تأثیر عصاره اتانولی زعفران بر هیستوپاتولوژی و شاخص‌های آسیب بافت کبد در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

محمد رهبانی نوبر[1*]، داریوش مهاجری[2]، علی رضایی[3]، عادل رضائی مقدم[4]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، گروه زیست شناسی، اهر، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، ، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، تبریز، ایران
۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، تبریز، ایران
٤. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، باشگاه پژوهشگران جوان، اردبیل، ایران
** نویسنده مسئول مکاتبات: rahbanim@hotmail.com*

(دریافت مقاله: ۹۰/٦/۳۰، پذیرش نهایی: ۹۰/۹/۳)

چکیده

در این مطالعه اثر محافظتی عصاره اتانولی زعفران بر تغییرات بیوشیمیایی و پاتولوژی بافت کبد در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین مورد بررسی قرار گرفت. موش‌های صحرایی نر به تعداد ٤٠ سر به طور تصادفی به ٤ گروه ١٠ تایی شامل گروه‌های: ١- شاهد سالم، ٢- سالم تیمار با عصاره الکلی کلاله زعفران، ٣- دیابتی و ٤- دیابتی تیمار با عصاره الکلی کلاله زعفران تقسیم شدند. برای دیابتی کردن موش‌ها، استرپتوزوتوسین با تک دز ٦٥ mg/kg به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. از زمان شروع آزمایش، به گروه‌های تیمار با عصاره، عصاره به میزان ٤٠ mg/kg به مدت ٨ هفته به طور روزانه و به روش داخل صفاقی، به شکل محلول در سالین نرمال (١٠ ml /kg) تزریق شد. به گروه‌های شاهد نیز، نرمال سالین با روش مشابه تجویز گردید. بعد از ٨ هفته، شاخص‌های سرمی آسیب بافت کبد و هیستوپاتولوژی آن مورد بررسی قرار گرفت. موش‌های صحرایی دیابتی افزایش معنی‌دار شاخص‌های سرمی آسیب بافت کبد را در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند ($p<0/05$)، در حالی که در گروه دیابتی تیمار با عصاره الکلی کلاله زعفران، این شاخص‌ها در مقایسه با گروه دیابتی به‌طور معنی داری کاهش نشان داد ($p<0/05$). نتایج آسیب‌شناسی بافت کبد با یافته‌های بیوشیمیایی هم‌راستا بود. نتایج این مطالعه نشان داد عصاره زعفران دارای اثرات محافظتی از بافت کبد در دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین می‌باشد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۹۰، دوره ۵، شماره ۳، پیاپی ۱۹، صفحات: ۱۳۱۳-۱۳۰۵.

کلید واژه‌ها: دیابت، کبد، زعفران، بیومارکرهای آسیب کبد، هیستوپاتولوژی، موش صحرایی

مقدمه

دیابت ملیتوس یک بیماری متابولیکی جدی و شایع در سراسر جهان است پیش بینی می‌شود وقوع آن در سال ۲۰۲۵ تا ٥/٤٪ افزایش یابد (۲۳). این بیماری یک اختلال متابولیکی است که با هیپرگلیسمی مزمن شناخته شده و در ارتباط با متابولیسم کروهیدرات، پروتئین و چربی می‌باشد (۳۵). هیپرگلیسمی مزمن ناشی از نقص نسبی یا کامل انسولین، شاخص اصلی دیابت ملیتوس، می‌باشد. دیابت ملیتوس باعث بروز عوارضی در کلیه، چشم، اعصاب محیطی و فشار خون

می‌باشد (۲۰ و ٤۰). بیماری دیابت به عنوان یکی از عوامل اصلی شیوع اختلالات کبدی نیز محسوب می‌شود. بسیاری از تحقیقات ارتباط اختلالات کبدی با مرگ و میر در دیابت تیپ ۲ را نشان می‌دهند (۹).

کبد یک عضو حیاتی در بدن است که در متابولیسم کربوهیدارت، پروتئین و چربی، حفظ هومئوستاز بدن، دفع مواد سمی، حذف بیلی روبین و اسیدهای صفراوی نقش مهمی را ایفا می‌کند. حفظ ثبات سطح گلوکز خون توسط برداشت و ذخیره‌سازی گلوکز به صورت گلیکوژن، گلیکوژنزیس، گلیکوژنولیز، گلوکونئوژنز از وظایف کبد به شمار می رود (٤۷ و ۵۳) و نیز در مطالعات دیگری نشان داده شده است که کبد در حفظ سطوح پلاسمای گلوکز بسیار تأثیر گذار می‌باشد (۳٦).

هیپرگلیسمی باعث از بین رفتن تعادل واکنش‌های اکسیداسیونی در داخل سلول‌ها مخصوصاً در کبد می‌شود (۱۵). در شرایط فیزیولوژیک بین فرایندهای اکسیداسیون و احیاء تعادل برقرار می‌باشد اما زمانی که مقدار رادیکال‌های آزاد تولیدی بیشتر از توانایی مقابله سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن باشد، وضعیتی به نام استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد (٤٤). رادیکال‌های آزاد با تخریب سیستم آنتی اکسیدانی باعث مختل شدن عملکرد سلول‌ها از طریق استرس اکسیداتیو می‌شوند که متعاقباً باعث بروز پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (٤۹). پراکسیداسیون لیپیدی در موش‌های دیابتی شده در حد بالایی گزارش شده است (۵٤).

تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS)، عامل بسیاری از بیماری‌ها از جمله هایپوکسی، آترواسکلروزیس، هایپرکلسترولمی، ایسکمی و نارسایی قلبی می‌باشد (٤٦ و ۵۲). در بیماران دیابتی افزایش استرس اکسیداتیو باعث آسیب به سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی شده که این مقدمه‌ای برای بروز عوارض ناشی از دیابت می‌باشد (۲۹). یافته‌های آزمایشگاهی و بالینی بسیاری مبنی بر بروز هر دو تیپ دیابت (تیپ ۱ و تیپ ۲) توسط ROS وجود دارد. به طور معمول شدت این ناهنجاری اکسیداتیو با حضور سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان تنظیم می‌گردد (٤۱). تغییرات آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان نظیر، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دسموتاز در دیابت کاملاً به اثبات رسیده است (۲۹). وضعیت آنتی اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی در بافت کبد توسط Feillet-Coudray و همکارانش (۱۹۹۹) در دیابت تجربی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۳). در طی مطالعه دیگری توسط Harris و همکارانش (۲۰۰۵) عوامل ضددیابتی را به عنوان علت کاهش سطوح بیومارکرهای سرم مربوط به آسیب‌های کبدی معرفی کرد (۱۹). اما این عوامل می‌توانند اثرات جانبی جدی را در بر داشته باشند (۵).

در طب سنتی از گیاهان گوناگونی در درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند بیماری‌های التهابی، اختلالات کلیوی و کبدی، دیابت ملیتوس و اختلالات تنفسی استفاده می‌شود (٤۲، ٤۳ و ٤۵).

به‌نظر می‌رسد که درمان به‌وسیله گیاهان دارویی تأثیر مثبت و مفیدی در درمان هایپرگلیسمی و نیز آسیب کبد دارد. به دلیل خواص گیاهان دارویی از جمله عوارض جانبی کم در کاربردهای تجربی، قیمت مناسب و قابل دسترسی بود نشان، توجه بسیاری از محققان را برای مطالعات بیشتر به خود معطوف کرده است (۱۷).

امروزه مشتقات گیاهان داروئی استخراج شده به طور چشمگیری برای درمان بسیاری از موارد پزشکی مورد استفاده قرار گرفته می‌شود. اهمیت بیشتر این مواد به دلیل تأثیرات محافظتی آنها به‌عنوان آنتی اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد (۱٤). زعفران (Dried stigmas of Crocus sativus) جزء یکی از گران‌بهاترین ادویه‌جات محسوب می‌شود. این گیاه متعلق به خانواده زنبق است که به طور گسترده‌ای علاوه بر ایران در کشورهای حاشیه دریای مدیترانه از اسپانیا، فرانسه و یونان تا چین و هند کاشته می‌شود. تولید سالیانه زعفران در

جهان حدوداً ۲۵۰ تن می‌باشد که بیش از ۸۰ درصد آن در ایران برداشت می‌شود (۱۸). مواد مؤثر اصلی زعفران کروسین، کروستین و سافرانال می‌باشند (۲۵). این گیاه در طب سنتی به عنوان تسهیل کننده هضم غذا، اشتهاآور، آرام بخش، معرق، خلط آور و درمان‌کننده اختلالات کبد و کیسه صفرا، اسپاسم، کرامپ، التهاب مخاط بینی، آسم، برونشیت، تب، استفراغ، سرماخوردگی، اختلالات قلبی-عروقی و سرطان به کار رفته است (٤ و ٥٠). همچنین گزارش شده است که زعفران دارای خواص ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و ضد سرطان می‌باشد (۲ و ۳). عصاره زعفران اثر محافظتی بر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو بر هپاتوسیت اولیه را دارد. همچنین، باعث مهار آفلاتوکسین B_1 در آسیب کبد شده و تأثیر مثبتی نیز بر آسیب مثانه ناشی از سیکلوفسفامید دارد (١٦). در تحقیق دیگری توسط Assimopoulou و همکارانش در سال ۲۰۰۵ اثرات آنتی اکسیدانی و پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد توسط این گیاه را نشان دادند (٦). در دو تحقیق جداگانه دیگر توسط مهاجری و همکاران در سال ۲۰۰۸ و ۲۰۰۹ خاصیت آنتی دیابتی و آنتی هیپرگلیسمی زعفران گزارش شده است (۳۱ و ۳۲).

این مطالعه به منظور بررسی اثرات محافظت کنندگی عصاره اتانولی زعفران بر آسیب کبد ناشی از دیابت تجربی توسط استرپتوزوتوسین در موش‌های صحرایی طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: استرپتوزوتوسین از شرکت Sigma (St. Louis, MO, USA) و بقیه مواد شیمیایی مورد استفاده از انستیتو Nanjing Jiancheng (Nanjing Bioengineering Institute, Nanjing, China) خریداری شدند.

تهیه عصاره زعفران: زعفران مورد استفاده در این بررسی از شرکت نوین زعفران (مشهد، ایران) تهیه گردید. برای تهیه عصاره، ابتدا زعفران به صورت پودر تهیه و سپس به کمک حلال اتانولی (۱۰ گرم پودر در ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درجه) اقدام به عصاره‌گیری توسط روش ماسراسیون (Maceration) شد. عمل عصاره‌گیری سه بار تکرار گردید و عصاره‌های حاصله توسط دستگاه روتاری اواپوراتور تحت خلأ کاملاً خشک گردید. عصاره خشک شده تا زمان استفاده در یخچال و تحت شراط انجماد نگه‌داری شد.

القاء دیابت: دیابت با تزریق داخل وریدی استرپتوزوتوسین (٦٥ mg/kg.bw.) به ورید دم القا شد. STZ در ۰/۱ مول بافر سیترات سدیم سرد و در pH=٤/٥ حل شد. بعد از ۱۸ ساعت حیوانات ناشتا با سطح گلوکز خون در محدوده mg/dl ۲۵۰-۱۲۰ دیابتی در نظر گرفته شد (۱۱). قند خون ناشتا توسط دستگاه گلوکومتر (Accuchek sensor- Roche Diagnosis, Germany) مورد سنجش قرار گرفت.

طرح آزمایش: موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار به تعداد٤٠ سر با وزن حدود ۲۰۰-۱۸۰ گرم تهیه و به طورتصادفی به ٤ گروه۱۰تایی شامل گروه‌های: ۱- شاهد سالم، ۲- سالم تیمار با عصاره الکلی کلاله زعفران (٤٠mg/kg)، ۳- دیابتی و ٤- دیابتی تیمار با عصاره الکلی کلاله زعفران (٤٠mg/kg) تقسیم شدند. از زمان شروع آزمایش به گروه‌های تیمار با عصاره، عصاره به میزان ٤٠ mg/kg به مدت ۸ هفته به طور روزانه و به روش داخل صفاقی، به شکل محلول در سالین نرمال (kg/ ml ۱۰) تزریق شد. به گروه های شاهد نیز، نرمال سالین با روش مشابه تجویز گردید. در طول آزمایش موش‌ها دسترسی کامل به آب و غذای استاندارد را داشتند. در این مطالعه کلیه ملاحظات اخلاقی روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تائید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز بود.

بعد از پایان ۸ هفته، موش‌ها با اتر بیهوش و نمونه‌گیری انجام شد. نمونه خون از سینوس پشت کره چشم (Retro-orbital plexus) جمع‌آوری و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و سپس سرم آنها جداسازی شد. بیومارکرهای سرمی عملکرد کبد از

جمله سطوح سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز(AST)، آلکالین فسفاتاز (AP)، آلبومین و بیلی روبین تام (۲٤، ۲۷، ۲۸ و ۳۸) با استفاده از کیت‌های فراهم شده اندازه‌گیری شدند.

برای انجام مطالعات آسیب‌شناسی، قسمت کوچکی از بافت کبد نمونه‌گیری شد و در فرمالین بافری ۱۰ درصد تثبیت و جهت رنگ‌آمیزی معمول هماتوکسیلین-ائوزین، به طریقه مرسوم پاساژ داده شد. سپس نمونه‌ها در پارافین قالب‌گیری شده و به ضخامت ۵ میکرون برش داده شده و در نهایت رنگ‌آمیزی شدند. از میکروسکوپ نوری NIKON مدل ECLIPSE E200 برای بررسی تغییرات بافتی بهره گرفته شد.

تحلیل آماری: برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS-13 استفاده شد. برای تعیین نرمال بودن توزیع پراکندگی داده‌ها از آزمون آماری کلموگروف-اسمیرنف (Kolmogrov-Smirnov) استفاده شد. داده‌های به‌دست آمده کمّی توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) مورد تحلیل قرار گرفت. $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد و مقادیر به‌دست آمده به صورت میانگین±انحراف استاندارد (mean±SEM) گزارش شدند.

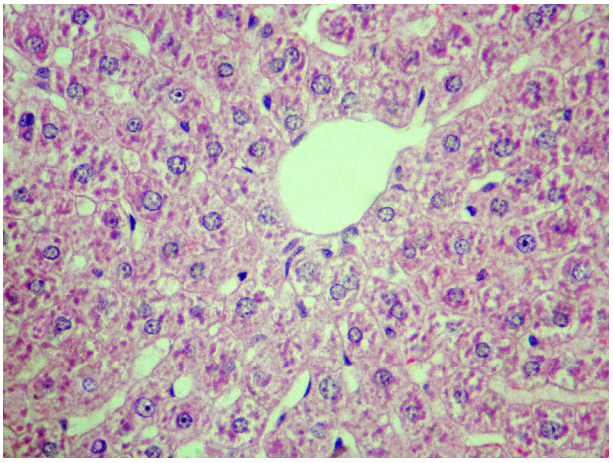
یافته‌ها

جدول ۱ سطوح سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (AP)، آلبومین و بیلی روبین تام را در چهار گروه نشان می‌دهد. مقادیر سرمی ALT، AST، AP و بیلی روبین تام در گروه دیابتی در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). این پارامترها در گروه دیابتی تیمار با عصاره الکلی کلاله زعفران به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه دیابتی کاهش یافته بود ($p<۰/۰۵$). سطح سرم آلبومین در گروه دیابتی به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته بود و این پارامتر در گروه دیابتی تیمار با عصاره در مقایسه با گروه دیابتی به طور معنی‌داری افزایش یافته بود ($p<۰/۰۵$). تیماره با عصاره در گروه سالم تیمار با عصاره الکلی کلاله زعفران هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در پارامترهای یاد شده ایجاد نکرد. در آسیب‌شناسی بافتی کبد از گروه شاهد، بافت کبد کاملاً سالم و طبیعی بود (نگاره ۱). در گروه سالم تیمار با عصاره الکلی کلاله زعفران نیز هیچگونه تغییر پاتولوژیکی خاصی در بافت کبد در اثر تیمار با عصاره ایجاد نشده بود (نگاره ۲). در گروه موش‌های دیابتی تغییر چربی کاملاً مشخصی در نواحی مرکز لوبولی (Centrilobular portions) ایجاد شده بود (نگاره ۳). در بافت کبد گروه دیابتی تیمار با عصاره الکلی کلاله زعفران، تغییر پاتولوژیک قابل توجهی مشاهده نشد (نگاره ٤).

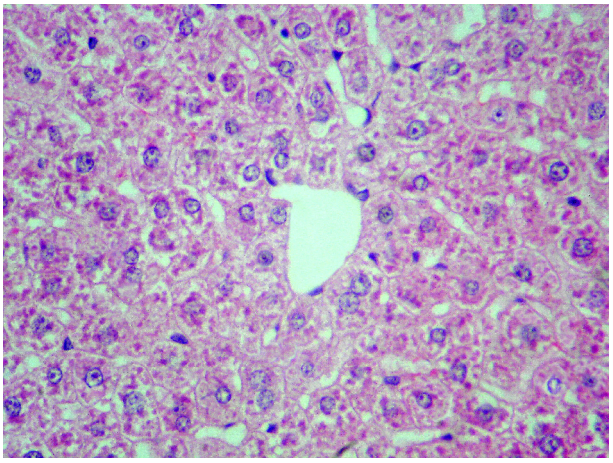
جدول ۱- مقایسه تأثیر عصاره الکلی کلاله زعفران بر شاخص‌های سرمی آسیب بافت کبد در موش‌های صحرایی مورد مطالعه

گروه‌ها	فراسنجه‌های مورد آزمایش				
	آلانین آمینوترانسفراز (U/L)	آسپاراتات آمینوترانسفراز (U/L)	آلکالین فسفاتاز (U/L)	بیلی‌روبین تام (Mg/dl)	آلبومین (g/dl)
شاهد سالم	٥٤/٨٢ ± ٢/٣٦	٦٨/٩ ± ٢/٣١	١٩٤/٨٧ ± ٩	٠/٨١ ± ٠/٠٣	٤/٣٨ ± ٠/٣٢
سالم تیمار با عصاره الکلی کلاله زعفران	٥٥/٩ ± ٢/٧٥	٦٧/٢١ ± ٢/٨٤	٢٠٣/٥٥ ± ٨/٨	٠/٨٧ ± ٠/٠٦	٤/٣ ± ٠/٥٦
دیابتی	٧٦/٤٥ ± ٣/٩٥[a]	١٠١/١٩ ± ٣/٩٦[a]	٢٧٠/٢ ± ١٠/٥[a]	١/٢١ ± ٠/٠٨[a]	٣/١٧ ± ٠/٢٥[a]
دیابتی تیمار با عصاره الکلی کلاله زعفران	٥١/٣ ± ٢/٦٤[b]	٧٠/١٩ ± ٣/١١[b]	٢١٤/٧٣ ± ٩/٩[b]	٠/٨٩ ± ٠/٠٤[b]	٤/٢٩ ± ٠/٤١[b]
آنالیز واریانس یکطرفه	*P*=٠/٠٠	*P*=٠/٠٠	*P*=٠/٠٠	*P*=٠/٠٠	*P*=٠/٠٠

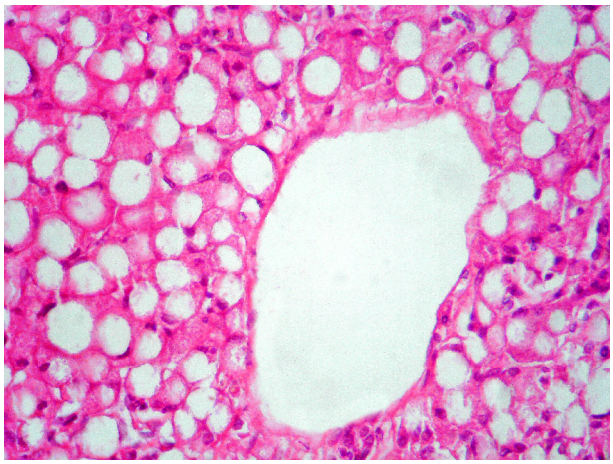
*$p<$٠/٠٥، a: در مقایسه با گروه شاهد، b: در مقایسه با گروه دیابتی



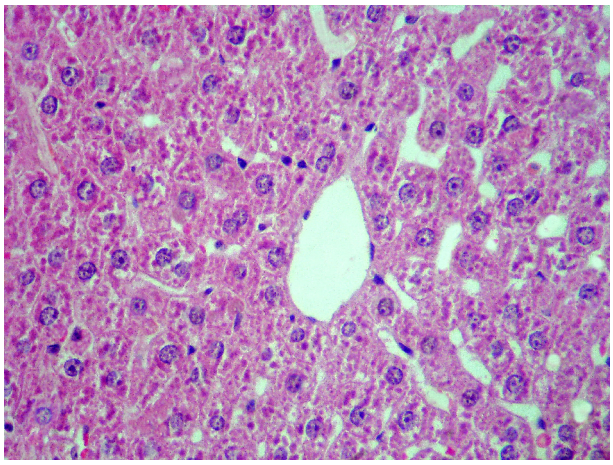
نگاره ۱- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرایی متعلق به گروه شاهد. ساختار بافت کبد کاملاً طبیعی می‌باشد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ×١٠٠).



نگاره ۲- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرایی متعلق به گروه سالم تیمار با عصاره الکلی کلاله زعفران. ساختار بافت کبد کاملاً سالم بوده و تغییر پاتولوژیک خاصی در آن ایجاد نشده است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ×١٠٠).



نگاره ۳- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرایی متعلق به گروه دیابتی. تغییر چربی هپاتوسیت‌ها در نواحی مرکز لبولی کبد به‌صورت تشکیل ماکروووزیکول‌های انباشته از چربی مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ×۱۰۰).



نگاره ٤- نمای ریزبینی از بافت کبد یک موش صحرایی متعلق به گروه دیابتی تیمار با عصاره الکلی کلاله زعفران. تغییر پاتولوژیک قابل توجهی در هپاتوسیت‌ها و ساختار بافت کبد مشاهده نمی‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ×۱۰۰).

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژی در این مطالعه نشان‌دهنده اختلال در عملکرد و ساختار کبد در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین می‌باشد. در این مطالعه افزایش معنی‌دار آنزیم‌های شاخص‌های آسیب کبدی (ALT، ALP و AST) و همچنین بیلی‌روبین و کاهش معنی‌دار آلبومین در گروه دیابتی در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد که این نتایج کاملاً با یافته‌های Ramesh و همکاران در سال ۲۰۰۷ همخوانی دارد (۳۷). در افراد دیابتی نوع ۲ تغییرات غیر طبیعی زیادی در شاخص‌های آسیب عملکرد کبد در مقایسه با اشخاصی که دیابت ندارند وجود دارد (۱۹) که با نتایج این مطالعه در توافق می‌باشد. در این مطالعه، تیمار روزانه موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت به‌وسیله عصاره زعفران، شرایط بیوشیمیایی سرم و آسیب بافت کبد آنها را به طور معنی‌دار بهبود بخشید.

به طور معمول سنجش شاخص‌های عملکرد کبد (Liver function tests; LFTs) برای تشخیص بیماری‌ها و ارزیابی تاثیرات داروهایی که احتمالا دارای اثرات سمی هستند، مورد استفاده قرار می‌گیرد. معمول‌ترین این شاخص‌ها آمینوترنسفرازهای سرمی، آلکالین فسفاتاز، بیلی روبین و آلبومین هستند. بروز اختلال و یا آسیب در بافت کبد باعث آزاد شدن هر یک از معیارهای LFT به خون می‌شود (۱۰، ۳۰ و ۳٤). افزایش در فعالیت پلاسمایی آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز، لاکتات دهیدروژناز، آلکالین فسفاتاز و اسید فسفاتاز به احتمال قوی به علت نقص در عملکرد کبد روی می‌دهد (۱۲). احتمالاً عصاره زعفران با ممانعت از تراوش این آنزیم‌ها از سلول‌های داخلی با پایدار کردن غشای سلولی تاثیر خود را اعمال می‌کند (٤۸).

در مطالعات پاتولوژیکی، بروز تغییر چربی در هپاتوسیت‌های کبد در موش‌های دیابتی در قسمت‌های مرکز لوبولی مشاهده شد که این نتایج با یافته‌های Ramesh و همکارانش که

Umbelliferone را به عنوان یک ماده محافظتی در دیابت القا شده با استرپتوزوتوسین معرفی کرده بود، همخوانی دارد (۳۷).

متعاقب تیمار با زعفران در موش‌های صحرایی دیابتی، هیچ‌گونه تغییر پاتولوژیک در هپاتوسیت‌ها مشاهده نشد که این نمایانگر تاثیر محافظتی عصاره اتانولی زعفران در مقابل عوارض کبدی ناشی از دیابت است که نتایج حاصل از ارزیابی بیوشمیایی نیز با آن کاملاً همراستا بود.

کبد یکی از مهمترین ارگان‌هایی است که سطوح گلوکز خونی را در حالت تعادل حفظ می‌کند. افزایش قند خون باعث عدم تعادل در واکنش‌های اکسید–احیا در سلول‌های کبدی می‌شود. لذا هایپرگلیسمی از طریق افزایش (Advanced glycation end products; AGEs) باعث تولید رادیکال‌های آزاد و اختلال در SOD و CAT می‌شود (۸، ۲۱ و ۲۲). بنابراین، آسیب کبد در دیابت از طروق مختلف ناشی می‌شود و تنها از طریق ممانعت از هایپرگلیسمی قابل کنترل نیست (۲۶). گرچه در مراحل ابتدایی دیابت، آسیب‌ها از طریق هایپرگلیسمی ایجاد می‌شوند اما با پیشرفت بیماری، بروز آسیب در مراحل بعدی دیگر به هایپرگلیسمی ارتباطی ندارد (۲۶). بنابراین، برای رفع عوارض دیابت، کنترل سطوح گلوکز خونی به‌تنهایی کافی نیست لذا داروی مناسب باید هم آنتی اکسیدان خوبی باشد هم توانایی کاهش گلوکز خون را داشته باشد (۵۱). عصاره زعفران شامل بسیاری از ترکیبات نظیر کروسین،کارتنوئیدهای حلال در آب، کروستین، پیکروکروسین و سافرانال می‌باشد (۳۳). اجزای تشکیل‌دهنده فعال زعفران، کروستین، کروسین و سافرانال هستند که به عنوان آنتی اکسیدان مناسبی محسوب می‌شوند (۱ و ۳۹). این کارتنوئیدها رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند. مخصوصاً آنیون‌های سوپراکسید که احتمالاً بدین وسیله باعث حفاظت سلول‌ها از استرس اکسیداتیو می‌شوند (۷). همچنین کاهش ثابتی در مقدار اکسیداسیون لیپوپروتئین با تجویز زعفران به مقدار mg ۵۰ به مدت ۲ بار در روز بار مشاهده شده است (۵۰).

در این مطالعه ما مشاهده کردیم که عصاره اتانولی زعفران می‌تواند وضعیت شاخص‌های عملکردی آسیب کبد و نیز خصوصیات بافتی و ساختاری این اندام را در موش‌های صحرایی دیابتی بهبود بخشد. لکن، شناخت دقیق ماده یا مواد موثر اصلی این عصاره، تعیین دقیق مکان و مکانیسم یا مکانیسم‌های مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن در این مورد نیاز به مطالعات آتی دارد.

سپاسگزاری

این طرح پژوهشی با اعتبارات مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر به انجام رسیده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی این دانشگاه صمیمانه قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Abdullaev, F.J. 1993. Biological effects of saffron. Biofactors, 4: 83-86.
2. Abdullaev, F.I. 2002. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (Crocus sativus L.). Exp. Biol. Med., 227: 20-25.
3. Abe, K. and Saito, H. 2000. Effects of saffron and its constituent crocin on learning behavior and long-term potentiation. Phytother. Res., 14: 149-152.

4. Akhondzadeh, S., Tahmacebı-Pour, N., Noorbala, A.A., Amını, H., Fallah-Pour, H., Jamshıdı, A.H. and Khanı, M. 2005. *Crocus sativus* L. in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized and placebo controlled trial. Phytother. Res., 19 (2): 148-151.
5. Akhtar, M.S. and Iqbal, J. 1991. Evaluation of the hypoglycemic effect of achyranthes aspera in normal and alloxan diabetic rabbits. J. Ethnopharmacol., 31: 49-57.
6. Assimopoulou, A.N., Sinakos, Z. and Papageorgiou, V.P. 2005. Radical scavenging activity of Crocus sativus L. extract and its bioactive constituents. Phytother. Res., 19: 997-1000.
7. Bors, W., Saran, M. and Michel, C. 1982. Radical intermediates involved in the bleaching of the carotenoid crocin. Hydroxyl radicals, superoxide anions and hydrated electrons. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 41: 493-501.
8. Cameron, N.E., Gibson, T.M., Nangle, M.R. and Cotter, M.A. 2005. Inhibitors of advanced glycation end product formation and neurovascular dysfunction in experimental diabetes. Ann N Y Acad Sci., 1043: 784-792.
9. de Marco, R., Locatelli, F., Zoppini, G., Verlato, G., Bonora, E., Muggeo, M. 1999. Cause-specific mortality in type 2 diabetes: The Verona Diabetes Study. Diabetes Care., 22:756-761.
10. Drotman, R. and Lawhan, G. 1978. Serum enzymes are indications of chemical induced liver damage. Drug Chem Toxicol., 1(2): 163-171.
11. Eddouks, M., Maghrani, M. and Michel, J.B. 2005. Hypoglycaemic effect of Triticum repens P. Beauv. in normal and diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology., 102(2): 228-232.
12. El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I. and Abou El-Naga, N.I. 2005. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. Food Chem Toxicol., 43: 57-63.
13. Feillet-Coudray, C., Rock, E., Coudray, C., Grzelkowska, K., Azais-Braesco, V., Dardevet, D. and Mazur, A. 1999. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. Clinica Chimica Acta, 284(1):31-43.
14. Frei, B. and Higdon, J. 2003. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies, J Nutr., 133: 3275-3284.
15. Gallou, G., Ruelland, A., Legras, B., Maugendre, D., Allanic, H. and Cloarec, L. 1993. Plasma MDA in type 1 and type 2 diabetes, Clin. Chim. Acta 214: 227-234.
16. Giaccio, M. 2004. Crocetin from saffron: An active component of an ancient spice. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 44: 155-172.
17. Gupta, R.K., Kesari, A.N., Murthy, P.S., Chandra, R., Tandon, V. and Watal, G. 2005. Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of Annona squamosa L. in experimental animals. Journal of Ethnopharmacology, 99(1):75-81.
18. Hagh Nazari, S. and Keifi, N. 2006. Saffron and various fraud matter in its production and trade. Proceedings of 2nd International Symposium on Saffron Biology and Technology. Mashhad-Iran. Oct. 28-30, pp: 127-132.
19. Harris, E.H. 2005. Elevated Liver Function Tests in Type 2 Diabetes. Clinical diabetes, 23(3): 115-119.
20. Hendriksen, P.H., Oey, P.L., Wieneke, G.H., Bravenboer, B. and Banga, J.D. 1992. Subclinical diabetic neuropathy: similarities between electrophysiological results of patients with type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. Diabetologia., 35:690-695.
21. Jandeleit-Dahm, K.A., Lassila, M. and Allen, T.J. 2005. Advanced glycation end products in diabetes-associated atherosclerosis and renal disease: interventional studies. Ann N Y Acad Sci,; 1043: 759-766.
22. Kalia, K., Sharma, S. and Mistry, K. 2004. Non-enzymatic glycosylation of immunoglobulins in diabetic nephropathy. Clinical & Chemical Acta., 347(1-2): 169-176.
23. Kim, S.H., Hyun, S.H. and Choung, S.Y. 2006. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. J. Ethnopharmacol., 104: 119-123.
24. Kind, P.R. and King, E.J. 1954. Estimation of plasma phosphates by determination of hydrolyzed phenol with antipyrin. J Clin Pathol., 7(4): 322-326.
25. Liakopoulou-Kyriakides, M. and Kyriakidis, D.A. 2002. Crocus sativus biological active constituents. Studies Nat. Prod. Chem., 26 (7): 293- 312.
26. Liu, H.R., Tang, X.Y., Dai, D.Z. and Dai, Y. 2008. Ethanol extracts of Rehmannia complex (Di Huang) containing no corni fructus improve early diabetic nephropathy by combining suppression on the ET-ROS axis with modulate hypoglycemic effect in rats. J Ethnopharmacol., 118(3): 466-72.
27. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., et al. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem., 193(1): 265-275.
28. Malloy, H.T. and Evelyn, K.A. 1937. The determination of bilirubin level with the photoelectric colorimeter. J Biol Chem., 119(2): 481-484.

29. Maritim, A.C., Sanders, R.A. and Watkins, J.B. 2003. Effect of alpha lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotoc in-induced diabetic rats, J. Nutr. Biochem., 14: 288-294.
30. Mehana, E.E., Meki, A.R. and Fazili, K.M. 2010Ameliorated effects of green tea extract on lead induced liver toxicity in rats Exp Toxicol Pathol., In press.
31. Mohajeri, D., Amouoghli Tabrizi, B., Mousavi, Gh. and Mesgari, M. 2008. Anti-diabetic Activity of Crocus sativus L. (saffron) Stigma Ethanolic Extract in Alloxan-induced Diabetic Rats. Research Journal of Biological Sciences, 3(9): 1102-1108.
32. Mohajeri, D., Mousavi, Gh. and Doustar, Y. 2009. Antihyperglycemic and Pancreas-Protective Effects of Crocus Sativus L. (Saffron) Stigma Ethanolic Extract on Rats with Alloxan-Induced Diabetes. Journal of Biological Sciences, 9(4): 302-310.
33. Morimoto, S., Umezaki, Y., Shoyama, Y., Saito, H., Nishi, K., Irino, N., 1994. Post-harvested degradation of carotenoid glucose esters in saffron. Planta Medica., 60, 438-440.
34. Muriel, P., Garcipiana, T., Perez-Adverez, V. and Mourelle, M. 1992. Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. J Applied Toxicol., 12(6): 439-442.
35. Nathan, D.M. 1993. Long-term complications of diabetes mellitus. N Engl J Med., 328:1676-1685.
36. Nourooz-Zedeh, J., Rahini, A., Tajaddini-Sarmadi, J., Tritschler, H., Rosen, P., Halliwell, B. and Betteridge, D.J. 1997. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM, Diabetologia, 40: 647-653.
37. Ramesh, B., Viswanathan, P. and Pugalendi, K.V. 2007. Protective effect of Umbelliferone on membranous fatty acid composition in streptozotocin-induced diabetic rats. European Journal of Pharmacology, 566(1-3): 231-239.
38. Reitman, S. and Frankel, S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. Am J Clin Pathol., 28(1): 56-63.
39. Ríos, J.L., Recio, M.C., Giner, R.M. and Má ez, S. 1996. An update review of saffron and its active constituents. Phytother Res., 10: 189-193.
40. Ritz, E., Hasslacher, C. and Tschope, W. 1990. Diabetic nephropathy — are there differences between type I and type II?. Miner Electrolyte Metab., 16:69-72.
41. Saxena, A.K., Srivastava, P., Kale, R.K. and Baquer, N.Z. 1993. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate, Biochem. Pharmacol., 45 (3): 539-542.
42. Shanmugasundaram, E.R., Rajeswari, G., Baskaran, K., et al. 1990. Use of Gymnema sylvestre leaf extract in the control of blood glucose in insulin-dependent diabetes mellitus. J Ethnopharmacol., 30: 281-94.
43. Sharma, S.R., Dwivedi, S.K. and Swarup, D. 1997. Hypoglycaemic, antihyperglycaemic and hypolipidemic activities of Casealpina bonducella seeds in rats. J Ethnopharmacol., 58: 39-44.
44. Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol., 82(2): 291-295.
45. Srivastava, Y., Venkatakrishnan-Bhatt, H. and Verma, Y. 1993. Antidiabetic and adaptogenic properties of Momordica charantia extract: an experimental and clinical evaluation. Phytother Res., 7: 285-89.
46. Taniyama, Y. and Griendling, K.K. 2003. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms, *Hypertension* 42: 1075-1081.
47. Tanaka, Y., Maher, J.M., Chen, C. and Klaassen, C.D. 2007. Hepatic ischemia-reperfusion induces_ renal heme oxygenase-1 via NF-E2-related factor 2 in rats and mice. Mol Pharmacol., 71(3): 817-825.
48. Thabrew, M. and Joice, P. 1987. A comparative study of the efficacy of Pavetta indica and Osbeckia octanda in the treatment of liver dysfunction. Planta Med., 53(3): 239-241.
49. Vallabhji, J., McColl, A.J., Richmond, W., Schachter, M., Rubens, M.B. and Elkeles, R.S. 2001. Total antioxidant status and coronary artery calcification in type 1 diabetes, Diabetes Care, 24:1608-1613.
50. Verma, S.K. and Bordia, A. 1998. Antioxidant property of saffron in man. Indian J Med Sci., 52: 205-207.
51. Vestra, M.D. and Fioretto, P. 2003. Diabetic nephropathy: renal structural studies in type 1 and type 2 diabetic patients. Internatrional Congress Series, 1253: 163-169.
52. Wilcox, C.S. and Gutterman, D. 2005. Focus on oxidative stress in the cardiovascular and renal systems, *Am. J. Physiol, Heart Circ. Physiol.,* 288: 3-6.
53. Worobetz, L., Hilsden, R., Shaffer, E., Simon, J., Pare, P., Scully, L., et al. The liver. In Thomson BR, Shaffer EA, editors. First Principles of Gastroenterology. 2nd ed.University of Toronto Press: Toronto; 1994.
54. Zhang, X.F. and Tan, B.K. 2000. Antihyperglycaemic and antioxidant properties of andrographis particulate in normal and diabetic rats, *Clin. Exp. Pharmacol.* 27: 5-6.

Vet. J. of Islamic Azad Uni. Tabriz Branch. 5, 3:1305-1313, 2011

Effect of ethanolic extract of *Crocus sativus* L. (Saffron) stigma on serum levels of functional liver markers and hepatic tissue injury in streptozotocin-induced diabetic rats

Rahbani, M.[1*], Mohajeri, D.[2], Rezaie, A.[3], Rezaei Moghadam, A.[4]

1-Department of Biological Science, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
2-Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicin,Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
3-Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicin, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
4-Young Researchers Club, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

[*]***Corresponding author's email:*** *rahbanim@hotmail.com*

(Received: 2011/8/21, Accepted: 2011/11/24)

Abstract

In this study, protective effects of saffron against biochemical and histopathological changes of liver were assessed in streptozotocin-induced diabetic rats. Forty male Wistar rats were randomly divided into 4 groups of 10 animals each, including Group 1, healthy control; Group 2 healthy rats treated with saffron extract; Group 3, diabetics and Group 4, diabetics treated with saffron extract. For induction of diabetes, single dose of streptozotocin (75 mg/kg) was injected intraperitoneally. From the beginning of experiment, the extract was injected daily at a dose of 40 mg/kg b.w. by intraperitoneal route for 8 weeks. Control groups received normal saline in similar manner. At the end of experiment, serum biomarkers of liver tissue injury and histological changes of hepatic tissues were evaluated. In diabetic rats, serum levels of functional liver markers were found to be significantly increased as compared to control group ($p<0.05$), while this markers in diabetic rats treated with saffron extract significantly decreased as compared to diabetic rats. Histopathological findings were in consistent with biochemical results. The results obtained showed that ethanolic extract of saffron has hepatoprotective activity against diabetic hepatopathy in streptozotocin-induced diabetic rats.

Keywords: Diabetes mellitus, Liver, Saffron, Biomarkers of liver injury, Histopathology, Rats