسپلاتین می‌باشد. در ارزیابی آسیب کبد، سنجش سطوح آنزیم‌هایی نظیر AST، ALT و LDH به‌طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد. وقوع نکروز یا آسیب غشاء سلول باعث رها شدن این آنزیم‌ها در خون می‌شود . از سوی دیگر، سطح سرمی بیلی‌روبین، آلبومین و پروتئین تام با عملکرد سلول‌های کبدی در ارتباط می‌باشد (۴۰).

در این مطالعه، سیسپلاتین باعث افزایش معنی‌دار مقادیر سرمی آنزیم‌های AST، ALT و LDH و بیلی‌روبین تام و کاهش معنی‌دار پروتئین تام و آلبومین سرم در مقایسه با گروه شاهد سالم شد. تغییرات معنی‌دار در مقادیر سرمی AST، ALT، LDH، بیلی‌روبین تام و آلبومین سرم متعاقب تیمار با سیسپلاتین قبلاً توسط Mansour و همکاران در سال ۲۰۰۶، Saad و Al-Rikabi در سال ۲۰۰۲ و Yousef و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش شده است (۴۳-۴۱). افزایش سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی، بیلی‌روبین و آلبومین نشانگر بروز اختلال در عملکرد کبد هستند. در مطالعه ما، یافته‌های آسیب‌شناسی نیز حاکی از آسیب شدید بافت کبد در اثر سیسپلاتین بود که از این لحاظ با یافته‌های Zicca و همکاران در سال ۲۰۰۲ و Iseri و همکاران در سال ۲۰۰۷ همخوانی دارد (۴۴، ۴۵). ناگفته نماند که غلظت سرمی آلبومین می‌تواند مستقیماً در اثر آسیب گلومرول‌های کلیه نیز تحت تاثیر قرار گیرد (۴۶). بنابراین، در مطالعه حاضر کاهش معنی‌دار آلبومین سرم ممکن است حکایت از آسیب کلیوی سیسپلاتین نیز داشته باشد.

در این بررسی، سیلیمارین تاثیر بسیار خوبی را بر تغییرات آنزیم‌های شاخص کبدی ناشی از سیسپلاتین داشت که از این لحاظ با نتایج بررسی Mansour و همکاران در سال ۲۰۰۶ هم‌خوانی دارد (۴۱).

همان‌طورکه قبلاً نیز به آن اشاره شد، بررسی حاضر اولین مطالعه‌ای است که در آن به بررسی اثرات حفاظت کبدی عصاره الکلی کلاله زعفران در برابر اثرات توکسیک سیسپلاتین پرداخته شده است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میزان مصرف ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره الکلی کلاله زعفران از لحاظ اثر محافظتی بر سمیت کبدی سیسپلاتین، با سیلیمارین با میزان مصرف ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم برابری می‌کند، به‌طوری که هر دو آن‌ها توانستند پارامترهای شاخص آسیب کبد را تا حد طبیعی تغییر دهند. میزان مصرف ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره علی‌رغم ایجاد تغییرات معنی‌دار در جهت بهبود پارامترهای مذکور، نتوانست آن‌ها را به میزان طبیعی خود برساند، هرچند که بین دوزهای ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره و سیلیمارین تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نگردید. بنابراین، معلوم می‌شود که تاثیر عصاره الکلی کلاله زعفران از لحاظ محافظت کبد در برابر سمیّت سیسپلاتین وابسته به دوز بوده و با میزان مصرف ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نتیجه مطلوب‌تری عاید می‌گردد.

بازگشت سطوح افزایش یافته آنزیم‌های سرمی و آلبومین و بیلی‌روبین به مقادیر طبیعی خود توسط عصاره الکلی کلاله زعفران، متعاقب آسیب کبدی ناشی از سیسپلاتین، در اثر ممانعت از نشت آنزیم‌های داخل سلولی به‌دلیل ابقاء تمامیت و پایداری سلامت غشاء سلول و یا نوزایش سلول‌های آسیب دیده کبد حاصل می‌گردد (۴۷). کنترل موثر سطوح بیلی‌روبین، آلبومین و پروتئین تام سرم، بهبود زود هنگام مکانیسم‌های عملکردی و ترشحی سلول‌های کبدی را نشان می‌دهد.

با تجویز عصاره الکلی کلاله زعفران در کنار سیسپلاتین، فقط تغییرات دژنراتیو خفیف مشاهده گردید و اثری از نکروز دیده نشد که این خود اثرات حفاظتی عصاره زعفران در مقابل سمیت کبدی سیسپلاتین را نشان می‌دهد. مطالعات ریزبینی در توافق با نشانی‌ها و شواهد، با نتایج بیوشیمیایی به‌دست آمده از این بررسی هم‌خوانی داشته و آن‌ها را مورد تائید قرار می‌دهد. اثرات مفید فوق را می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس‌های اکسیداتیو ترکیبات موجود در عصاره مربوط دانست (۴۸). توضیح ممکن در این رابطه این است که عصاره از طریق جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی باعث تثبیت غشاءهای سلولی شده و مانع از نشت آنزیم‌ها می‌گردد (۴۳).

در بررسی حاضر، افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و کاهش میزان ذخیره گلوتاتیون احیاء (GSH) در بافت کبد متعاقب مواجه با سیسپلاتین، نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد، یکی از مکانیسم‌های احتمالی در پاتوفیزیولوژی سمیّت کبدی سیسپلاتین می‌باشد. تحقیقات انجام شده توسط Partibha و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داده است که پراکسیداسیون چربی و تخلیه گلوتاتیون احیاء (GSH) متعاقب تیمار با سیسپلاتین در بافت کبد موش صحرایی اتفاق می‌افتد که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد (۵). گلوتاتیون احیاء جزء مهمی از سیستم آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیماتیک بوده و نقش مهمی را در کنترل اثرات توکسیک سیسپلاتین بر عهده دارد (۱). بنابراین، کاهش میزان گلوتاتیون احیاء می‌تواند به عنوان عاملی مستقیم در پراکسیداسیون چربی ناشی از سیسپلاتین مطرح باشد. به هر حال، سمیّت کبدی سیسپلاتین به آسیب اکسیداتیو و تولید ROS (Reactive Oxygen Species) نسبت داده شده است (۴۹). بررسی‌های Koc و همکاران در سال ۲۰۰۵ و مطالعات Mansour و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داده که سیسپلاتین می‌تواند مانع از فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز شده و همچنین میزان مالون‌دی‌آلدئید را در کبد موش‌های صحرایی افزایش می‌دهد (۴۱،۵۰). در مطالعه ما نیز تغییراتی در سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی و میزان مالون‌دی‌آلدئید بافت کبد موش‌های صحرایی متعاقب تیمار با سیسپلاتین مشاهده شد که با مطالعه ایشان هم‌خوانی دارد. اینکه چرا میزان مصرف ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره در مطالعه حاضر نتوانست مقدار افزایش یافته مالون‌دی‌آلدئید در اثر سیسپلاتین را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد، این است که افزایش مالون‌دی‌آلدئید احتمالاً وابسته به دز مصرف عصاره می‌باشد. به این معنی که میزان مصرف ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره ممکن است برای غلبه به پراکسیداسیون لیپیدی القاء شده توسط سیسپلاتین کافی نبوده است.

سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز آنزیم های آنتی‌اکسیدانی هستند که سیستمی تدافعی را علیه گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تشکیل داده‌اند (۵۱). کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شاخصی حساس برای آسیب سلول‌های کبدی است. این آنزیم یکی از مهم‌ترین عوامل در سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی آنزیماتیک است. سوپراکسیددیسموتاز آنیون سوپراکسید را از طریق تبدیل آن به پراکسید هیدروژن زدوده و بدین ترتیب اثرات توکسیک آن را کاهش می‌دهد (۵۲). در بررسی حاضر، میزان سوپراکسید دیسموتاز در موش‌های تیمار شده با سیسپلاتین به دلیل تشکیل فراوان آنیون‌های سوپراکسید، به طور معنی‌داری کاهش یافت که در پی آن فعالیت آنزیم‌های زداینده پراکسید هیدروژن یعنی کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نیز در این موش‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. به نظر می‌رسد که غیرفعال شدن سوپراکسید دیسموتاز توسط آنیون‌های افزایش یافته سوپراکسید، منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌شود. در مطالعه ما، مصرف عصاره زعفران مانع از کاهش سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز شد که این ممکن است در اثر زدایش رادیکال‌ها توسط عصاره باشد که منجر به حفظ و بقاء این آنزیم‌ها شده است.

کاتالاز آنزیم آنتی‌اکسیدانی است که در بافت‌های حیوانی به طور گسترده‌ای منتشر بوده و دارای بیشترین فعالیت در کبد و گلبول‌های قرمز است. کاتالاز، پراکسید هیدروژن را تجزیه می‌کند و باعث محافظت بافت‌ها از رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل می‌شود (۵۳). بنابراین، کاهش فعالیت کاتالاز ممکن است منجر به برخی اثرات مخرب ناشی از رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن گردد.

گلوتاتیون ردوکتاز یک آنزیم سیتوزولی کبدی است که در کاهش گلوتاتیون اکسید (GSSG)، به عنوان محصول نهایی فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز بر روی گلوتاتیون احیاء (GSH)، دخیل است. (۵۴)، در مطالعه ما، متعاقب تیمار با سیسپلاتین کاهش قابل توجهی در میزان گلوتاتیون پراکسیداز حاصل گردید که منجر به دسترسی گلوتاتیون ردوکتاز به سوبسترا شده و بدین ترتیب فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز کاهش یافت. چنین به نظر می‌رسد که زعفران در کنار سیسپلاتین فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز را مجدداً برقرار نموده که مصرف گلوتاتیون اکسید را جهت تشکیل گلوتاتیون احیاء و افزایش سم‌زدایی متابولیت‌های فعال توسط کونژوگاسیون با گلوتاتیون احیاء برقرار می‌کند. نتایج بررسی حاضر، گزارش سایر محققین (۲۳) را در خصوص اثرات آنتی‌اکسیدانی و زدایش رادیکال آزاد زعفران مورد تائید قرار می دهد.

نتایج مطالعه ما در مورد اثرات آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین نیز با یافته‌های Ramakrishnan و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۵۵)، Pradeep و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۵۶) و یافته‌های Tasduq و همکاران در سال ۲۰۰۵ (۵۷) مطابقت دارد. بنابراین، به جرأت می‌توان گفت که خصوصیت آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین است که منجر به جبران فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

مزبور شده است. قابل توجه این‌که در مطالعه ما، بین عصاره الکلی کلاله زعفران با میزان مصرف ۸۰ mg/kg و سیلیمارین با میزان مصرف ۵۰ mg/kg از لحاظ تاثیر بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و میزان گلوتاتیون احیاء و مالون‌دی‌آلدئید تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

یافته‌های این بررسی نشان می‌دهد که عصاره الکلی کلاله زعفران احتمالاً با خواص آنتی‌اکسیدانی خود، کبد موش‌های صحرایی را در برابر اثرات توکسیک سیسپلاتین محافظت می‌کند، به‌طوری که اثرات محافظتی فوق با اثرات داروی سیلیمارین در این زمینه برابری نموده، قابل مقایسه می‌باشد.

بنابراین، پس از شناخت دقیق ماده یا مواد موثر اصلی عصاره الکلی کلاله زعفران در این زمینه و تعیین دقیق مکان و مکانیسم یا مکانیسم‌های مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن، این عصاره می‌تواند پس از انجام کارآزمایی‌های بالینی شاهددار اتفاقی، در موارد شیمی‌درمانی با سیسپلاتین جهت پیشگیری از آسیب‌های جبران ناپذیر کبد به عنوان یک داروی گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانی، توصیه گردد. به هر حال چگونگی تاثیر دزهای مختلف عصاره و اینکه آیا این ماده باعث کاهش اثرات درمانی سیسپلاتین می‌شود یا خیر، نامشخص بوده و نیاز به انجام مطالعات دیگری دارد.

تشکر و قدردانی

مؤلفین مراتب سپاس خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز و مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز ابراز می‌دارند. از کارشناسان محترم بخش پاتولوژی و کلینیکال پاتولوژی دانشکده دامپزشکی نیز صمیمانه قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. Cancer Ther 2003; 1: 47-61.
2. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. Cancer Treat Rev 2007; 33: 9-23.
3. Borch RF, Markman M. Biochemical modulation of cisplatin toxicity. Pharmacol Ther 1989; 41: 371-80.
4. Cersosimo RJ. Hepatotoxicity associated with cisplatin chemotherapy. Ann Pharm 1993; 27: 438-41.
5. Partibha R, Sameer R, Rataboli PV, Bhiwgade DA, Dhume CY. Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats. Eur J Pharmacol 2006; 532: 290-93.
6. Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. Exp Toxicol Pathol 2009; 61: 223-42.
7. Sadzuka Y, Shoji T, Takino Y. Effect of cisplatin on the activities of enzymes which protect against lipid peroxidation. Biochem Pharmacol 1992; 43: 1872-75.
8. Zhang JG, Lindup WE. Role of mitochondria in cisplatin-induced oxidative damage exhibited by rat renal cortical slices. Biochem Pharmacol 1993; 45: 2215-22.
9. Martins NM, Santos NA, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. J Appl Toxicol 2008; 28: 337-44.
10. Kim SH, Hong KO, Chung WY, Hwang JK, Park KK. Abrogation of cisplatin-induced hepatotoxicity in mice by xanthorrhizol is related to its effect on the regulation of gene transcription. Toxicol Appl Pharmacol 2004; 196: 346-55.
11. Aamdal S, Fodstad O, Pihl A. Some procedures to reduce *cis*-platinum toxicity reduce antitumour activity. Cancer Treat Rev 1987; 14: 389-95.
12. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus L.*). Exp Biol Med 2002; 227: 20-25.
13. Abe K, Saito H. Effects of saffron and its constituent crocin on learning behavior and long-term potentiation. Phytother Res 2000; 14: 149-52.
14. Ríos JL, Recio MC, Giner RM, Máñez S. An update review of saffron and its active constituents. Phytother Res 1996; 10: 189-93.
15. 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: 387-93.

16. Goyal SN, Arora S, Sharma AK, Joshi S, Ray R, Bhatia J. Preventive effect of crocin of *Crocus sativus* on hemodynamic, biochemical, histopathological and ultrastuctural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. Phytomedicine 2010; 17: 227-32.

17. Giaccio M. Crocetin from saffron: An active component of an ancient spice. Crit Rev Food Sci Nutr 2004; 44: 155-72.

18. Nair SC, Panikkar KR, Parathod RK. Protective effects of crocetin on bladder cytotoxicity induced by cyclophosphamide. Cancer Biother 1993; 8: 339-43.

19. El Daly ES. Protective effect of cysteine and vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. J Pharm Belg 1998; 53: 87-95.

20. Nair SC, Salomi MJ, Panikkar B, Panikkar KR. Modulatory effects of *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in mice. J Ethnopharmacol 1991; 31: 75-83.

21. Nair SC, Varghese CD, Pannikar KR, Kurumboor SK, Parathod RK. Effects of saffron in vitamin A levels and its antitumor activity on the growth of solid tumors in mice. Int J Pharmacog 1994; 32: 105-14.

22. Premkumar K, Abraham SK, Santhiya ST, Gopinath PM, Ramesh A. Inhibition of genotoxicity by saffron (*Crocus sativus* L.) in mice. Drug Chem Toxicol 2001; 24: 421-28.

23. Ochiai T, Ohno S, Soeda S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin prevents the death of rat pheochromocytoma (PC12) cells by its antioxidant effects stronger than those of α-tocopherol. Neurosci Lett 2004; 362: 61-64.

24. El-Samaligy MS, Afifi NN, EA Mahmoud. Evaluation of hybrid liposomes-encapsulated silymarin regarding physical stability and *in vivo* performance. Int J Pharm 2006; 319: 121-29.

25. Mohajeri D, Mousavi Gh, Mesgari M, Doustar Y, Khayat Nouri MH. Subacute toxicity of *Crocus sativus* L. (saffron) stigma ethanolic extract in rats. Am J Pharm Toxicol 2007; 2: 189-93.

26. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. Am J Clin Pathol 1957; 28: 56-63.

27. Martinek RG. A rapid ultraviolet spectrophotometric lactic dehydrogenase assay. Clin Chem Acta 1972; 40: 91-99.

28. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-75.

29. Malloy HT, Evelyn KA. The determination of bilirubin level with the photoelectric colorimeter. J Biol Chem 1937; 119: 481-84.

30. Esterbauer H, Cheesman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol 1990; 186: 407-21.

31. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen. Biochem Biophys Res Commun 1972; 46: 849-54.

32. Kakkar P, Das B, Viswanathan PN. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase, Indian J Biochem Biophys 1984; 21: 130-32.

33. Claiborne, A. Catalase activity. In: Boca Raton FL, editor. CRC Handbook of methods for oxygen radical research. Florida: CRC Press, Boca Raton; 1985. p.283-84.

34. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science 1973; 179: 588-90.

35. Mohandas J, Marshall JJ, Duggin GG, Horvath JSL, Tiller DG. Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. Cancer Res 1984; 44: 5086-91.

36. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein bound, and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem 1968; 25:192-205.

37. Lee G, Luna HT, editors. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3rd ed. New York: Mc Graw-Hill Book Company; 1988. p.32-107.

38. Kart A, Cigremis Y, Karaman M, Ozen H. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. Exp Toxicol Pathol 2010; 62: 45-52.

39. Kabir F, Pazdezh P, editors. Handbook of normal values in domestic animals. Tehran: Norbakhsh; 2002. p.16-262. [In Persian]

40. Stockham SL, Scott MA. Fundamentals of veterinary clinical pathology. Ames: Iowa State University Press; 2002. p.434-59.

41. Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM. Silymarin modulates cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. J Biochem Mol Biol 2006; 39: 656-61.

42. Saad SY, Al-Rikabi AC. Protection effects of taurine supplementation against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Chemotherapy 2002; 48: 42-48.

43. Yousef MI, Saad AA, El-Shennawy LK. Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. Food Chem Toxicol 2009; 47: 1176-83.

44. Zicca A, Cafaggi S, Mariggiò MA, Vannozzi MO, Ottone M, Bocchini V, et al. Reduction of cisplatin hepatotoxicity by procainamide hydrochloride in rats. Euro J Pharmacol 2002; 442: 265-72.

45. İşeri S, Ercan F, Gedik N, Yüksel M, Alican I. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. Toxicology 2007; 230: 256-64.

46. Venkatesan N, Punithavathi D, Arumugam V. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. Brit J Pharmacol 2000; 129: 231-34.

47. Thabrew MI, Joice PD, Rajatissa W. A comparative study of the efficacy of *Pavetta indica* and *Osbeckia octanda* in the treatment of liver dysfunction. Planta Med 1987; 53: 239-41.

48. Abdullaev FI. Biological effects of saffron. Biofactors 1993; 4: 83-86.

49. Iraz M, Ozerol E, Gulec M, Tasdemir S, Idiz N, Fadillioglu E, et al., Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) administration on cisplatin-induced oxidative damage to liver in rat, Cell Biochem Funct 2006; 24: 357-61.

50. Koc A, Duru M, Ciralik H, Akcan R, Sogut S. Protective agent, erdosteine, against cisplatin-induced hepatic oxidant injury in rats. Mol Cell Biochem 2005; 278: 79-84.

51. Lil JL, Stantman FW, Lardy HA. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Arch Biochem Biophys 1988; 263: 150-56.

52. Curtis SJ, Mortiz M, Sondgrass PJ. Serum enzyme derived from liver cell fractions. The response of carbon tetrachloride intoxication in rats. Gastroentrology 1972; 62: 84-92.

53. Chance B, Greenstein DS, Roughton RJW. The mechanism of catalase action. Steady-state analysis. Arch Biochem Biophys 1952; 37: 301-21.

54. Naik SR, Panda VS. Hepatoprotective effect of *Ginkgoselect Phytosome* in rifampicin induced liver injury in rats: evidence of antioxidant activity. Fitotrapia 2008; 79: 439-45.

55. Ramakrishnan G, Raghavendran HR, Vinodhkumar R, Devaki T. Suppression of *N*-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats. Chem Biol Interact 2006; 161: 104-14.

56. Pradeep K, Mohan CVR, Gobianand K, Karthikeyan S. Silymarin modulates the oxidant–antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. Euro J Pharmacol 2007; 560: 110-16.

57. Tasduq SA, Peerzada K, Koul S, Bhat R, Johri RK. Biochemical manifestations of anti-tuberculosis drugs induced hepatotoxicity and the effect of silymarin. Hepatol Res 2005; 31: 132-35.