بررسی نقش آنتی‌ژنوتوکسیسیتی عصاره آبی زعفران (*Crocus sativus* L.) در کلیه موش‌های نر آلوده به کادمیم با استفاده از الکتروفورز تک سلول (Comet assay)

علی زارعی محمودآبادی[۱]، حمیدرضا جوادی[۲*]، مریم عادلی‌پور[۳]، زهرا حجتی[٤]، مهدی کمالی[٥]، حسین بهادران[٦]

۱- دانشیارگروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران
۲- دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشگر مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) و دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۳- دانشجوی دکتری بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
٤- کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
٥- استادیار، مرکز نانوبیوتکنولوژی ، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران
٦- دانشیار گروه آناتومی و بافت‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران
*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، پژوهشگاه بقیه‌الله (عج)، مرکز نانوبیوتکنولوژی، تلفن: ۸۲٤۸۲٥٦۲ (۰۲۱)، نمابر: ۲۲۸۳۰۲٦۲ (۰۲۱)
پست الکترونیک: javadihr83@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۱٦ **تاریخ تصویب:** ۹۳/۹/۱۲

چکیده

مقدمه: کادمیوم و ترکیبات آن از آلاینده‌های محیطی و شغلی هستند که در کلیه و کبد انسان ذخیره شده و به عنوان عوامل ژنوتوکسیک، کارسینوژنیک، توموروژنیک و مخرب DNA شناخته می‌شوند. مطالعات گذشته اثرات ضدالتهابی، ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانتی زعفران را نشان داده‌اند.

هدف: هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثرات آنتی‌ژنوتوکسیستی و ضدسمیت عصاره آبی کلاله زعفران روی کلیه موش آزمایشگاهی بود.

روش بررسی: برای بررسی اثرات حفاظتی زعفران در برابر تخریب کروموزومی ناشی از کادمیوم کلراید در کلیه موش، حیوانات را به طور تصادفی به ٦ گروه نرمال، سالین، زعفران، کادمیوم، زعفران + کادمیوم، کادمیوم + زعفران تقسیم نموده و به روش داخل صفاقی با دوز ۳۰ میکرومول بر کیلوگرم کادمیوم و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی زعفران به مدت ۳ روز تیمار شدند. برای تأیید ایجاد توکسیسیتی توسط کادمیوم، غلظت مالون دی آلدهاید (MDA) و گلوتاتیون (GSH) در هموژن کبد سنجیده شد. نتایج، افزایش معنی‌دار در میزان MDA و کاهش در میزان GSH در گروه تیمار شده با کادمیم را نشان داد. میزان تخریب DNA در کلیه با روش الکتروفورز تک سلول در سلول‌های کلیه در گروه‌های مختلف بررسی شد.

نتایج: نتایج نشان داد که کادمیوم به طور معنی‌داری موجب شکست DNA در کلیه می‌شود. در حالی که تیمار حیوانات با عصاره زعفران به صورت پیشگیری و درمان موجب کاهش معنی‌دار در تخریب DNA شد. زعفران اثر محافظتی قابل قبولی در برابر استرس اکسیداتیو و تخریب ژنوتوکسیسیتی ناشی از کادمیوم دارد.

نتیجه‌گیری: بنابراین استفاده از زعفران به عنوان یک مکمل غذایی مناسب برای محافظت کارگران صنعتی در معرض کادمیوم، پیشنهاد می‌شود.

گل‌واژگان: الکتروفورز تک سلولی، ژنوتوکسیسیتی، سیتوتوکسیسیتی، عصاره‌ی آبی زعفران، کادمیوم

مقدمه

رادیکال‌های آزاد مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن را تخلیه و موجب بروز استرس اکسیداتیو می‌شود. این عدم تعادل ناشی از افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و یا کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی است [۱]. عوامل اکسیدانی مختلف نظیر ترکیبات شیمیایی که به عنوان آلودگی‌های محیطی وجود دارند، بسیاری از داروها، ترکیباتی نظیر H_2O_2 و عوامل شیمیایی مورد استفاده به عنوان عوامل جنگی نظیر خردل از طریق افزایش گونه فعال اکسیژن (ROS) موجب تخریب DNA، القاء شکست تک زنجیره و یا هر دو زنجیره DNA و عوارض ناشی از آن نظیر سرطان و مرگ سلولی می‌شوند. اخیراً گزارش‌هایی مبنی بر استفاده از ترکیبات گیاهی به منظور مهار موتاژنز شیمیایی و اختلالات DNA منتشر شده است [۲].

کادمیوم (Cd_{48}) یک عنصر طبیعی از گروه عناصر IIB جدول تناوبی است که در پوسته زمین یافت می‌شود و به طور وسیعی در صنایع مختلف به عنوان عامل ضدزنگ، تثبیت‌کننده‌ها در محصولات PVC، پیگمان رنگی و در تولید باتری‌های نیکل کادمیومی کاربرد دارد. همچنین در کودهای فسفاته نیز مقدار زیادی کادمیوم وجود دارد [۳]. این فلز برای سلامتی انسان به مقدار کم نیز مضر است و تا به امروز هیچ عملکرد فیزیولوژیکی برای آن در بدن انسان گزارش نشده است. در سال ۱۸۱۷ برای اولین بار فردریش استرونیر (Friedrich Stroneyer) آلمانی نشان داد که مسمومیت با کادمیوم می‌تواند منجر به آسیب در کلیه، استخوان و ریه شود [٤].

نیمه عمر طولانی کادمیوم (۱۰ سال) منجر به تجمع کادمیوم در کلیه و به دنبال آن نکروز سلول‌های توبولی کلیوی می‌شود [٥].

نشانه‌هایی مبنی بر نقش کادمیوم در بروز سرطان وجود دارد، هرچند مکانیسم مولکولی آن هنوز شناخته شده نیست ولی احتمالاً فاکتورهای زیادی از قبیل: به‌هم خوردن تنظیم سیگنالینگ تقسیم سلولی، اختلال در مکانیسم ترمیم DNA و ایجاد مقاومت به آپوپتوزیس به دلیل آلودگی به کادمیوم، در آن دخالت دارند [٦].

زعفران با نام عمومی Saffron از کلاله گیاهی به نام *Crocus stivus* L از خانواده زنبقیان مشتق شده است و به طور عمده در ایران رشد می‌کند. این گیاه شامل پیگمان‌های نارنجی رنگی است که اغلب به عنوان ادویه و چاشنی جهت رنگ و طعم غذا و ماده معطر در صنایع شیرینی‌پزی کاربرد دارد [۷]. به طور گسترده در طب سنتی، زعفران به عنوان آرامبخش، ضداسپاسم، اشتهاآور و مقوی معده استفاده می‌شود. از قدیم برخی خواص درمانی از جمله اثرات آرام‌بخشی، خلط‌آور، نشاط‌آور، تحریک‌کننده معده، محرک قوه جنسی، برطرف‌کننده اسپاسم و عامل سقط جنین برای زعفران شناخته شده است [۱۰-۸]. ترکیبات مهم زعفران کروسین، کروستین و پیکروسین هستند که نقش اصلی در فعالیت‌های فارماکولوژیکی آن دارا می‌باشند و اثرات درمانی را به آنها نسبت می‌دهند. اثرات ضدسرطانی زعفران ناشی از وجود کارتنوئیدها و کاروتن در آن است. همچنین اثر مهاری بر روی سنتز DNA و RNA سلولی و عملکرد آنزیمی داشته و از این طریق با سلول‌های سرطانی مقابله می‌کند. مطالعات مختلفی مبنی بر تأثیر زعفران بر پیشگیری از شکست DNA در بافت‌های مختلف حیوانی صورت گرفته است [۱۳-۱۱]. این گیاه از استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط عوامل ژنوتوکسیک نیز جلوگیری می‌کند [١٤]. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر تیمار داخل صفاقی عصاره آبی زعفران در پیشگیری از تخریب DNA ناشی از مسمومیت با کادمیوم در کلیه موش‌ها به روش الکتروفورز تک سلول بود.

مواد و روش‌ها

مواد

کادمیوم کلراید، KCl، NaCl، Na_2Hpo_4، KH_2Po_4، HCl، NaoH، EDTA، Tris NaoH، ترتیون X_{100}، DMSO، پروپیدیوم یداید، LMP آگاروز با نقطه ذوب پایین و آگاروز معمولی با درجه آنالیتیکی از شرکت مرک خریداری شد.

تریپان بلو، تری‌باربیتوریک اسید، اسید استیک، بوتانول نرمال، پیریدین، تترااتوکسی‌پروپان، آلبومین سرم گاوی، اسید

سولفوسالسیلیک، DTNB، بی‌کربنات سدیم، GSH، HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) از شرکت سیگما تهیه شد.

تهیه عصاره زعفران

زعفران توسط شرکت طلاکاران مزرعه (تربت حیدریه- خراسان رضوی) تهیه شده و به آزمایشگاه دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل و مورد شناسایی قرار گرفته و با کد ٤٠٨ ثبت شد. سپس پودر کلاله زعفران تهیه و در دستگاه تقطیر، عصاره آبی آن گرفته شد. برای این منظور، ١٠٠ گرم از پودر کلاله خشک شده در یک مخزن شیشه‌ای ریخته شد و به آن ١٠٠٠ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و به مدت ١٠ دقیقه در دمای ١٠٠ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. سپس محلول رویی از صافی عبور داده و به مدت یک هفته در دستگاه بن ماری با دمای ٥٥ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا آب عصاره به آرامی تبخیر شده و پودر عصاره به دست آمد. با این روش از هر ١٠٠ گرم پودر کلاله ٢٥ گرم پودر عصاره حاصل شد. در عمل این عصاره را در سالین حل کرده و به صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. میزان کروسین موجود در عصاره در آزمایشگاه دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و با استفاده از کروسین استاندارد و HPLC بررسی و ٢٣ درصد گزارش شد.

انتخاب و تیمار حیوانات آزمایشگاهی

حجم نمونه بر اساس فرمول مطالعات مداخله‌ای بر روی حیوانات آزمایشگاهی محاسبه شد که تعداد آنها در گروه‌های دارای تزریق کادمیوم به علت سمی بودن با درصد مرگ و میر ٢٠ درصد ٨ سر موش و در بقیه گروه‌ها ٦ سر موش می‌باشد. به این منظور تعداد ٤٢ سر موش نر بالغ از نژاد (Suiss-webster) از مرکز پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) خریداری شد و به حیوانخانه منتقل و حداقل به مدت یک هفته تحت شرایط ١٢ ساعت روشنایی و ١٢ ساعت تاریکی قرار داده تا با شرایط حیوانخانه سازش پیدا کنند. سپس حیوانات به روش تصادفی به شش گروه (کنترل، شم، زعفران، کادمیم، زعفران - کادمیم، کادمیم - زعفران) تقسیم و به صورت زیر تیمار شدند.

گروه کنترل بدون هیچ‌گونه تیماری به همان مدت زمان آزمایش نگهداری و سپس جراحی شدند.

گروه شم: به مدت ٦ روز، روزانه با µl ٢٠٠ نرمال سالین به صورت داخل صفاقی تیمار و ٢٤ ساعت پس از آخرین تجویز جراحی شدند.

گروه زعفران: به مدت ٣ روز، روزانه با µl ٢٠٠ عصاره زعفران (١٠٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی و ٣ روز با µl ٢٠٠ سالین تیمار و ٢٤ ساعت پس از آخرین تجویز جراحی شدند.

گروه کادمیوم: به مدت ٣ روز، روزانه با µl ٢٠٠ کادمیوم (٣٠ میکرومول بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی و ٣ روز با µl ٢٠٠ سالین تیمار و ٢٤ ساعت پس از آخرین تجویز جراحی شدند.

گروه زعفران - کادمیوم (پیشگیری): به مدت ٣ روز، روزانه با µl ٢٠٠ عصاره زعفران (١٠٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی و سه روز متوالی، با µl ٢٠٠ کادمیم (٣٠ میکرومول بر کیلوگرم) تیمار و ٢٤ ساعت پس از آخرین تجویز جراحی شدند.

گروه کادمیوم - زعفران (درمانی): به مدت ٣ روز، روزانه با کادمیوم µl ٢٠٠ (٣٠ میکرومول بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی و سه روز متوالی، با µl ٢٠٠ عصاره زعفران (١٠٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تیمار و ٢٤ ساعت پس از آخرین تجویز جراحی شدند.

بررسی توکسیسیتی کادمیوم

به منظور تأیید مسمومیت حیوانات با کادمیم، بافت کبد حیوانات جمع‌آوری و به منظور حذف خون همراه بافت در بافر PBS سرد شستشو داده شد. سپس بخشی از بافت را با کمک هموژنایزر (rpm ٣٠٠، با فاصله زمانی ١٠ ثانیه و ٣٠ ثانیه استراحت، روی یخ) هموژن و به مدت ٥ دقیقه با rpm ٣٠٠٠ و ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و از سوپرناتانت

آن جهت سنجش MDA و پروتئین استفاده شد. به بخش دیگری از بافت کبد محلول سولفوسالیسیلیک اسید ۵/۲ درصد افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه و سپس سانتریفیوژ و از سوپرناتانت آن جهت سنجش GSH استفاده شد. پروتئین نمونه‌ها به روش برادفورد سنجیده شد [۱٤].

سنجش GSH

میزان گلوتاتیون در نمونه‌های کبدی به روش Teitz سنجیده شد [۱۵] در این روش ۷۳۰ میکرولیتر از محلول Na_2HPO_4 ۰/۳ مول بر لیتر و ۹۰ میکرولیتر DTNB، ٤۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر در ۱ گرم بر دسی‌لیتر سیترات سدیم به عنوان سوبسترا و ۱۸۰ میکرولیتر از سوپرناتانت سلولی استفاده شد. تغییرات جذب محلول فوق در ٤۱۲ نانومتر در مدت ٤ دقیقه قرائت شد. و با کمک منحنی استاندارد میزان GSH تعیین و بر حسب µmole/mg protein گزارش شد.

سنجش MDA

میزان مالون دی‌آلدهید در نمونه‌های کبدی به روش Mihara و Uchiyam سنجیده شد [۱٦]. برای این منظور سلول‌ها با KCL ۱/۵ مول در لیتر سرد لیز و سانتریفیوژ شدند و از سوپرناتانت برای سنجش MDA استفاده شد. به هر میلی‌لیتر از این سوپرناتانت ml ۰/۳۷۵ از اسید استیک ۲۰ درصد و ml ۰/۳۷۵ از محلول تیوباربیتوریک اسید ۰/٦ درصد افزوده و به مدت ٦۰ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد سپس به مدت ۱۰ دقیقه با آب سرد خنک شد. در نهایت ۱/۲۵ میلی‌لیتر از نرمال بوتانل و پیریدین به نسبت (۱۵:۱) به آن افزوده و پس از مخلوط نمودن در rpm ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا فازها جدا شده و جذب فاز بوتانل در nm ۵۳۲ سنجیده شد. در این واکنش از ۱،۱،۳،۳- تترااتوکسی پروپان با همان شرایط لوله‌های آزمایش به عنوان نمونه استاندارد استفاده شد، میزان MDA به صورت میکرو مول بر میلی گرم پروتئین محاسبه و گزارش شد.

روش الکتروفورز تک سلول قلیایی

پس از جداسازی بافت کلیه و شستشو در PBS سرد به ظرف حاوی ۲ میلی‌لیتر بافر PBS سرد منتقل و روی یخ قرار داده شد. سپس با استفاده از تیغ بیستوری به قطعات کاملاً ریز تبدیل و با کمک پیپت چندین بار پیپتاژ شد. قطعات درشت باقیمانده را از محلول جدا و محلول هموژن باقیمانده سه بار با PBS سرد در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه در xg ۵۰۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب حاصل در µL ۵۰۰ از PBS سرد حل و تعداد و قابلیت ادامه حیات سلول‌ها تعیین شد. تعداد ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ سلول در حجم ۵ الی ۱۰ میکرولیتر را با ۹۵ – ۹۰ میکرولیتر از LMP ۰/۷ درصد مخلوط و به اسلایدی که قبلاً با آگاروز ۱ درصد اندود شده بود منتقل و ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس به مدت یک ساعت در شرایط تاریکی در بافر لیز کننده (Nacl 2.5 M، EDTA 100 mM (pH: 10)، Tris – Base 10 mM، NaoH ۰/۸ gr، pH=10، ۱ درصد تریتون ۱۰۰ X و DMSO ۱ ml) سرد (٤ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد، سپس به مدت ۲۰ دقیقه در بافر قلیایی (pH=۱۳) قرار داده و در ادامه به مدت ٤۰ دقیقه با استفاده از بافر NaOH (pH=۱۳) (بافر الکتروفورز) در ولتاژ ۰/۷ ولت به ازای هر سانتی‌متر ژل، الکتروفورز شد. پس از الکتروفورز اسلایدها مدت ۱۰ دقیقه در بافر خنثی‌کننده غوطه‌ور شده و در ادامه به منظور آبگیری و فیکس نمودن، اسلایدها ۱۵ دقیقه در اتانول مطلق قرار داده و در دمای اتاق خشک شد. با کمک پروپیدیوم یداید رنگ‌آمیزی و با کمک میکروسکوپ فلورسانت زایس از سلول‌ها عکس تهیه و با نرم‌افزار Comet score مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۸].

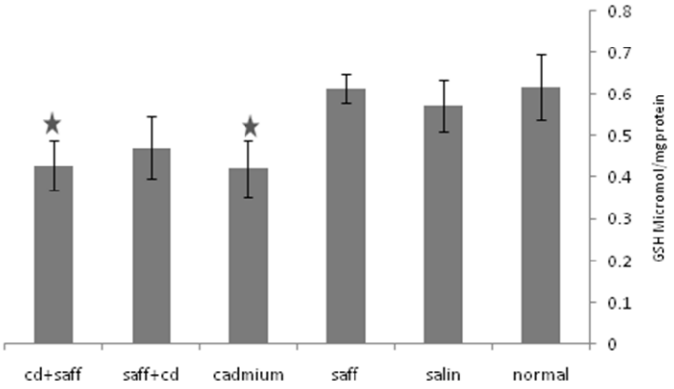
آنالیز آماری

پارامترهای مختلف Comet و میزان گلوتاتیون و مالون دی‌آلدهید بافت کبد در تمام گروه‌ها با کمک آزمون ONE WAY ANOVA مورد آنالیز قرار گرفت. سطح معنی‌دار بودن $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

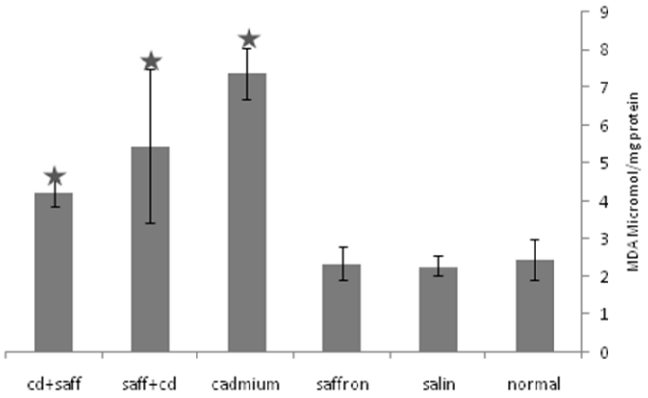
نتایج حاصل از سنجش گلوتاتیون بیانگر کاهش معنی‌دار در میزان گلوتاتیون کبدی در گروه تیمار شده با کادمیم و گروه تیمار شده با عصاره زعفران به صورت درمانی در مقایسه با

گروه سالین است ولی این اختلاف در گروه تیمار شده با عصاره زعفران به صورت درمانی کمتر است. میزان گلوتاتیون در گروه تیمار شده با عصاره زعفران به صورت پیش تیمار با گروه سالین تفاوت معنی‌داری ندارد و این نشان‌دهنده اثر زعفران به صورت پیش تیمار بر روی میزان گلوتاتیون کبد می‌باشد (شکل شماره ۱). نتایج حاصل از سنجش MDA کبدی نیز مشابه با گلوتاتیون است و با کاهش میزان گلوتاتیون اکسیداتیو استرس ایجاد شده و میزان MDA افزایش یافته است به طوری که میزان آن در گروه آلوده به کادمیم و گروه‌های تیمار شده با عصاره زعفران به صورت پیشگیری و درمانی در مقایسه با گروه سالین به طور معنی‌داری افزایش دارد. گروه‌های تیمار شده با عصاره زعفران به صورت قبل و بعد نسبت به گروه کادمیوم میزان MDA کمتری دارند ولی این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۱- میزان گلوتاتیون (µmole/mg protein) نمونه‌های کبدی در گروه‌های مختلف با استفاده از روش Teitz.

این نمودار نشان می‌دهد که میزان گلوتاتیون در گروه کادمیوم و گروه کادمیوم و زعفران اختلاف معنی‌داری با گروه سالین دارند ولی این اختلاف در گروه کادمیوم بیشتر است. میزان گلوتاتیون در نمونه‌های تیمار شده با زعفران و کادمیوم نسبت به گروه سالین اختلاف معنی‌دار ندارد که این نشان‌دهنده اثر زعفران به صورت پیش تیمار در میزان گلوتاتیون می‌باشد. (cd=cadmium و saff=saffron) ★ به معنای اختلاف معنی‌دار با سایر گروه‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵) (n=٦)

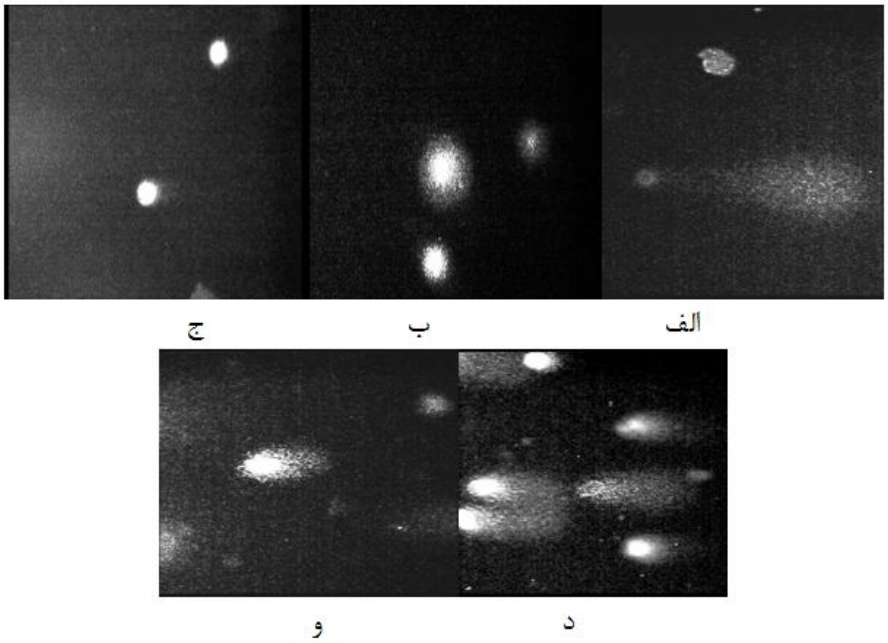


شکل شماره ۲- میزان مالون دی‌آلدهید (µmole/mg protein) در نمونه‌های کبدی موش قبل و بعد از تیمار با عصاره زعفران با استفاده از روش Uchiyama و Mihars.

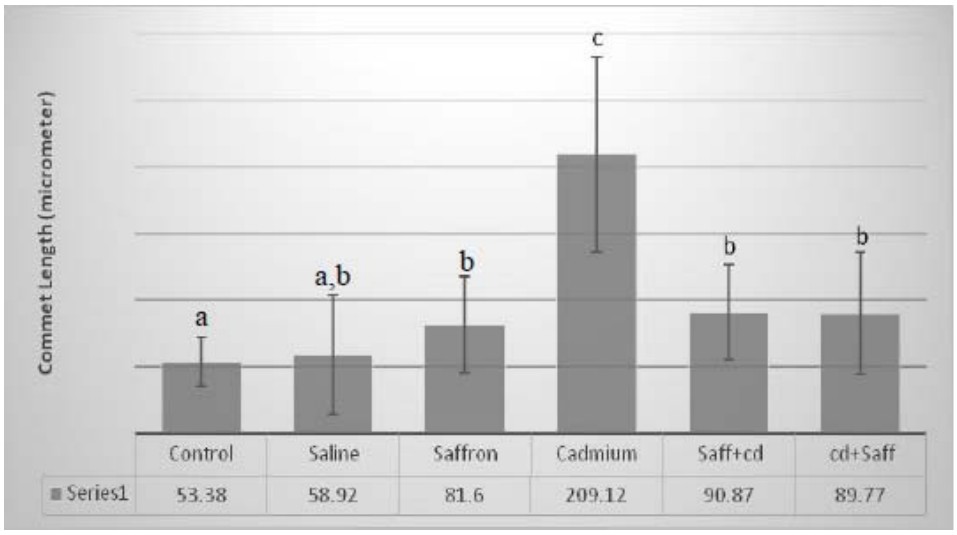
این نمودار نشان می‌دهد که گروه‌های نرمال، سالین و زعفران اختلاف معنی‌داری با گروه‌های کادمیوم و زعفران و کادمیوم دارند. میزان مالون دی‌آلدهید در نمونه‌های تیمار شده با زعفران به صورت pre و post نسبت به گروه کادمیوم کمتر است ولی این اختلاف معنی‌دار نیست. ★ به معنای اختلاف معنی‌دار با سایر گروه‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵) (n=٦)

نتایج حاصل از الکتروفورز سلول

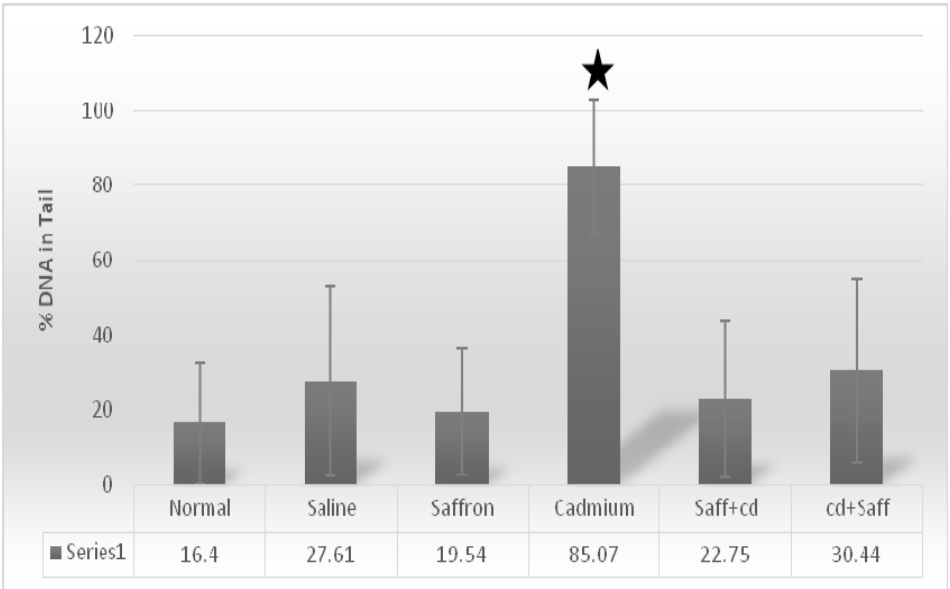
در صورت شکست زنجیره DNA در سلول، پس از لیز کردن غشاء هسته قطعات DNA در میدان الکتریکی حرکت کرده در حالی که بخش تخریب نشده DNA ثابت مانده و شکل ستاره دنباله‌دار حاصل می‌شود میزان حرکت کلی را تحت عنوان طول کامت (CL) بر حسب میکرومتر بیان می‌شود و میزان آن تابع میزان تخریب DNA است. همچنین فاصله طی شده توسط DNA از هسته سلول را تحت عنوان دنباله (CT) بیان می‌شود که هم اندازه حرکت و هم میزان DNA موجود در دنباله بیانگر شدت تخریب DNA است. در مطالعه حاضر سلول‌های مورد مطالعه در نمونه‌های تیمار شده با کادمیم و کادمیم با زعفران الکتروفورز تک سلولی شد، در حالی که نمونه کنترل، شم و زعفران هیچ‌گونه حرکتی در الکتروفورز نداشتند (شکل شماره ۳). نتایج حاصل از CL بیانگر افزایش معنی‌دار آن در گروه تیمار شده با کادمیم در مقایسه با گروه نرمال است و تیمار گروه کادمیم با عصاره زعفران موجب کاهش معنی‌دار در CL در مقایسه با گروه کادمیم می‌شود (شکل شماره ٤). مقایسه میزان DNA در CT نیز افزایش معنی‌دار در میزان DNA در CT در نمونه‌های تیمار شده با کادمیم در مقایسه با نمونه‌های تیمار شده با عصاره زعفران به صورت قبل و بعد تیمار را نشان می‌دهد (شکل شماره ٥). مقایسه میزان DNA در ناحیه سر (CH) کاهش معنی‌دار در در میزان DNA در CH در نمونه‌های تیمار شده با کادمیم در مقایسه با نمونه‌های تیمار شده با عصاره زعفران به صورت قبل و بعد تیمار را نشان می‌دهد (شکل شماره ٦).



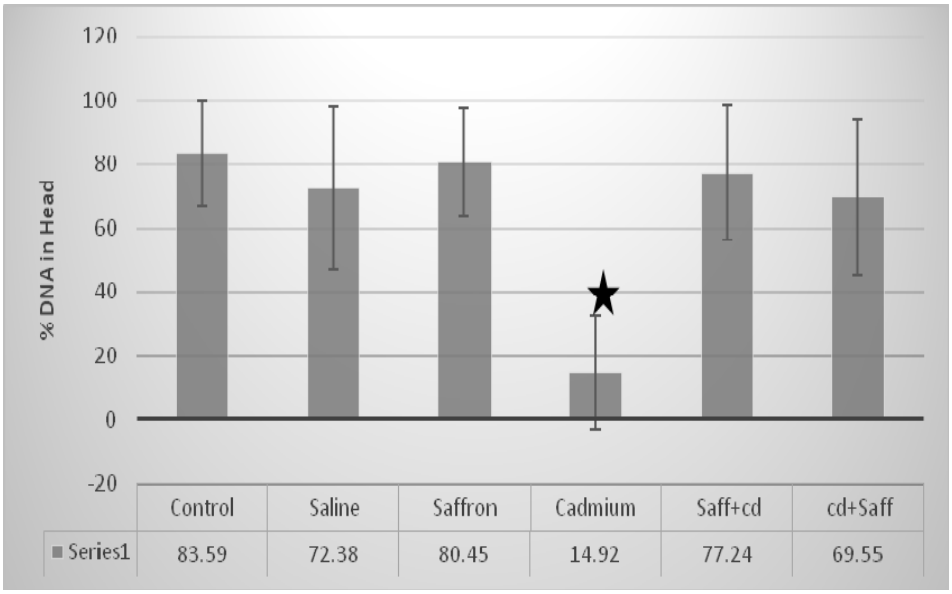
شکل شماره ۳- نمونه عکس الکتروفورز تک سلولی از سلول‌های کلیوی. الف) سلول نرمال ب) سلول تیمارشده با زعفران ج) سلول تیمار شده با کادمیم د) سلول تیمارشده با زعفران +کادمیم و) سلول تیمارشده با کادمیم+ زعفران



شکل شماره ٤- نمودار مربوط به پارامتر CL بر حسب میکرومتر در گروه‌های مختلف بافت کلیه تیمار شده با کادمیوم و زعفران پس از الکتروفورز تک سلولی و بررسی با نرم‌افزار Comet score. با توجه به اینکه واریانس داده‌ها هموژن نیست. برای مقایسه دو به دو از آزمون Dunnet استفاده شد که حروف یکسان به معنای همگروهی داده‌ها است. این نتایج نشان می‌دهد که گروه کادمیوم در یک گروه، گروه نرمال و شم در یک گروه و سایر گروه‌ها در یک گروه دیگر قرار می‌گیرند و این گروه‌ها با هم اختلاف دارند (p<۰/۰۵).



شکل شماره ٥- مقایسه درصد DNA در ناحیه CT در نمونه‌های مختلف کلیوی تیمار شده با کادمیوم و زعفران پس از Comet assay و بررسی با نرم‌افزار Comet score. این نمودار نشان می‌دهد که گروهی از موش‌ها که کادمیوم دریافت کرده‌اند به طور معنی‌داری درصد DNA بیشتری در ناحیه CT در مقایسه با سایر گروه‌ها دارند. ★ به معنای اختلاف معنی‌دار با سایر گروه‌ها می‌باشد. دیگر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار با هم ندارند. (مقایسه دو به دو با آزمون Tukey انجام شده است) (p<۰/۰۵).



شکل شماره ٦- مقایسه درصد DNA در ناحیه CH در نمونه‌های مختلف کلیوی تیمار شده با کادمیوم و زعفران پس از الکتروفورز تک سلولی و بررسی با نرم‌افزار Comet score. این نمودار نشان می‌دهد که گروهی از موش‌ها که کادمیوم دریافت کرده‌اند به طور معنی‌داری درصد DNA کمتری در ناحیه Head در مقایسه با سایر گروه‌ها دارند. ★به معنای اختلاف معنی‌دار با سایر گروه‌ها می‌باشد. دیگر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار با هم ندارند. (مقایسه دو به دو با آزمون Tukey انجام شده است) (p<۰/۰۵).

بحث

آلودگی به صورت حاد و مزمن با کادمیوم منجر به بروز خطراتی برای سلامتی انسان می‌شود. به همین جهت در سالیان گذشته مورد توجه محققین قرار گرفته و گزارش‌های متنوعی مبنی بر تأثیرات سمی آن ارائه شده است. در سال ۲۰۰۱ والورد (Valverde) و همکارانش طی گزارشی ژنوتوکسیسیتی ناشی از کادمیوم در DNA کلیه موش را حاصل تأثیر غیرمستقیم کادمیوم و افزایش سطح رادیکال‌های آزاد در ارگان‌های مختلف موش ذکر نمودند نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز بیانگر ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت کلیه است و افزایش زعفران احتمالاً از طریق تأثیرات آنتی‌اکسیدانی موجت کاهش رادیکال‌های آزاد و عوارض ژنوتوکسیسیتی ناشی از آن می‌شود [۱۹]. در سال ۱۹۹۸ فاسانیا (Fasania) و همکارانش طی تحقیقی که بر روی ژنوتوکسیسیتی و شکستگی DNA ایجاد شده توسط کادمیوم انجام دادند به این نتیجه رسیدند که کادمیوم در ارگان‌های مختلف موش موجب ایجاد شکستگی در DNA می‌شود که این شکستگی در سلول‌های کلیه و به دنبال آن در سلول‌های کبد از سایر ارگان‌ها بیشتر است [۲۰]. همچنین هانگ (Hung) و همکارانش ایجاد شکستگی در DNA کلیه یک نوع ماهی آب‌های شیرین توسط کادمیوم گزارش کردند که در الکتروفورز DNA این سلول‌ها حالت نردبانی کلاسیک ایجاد می‌کرد که احتمالاً به دلیل افزایش فعالیت داکسی ریبو نوکلئازها یا مهار فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن است. با توجه به نتیجه پژوهش‌های گزارش شده در این مطالعه بافت کلیه به عنوان بافتی که تأثیرات ژنوتوکسیسیتی کادمیوم در آن ثابت شده بود، انتخاب شد و نتایج حاصل از تجویز کادمیوم با استفاده از روش الکتروفورز تک سلولی مشابه نتایج سایر پژوهش‌ها بیانگر اثرات شدید اکسیداتیو و ژنوتوکسیسیتی کادمیوم بود [۲۱]. زعفران به عنوان یک گیاه دارویی در طی سالیان متمادی به عنوان داروی ضدسرطان و همچنین در بیماری‌های اسهال خونی، سرخک، تب، یرقان، بزرگ شدن طحال، عفونت مجاری ادراری، وبا، دیابت، تشنج و بیماری‌های التهابی ودرمان بیماری‌های پوستی و افسردگی نیز به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است [۲٤-۲۲].

همچنین زعفران به عنوان عامل شیمیای پیشگیری کننده از استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط عوامل ژنوتوکسیک جلوگیری می‌کند [١٤] و با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانتی قوی دارای اثرات حفاظتی برای سلول و عصب می‌باشد [٢٦، ٢٥]. زعفران با کاهش نیتریک اکسید و افزایش نسبت T helper 1/ T helper 2 در بهبود بیماری‌های درگیرکننده سیستم ایمنی مثل آسم نقش دارد [٢٧]. در سال ٢٠١١ پریزاده و همکاران اثر عصاره آبی زعفران را بر تولید نیتریک اکسید در دو رده سلولی سرطانی HepG2 و Hep2 بررسی کردند و نشان دادند که عصاره آبی زعفران احتمالاً با کاهش غلظت نیتریک اکسید اثرات سایتوتوکسیک بر روی رده‌های سلولی مذکور دارد [٢٩، ٢٨]. حسین‌زاده و همکارانش در سال ٢٠٠٨ در گزارشی عنوان کرده‌اند که نه تنها دوزهای بالای زعفران هیچ‌گونه تخریبی روی DNA ندارد بلکه تخریب DNA ناشی از متیل متان سولفونات در بافت‌های مختلف موش نیز به طور معنی‌داری با تجویز عصاره زعفران به صورت پیش تیمار به صورت وابسته به دوز مهار می‌شود [٣٠]. در سال ٢٠١٢ لیناردا‌کی (Linardaki) و همکاران اثر حفاظتی زعفران در مقابل سمیت ناشی از آلومینیوم در سیستم عصبی موش Balb/c را بررسی کردند و نشان دادند که زعفران از تغییرات ایجاد شده در فعالیت آنزیم‌های مونوآمینواکسیداز و استیل کولین استراز و سطوح مالون دی‌آلدهید و گلوتاتیون توسط آلومینیوم جلوگیری می‌کند [٣١]. در سال ٢٠١٣ بطحایی و همکاران در مطالعه‌ای تأثیر عصاره آبی زعفران بر سرطان معده القا شده در رت را بررسی کردند و نشان دادند که عصاره آبی زعفران از پیشرفت سرطان معده در رت جلوگیری می‌کند [٣٢]. در سال ٢٠١٤ اسدی و همکاران تأثیر زعفران را در بهبود پارامترهای اسپرم‌های اپیدیدم رت‌های مسموم شده با کادمیوم را بررسی کردند. آنها نشان دادند که کادمیوم باعث کاهش تعداد، تحرک و درصد زنده بودن اسپرم‌ها می‌شود و زعفران به طور معنی‌داری از این تغییر جلوگیری می‌کند [٣٣].

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر از عصاره آبی زعفران که حاوی کروسین (طبق گزارش آزمایشگاه تهیه‌کننده حاوی ٢٣ درصد کروسین است) است استفاده شد. نتایج الکتروفورز تک سلولی کاهش معنی‌دار در همه پارامترهای مورد بررسی را در گروه‌های تیمار شده با عصاره زعفران نشان می‌دهد. اثرات حاصل از پیش تیمار با زعفران را می‌توان به نقش آنتی‌اکسیدانی آن و پیشگیری از تولید رادیکال آزاد و در نهایت مهار پیشگیری از تخریب DNA نسبت داد ولی با توجه به کاهش معنی‌دار در پارامترهای کامت در تجویز عصاره به صورت پس تیمار، احتمالاً عصاره آبی زعفران از طریق مکانیسم دیگری موجب ترمیم ضایعات ایجاد شده عمل می‌کند. با توجه به نتایج حاصل انتظار می‌رود که مصرف خوراکی زعفران و داروهای حاصل از اجزای آن به عنوان مکمل غذایی توسط افرادی که در معرض آلودگی با فلزات سنگین به ویژه کادمیوم قرار دارند، به عنوان یک ماده محافظ مناسب عمل کرده و در پیشگیری از بروز عوارض بدخیم مؤثر خواهد بود.

منابع

1. Kubo I and Kinst-Hori. Flavenols from saffron flower: tyrosine inhibitory activity and inhibition mechanism. *J. Agric Food Chem*. 1999; 47 (10): 4121 - 5.

2. Ferguson LR. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in dait mutation. *Mutat Res.* 1994; 307 (1): 395 - 410.

3. Jarup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull*. 2003; 68: 167 - 82.

4. Godt J, Scheiding F, Grosse-Siestrup Ch, Esche V, Brandenburg P, Reich A and Groneberg D. The toxicity of cadmium and resulting hazars for human health. *J. Occupational Medicine and Toxicol*. 2006; 1: 22.

5. Orlowski C and Piotrowski JK. Biological levels of cadmium and zinc in the small intestine of non-occupationally exposed human subjects. *Hum. Exp. Toxicol.* 2003; 22 (2): 57 - 63.

6. Goyer RA, Liu J and Waalkes MP. Cadmium and cancer of prostate and testis. *Biometals* 2004; 17 (5): 555 - 58.

7. Mousavi S H, Tayarani N Z and Parsaee H. Protective effect of saffron extract and crocin on reactive oxygen species-mediated high glucose-induced toxicity in PC12 Cells. *Cell. Mol. Neurobiol*. 2009; 30 (2): 185 - 91.

8. Heidary M, Reza Nejadi J, Delfan B, Birjandi M, Kaviani H and Givrad S. Effect of saffron on semen parameters of infertile men. *Urol.* 2008; 5 (4): 255 - 9.

9. Karami M, Bathaie S.Z, Tiraihi T, Habibi Rezaie M, Arab-Kheradmand J and Faghihzadeh S. The Effect of Crocin and its Mechanism of Action on ChronicPain Induced by Spinal Cord Contusion in a Rat Model. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiol*. 2013; 16 (1): 63 - 73.

10. Mousavi S.Z and Bathaie S.Z. Historical uses of saffron: Identifying potential new avenues for modern research. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 2011; 1 (2): 57 - 66.

11. Abdullaev FI and Espinosa-Aguirre. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detection and Prevention* 2004; 28 (6): 426 - 32.

12. Chatterjee S, Poduval TB, Tilak JC and Devasagayam TP. A modified, economic, sensitive method for measuring total antioxidant capacities of human plasma and natural compounds using Indian saffron (*Crocus sativus*). *Clin.Chim.Acta*. 2005; 352 (1-2): 155 - 63.

13. Zaree Mahmudabadi A, Masoomi Karimi, Sharif F and Jafari Sani M. Protective effect of saffron (*Crocus sativus*) on cadmium chloride-induced Genotoxicity on mice macrophage and Lymphocyte cells. *Quarterly of the Horizon of Medical Sci*. 2013; 18 (5): 209 - 16.

14. Boskabady M.H, Tabatabaee A and Byrami G. The effect of the extract of Crocus sativus and its constituent safranal, on lung pathology and lung inflammation of ovalbumin sensitized guinea-pigs. *Phytomedicine* 2012; 19: 904 - 11.

15. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem*. 1976; 72 (1-2): 248 - 54.

16. Tietze F. Enzimic method for quantitative determination of total and oxidized gluthatione: application to mamelian blood and other tissues. *Anal Biochem*. 1969; 27 (3): 502 - 22.

17. Uchiyama M and Mihars M. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid. *Ann.Biochem*. 1978; 86 (1): 271 - 8.

18. Speit G and Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in Molecular Biol*. 200; 291: 85 - 95.

19. Valverde M, Trejo C and Rojas E. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis* 2001; 16 (3): 265 - 70.

20. Fasanya-Odewumi C, Latinwo LM, Ikediobi CO, Gilliard L, Sponholtz G, Nwoga J, Stino F, Hamilton N and Erdos GW. The genotoxicity and cytotoxicity of dermally-administered cadmium: effects of dermal cadmium administration. *Int. J. Mol. Med*. 1998; 1 (6): 1001 - 6.

21. Hong F, Wu C, Liu C, Wu K, Gao F and Yang F. Interaction mechanism between Cd2+ions and DNA from the kidney of the silver crucian carp. *Biol. Trace Elem. Res*. 2006; 110 (1): 33 - 42.

22. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L). *Exp. Biol. Med. Maywood* 2002; 227 (1): 20 - 5.

23. Anti H and Khosravan V. Anticonvulsant

effects of aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus* L. stigmas in mice. *Arch Irn. Med*. 2002; (1): 44 - 7.

24. Babaei A, Arshami J, Haghparast A and Danesh Mesgaran M. Effects of saffron (*Crocus sativus*) petal ethanolic extract on hematology, antibody response, and spleen histology in rats. *A.J.P*. 2014; 4 (2): 103 - 9.

25. Linejad B, Ghorbani A and Sadeghnia HR. Effects of combinations of curcumin, linalool, rutin, safranal, and thymoquinone on glucose/serum deprivation-induced cell death. *A.J.P*. 2013; 3 (4): 321 - 8.

26. Gholamnezhad Z, Koushyar H, Byrami G and Boskabady MH. The Extract of *Crocus sativus* and Its Constituent Safranal, Affect Serum Levels of Endothelin and Total Protein in Sensitized Guinea Pigs. *Iran J. Basic Med. Sci*. 2013; 16: 1022 - 6.

27. Byrami G, Boskabady MH, Jalali S and Farkhondeh T. The effect of the extract of *Crocus sativus* on tracheal responsiveness and plasma levels of IL-4, IFN-γ, total NO and nitritein ovalbumin sensitized Guinea-pigs. *J. Ethnopharmacol*. 2013; 147 (2): 530 - 5.

28. Boskabady MH, Tamijani SMS, Rafatpanah H, Rezaei A and Alavinejad A. The Effect of *Crocus sativus* Extract on Human Lymphocytes' Cytokines and T Helper 2/T Helper 1 Balance. *J. Med. Food* 2011; 14 (12): 1538 - 45.

29. Parizadeh MR, Ghafoori Gharib F, Abbaspour AR, Tavakol Afshar J and Ghayour Mobarhan M. Effects of aqueous saffron extract on nitric oxide production by two human carcinoma cell lines: Hepatocellular carcinoma (HepG2) and laryngeal carcinoma (Hep2). *A.J.P*. 2011; 1 (1): 43 - 50.

30. Hosseinzadeh H, Abootorabi A and Sadeghnia HR. Protective Effect of *Crocus sativus* Stigma Extract and Crocin (trans-crocin 4) on MethylMethanesulfonate–Induced DNA Damage in Mice Organs. *DNA and Cell Biol.* 2008; 27 (12): 657 - 64.

31. Zacharoula I. Linardaki, Malvina G. Orkoula, Alexandros G. Kokkosis, Fotini N. Lamari and Marigoula Margarity. Investigation of the neuroprotective action of saffron (*Crocus sativus* L.) in aluminum-exposed adult mice through behavioral and neurobiochemical assessment *Food and Chemical Toxicol.* 2013; 52: 163 - 70.

32. Bathaie S.Z, Miri, Mohaghegh M.A, Mokhtari-Dizaj M, Shahbazfar A.A and Hasanzadeh H. Saffron Aqueous Extract Inhibits the Chemically-induced Gastric Cancer Progression in the Wistar Albino Rat. *Iranian Journal of Basic Medical* Sci. 2013; 16 (1): 27 - 38.

33. Asadi M.H, Zafari F, Sarveazad A, Abbasi M, Safa M, Koruji M, Yari A and Alizadeh Miran R. Saffron Improves Epididymal Sperm Parameters in Rats Exposed to Cadmium. *Nephro - Urol Mon.* 2014; 6 (1): e12521.

The Study of Anti Genotoxic Effects of Saffron Aqueous Extract in Cadmium Chloride Exposed Mice Kidney by Comet Assay

Zaree A (Ph.D.)[1], Javadi HR (Ph.D. student)[2,3*], Adelipor M (M.Sc.)[1], Hojati Z (M.Sc.)[4], Kamali M (Ph.D.)[2], Bahadoran H (Ph.D.)[5]

1- Department of Biochemistry, School of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran
2- Nano Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran
3- National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
4- Department of Physiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
5- Department of Anatomy & Histology, School of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran
*Corresponding author: Tehran, Agdasiee, Baqiyatallah University of Medical Science, VelayatComplex, School of Medicine, Department of Biochemistry
Tel: +98-21-77101807, Fax: +98-21-22830262
E-mail: Javadihr83@yahoo.com, alizare80@yahoo.com

Abstract

Background: Cadmium and its derivatives are important environmental and occupational pollutant which stored in human kidney and liver. Cadmium is known as genotoxic, carcinogenic, mutagenic and DNA damaging agents. Crocus sativus L (Saffron) is used in Traditional medicine as anti tumorogenic and anti cancer agent.

Objective: The aim of this study was to evaluate the anti toxicity and anti genotoxicity effects of aqueous extracts of Crocus sativus stigmas in Swiss-Webster mice kidney. Methods: To investigate possible protective effects of saffron against chromosomal damage induced by cadmium chloride in kidney of mice, the animals randomly divided in six groups: normal, saline, saffron, saf+cad, cad+saf. Cadmium (30 µmol/kg) and aqueous extract of saffron (100mg/kg) was administered peritoneally for 3days. Cadmium toxicity was investigated by malondialdehyd (MDA) and glutathione (GSH) concentration in liver homogenate as an indicator of lipid per oxidation and oxidative stress. DNA damage in kidney was studied using alkaline single cell electrophoresis (comet assay).

Results: The results show that cadmium can induce significant cytotoxicity and genotoxicity in kidney. The DNA damage and cytotoxicity were significantly decreased in both pre and post treatment animals with aqueous extract of saffron. Moreover the results show that saffron has protective effects against oxidative stress and genotooxicity damage of cadmium.

Conclusion: Therefore, use of saffron as a diet complement may be suitable for protection in industrial workers which have exposed to cadmium.

Keywords: Cadmium, Comet assay, Cytotoxicity, Genotoxicity, Saffron