

تأثیر مصرف دانه گلرنگ (یک ژنوتیپ جدید پوسته رنگی) بر بافت های کبد و کلیه رت نر نژاد ویستارثریا کرمی^{۱*}، لعلیا سادات خرسندی^۲

۱. مربی، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه علوم تشریحی، مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز

چکیده

زمینه و هدف: دانه های گلرنگ زراعی که در حال حاضر در صنعت دارو و غذا استفاده می گردد، سفید رنگ است و هیچ ژنوتیپ رنگی از گلرنگ زراعی به طور تجاری تا به حال گزارش نشده است. این مطالعه به منظور بررسی اثرات توکسیک احتمالی ناشی از مصرف دانه های پوسته سیاه یک ژنوتیپ جدید گلرنگ زراعی (A82) بر بافت های کبد و کلیه رت آزمایشگاهی انجام شده است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۵۴ سر رت نر، با نژاد Wistar به صورت تصادفی به ۲ گروه تیماری ۲۴ تایی (شامل ۴ زیرگروه ۶ تایی) و یک گروه کنترل ۶ تایی تقسیم شدند. گروه ۱ (گروه کنترل)، آب مقطر و گروه های ۲ (CTBS) و گروه ۳ (CTWS) به ترتیب سوسپانسیون دانه پوسته سیاه (A82) و پوسته سفید (C111) گلرنگ را به طور روزانه به ترتیب با دوزهای ۳۰، ۶۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۵ هفته به صورت دهانی دریافت کردند. جهت انجام آزمایش های بیوشیمیایی سرم خون شامل آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP)، نیتروژن اوره خون (BUN) و کراتینین (Cr)، نمونه خون از شریان ژوگلار گرفته شد. جهت بررسی های بافت شناسی، بافت کبد و کلیه بلافاصله خارج شد. از نمونه های کبد و کلیه پس از تثبیت در فرمالین ۱۰ درصد و قالب گیری، مقاطع بافتی با ضخامت ۵-۴ میکرون تهیه گردید. مقاطع با روش هماتوکسیلین-اوتوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. برای مقایسه میانگین بین گروه ها از تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و برای اجرای آزمون های تکمیلی، آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) انجام شد.

یافته ها: در هر دو گروه تیماری CTBS و CTWS متناسب با افزایش میزان دریافت دوز، وزن بدن رت ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی دار نشان داد (۲۳۳/۰۰±۴/۷۴، ۲۱۸/۷۶±۵/۴۳ و ۱۹۶/۷۹±۴/۸۸ به ترتیب در گروه تیماری CTBS، CTWS و کنترل) به طوری که این روند افزایشی در گروه CTBS در مقایسه با CTWS قابل ملاحظه بود ($P<0.05$). بر خلاف تغییرات وزن بدن، وزن ارگان های کبد و کلیه گروه های تیماری تغییر معنی داری نشان نداد. سطح سرمی ترانس آمیناز های کبدی ALT و AST بین گروه های تیماری و همچنین در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی داری نشان نداد. سطح سرمی ALP به طور قابل ملاحظه ای در گروه تیماری CTBS (۵۶۷/۳۹±۳۲/۵) در مقایسه با گروه کنترل (۸۱۹/۵۰±۳۸/۲۱) و گروه تیماری CTWS (۶۰۹/۹۴±۳۰/۵) با افزایش میزان دوز، روند کاهشی نشان داد ($P<0.05$). میزان BUN و Cr در گروه های تیماری نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده بود ($P>0.05$). از نظر مطالعات هیستوپاتولوژی، متناسب با افزایش میزان دریافت دوز، نکروز یا آسیبی در بافت کبد و کلیه مشاهده نشد.



نتیجه گیری: نتایج بررسی حاضر نشان داد که دانه گلرنگ، به خصوص گلرنگ پوسته سیاه (A82) هیچ گونه اثر سمّی بر روی بافت کبد و کلیه ندارد. اثرات مثبت دانه های پوسته سیاه روی وزن بدن رت ها می تواند یک اثر قابل توجه جهت بررسی های بیشتر برای بهره برداری در صنعت پرورش ماکیان باشد.

کلمات کلیدی: دانه پوسته سیاه گلرنگ، اثرات هیستوپاتولوژیک و بیوشیمیایی، رت

نویسنده مسئول: ثریا کرمی

آدرس: ایران، تهران، دانشگاه پیام نور

ایمیل: karamisoraya@gmail.com



مقدمه

گلرنگ زراعی (*Carthamus tinctorius*) در ابتدا در ایران و چین به منظور رنگ کردن البسه با استفاده از رنگ قرمز/نارنجی استخراج شده از گل های گلرنگ کشت می شد (۱) اما در حال حاضر، هدف اصلی از زراعت این گیاه، تولید دانه می باشد. دانه گلرنگ دارای روغن خوراکی و ترکیبی از اسیدهای چرب غیر اشباع با کاربرد های فارماکولوژی و بیولوژیکی است که با روغن آفتاب گردان، زیتون و بادام قابل مقایسه می باشد (۲،۳). همچنین پلی فنول ها و مشتقات سروتونین موجود در عصاره دانه گلرنگ از جمله N-(p-coumaroyl) feruloylserotonin و N- دارای خاصیت ضد سرطانی، ضد ملانوزنسیس (۴) و اثرات کاهنده کلسترول می باشند (۵) و همچنین در بهبود ضربان قلب (۶، ۷) و درمان دیابت نیز مؤثر می باشند (۸).

دانه (آکن) در گونه های کارتاموس از سه بخش اصلی پوسته دانه (پریکارپ)، جنین و لپه تشکیل شده است. پوسته دانه معمولاً دارای چندین الگوی رنگی است که به طور ژنتیکی با یک یا دو لوکوس کنترل می شود (۹). در گلرنگ زراعی و برخی خویشاوندان وحشی آن، پوسته دانه سفید یا کرم رنگ می باشد در حالی که در دیگر گونه های وحشی، پوسته دانه رنگی است. سبزعلیان و همکاران (۱۰) الگوی جدیدی از دانه هایی با پوسته سیاه رنگ در گونه وحشی اکسیاکانتوس (*C. oxyacanthus*) پیدا نمودند و این ویژگی را از طریق هیبریداسیون بین گونه ای به گلرنگ زراعی با دانه های پوسته سفید انتقال دادند. نتایج این هیبریداسیون بین گونه ای نشان داد که، بین رنگ پوسته دانه، مقاومت به مگس گلرنگ

(*Acanthiophilusheliantii*)، به عنوان مهم ترین آفت گلرنگ و وزن هزار دانه ارتباط قوی و مثبتی وجود دارد. همچنین در گونه های وحشی گلرنگ، با دانه های پوسته رنگی، روغن دانه برای مصرف انسان و اهداف صنعتی

مناسب گزارش گردید و به نظر می رسد که رنگ پوسته دانه اثر منفی بر محتوی و کیفیت روغن نداشته باشد (۱۱). همچنین نتایج مطالعات انجام شده (۱۳، ۱۲، ۶)، نشان داد که دانه گلرنگ حاوی سطوح بالایی از ترکیبات فنولیک همچون لیگنین و فلاونوئید (۱۴) با خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی است.

شن و همکاران (۱۵) و تادی و همکاران (۱۶) به ترتیب به وجود ارتباط مثبت بین ترکیبات فنولیک و رنگ پوسته دانه در برنج و سورگوم اشاره نمودند. بنابراین چنین ارتباطات مثبتی می تواند موجب افزایش محبوبیت واریته های گیاهی با دانه های رنگی در صنعت غذا و دارو گردد (۲۰-۱۷). با این وجود، دانه های گلرنگ زراعی که در حال حاضر در صنعت دارو و غذا استفاده می شود سفید رنگ است و هیچ ژنوتیپ رنگی از گلرنگ زراعی به طور تجاری تا به حال گزارش نشده است.

دانه های رنگی ممکن است اثرات مخرب یا مرگ آور بر روی آفات گیاه خوار داشته باشند (۲۲، ۱۰)؛ اگرچه کنترل شیمیایی ممکن است برای مدیریت صدمات آفات مؤثر باشد، اما کاربرد حشره کش ها برای کاهش خسارت آفات به دلیل وجود ارتباط مثبت بین مصرف حشره کش ها و سرطان هایی از جمله سرطان سیستم عصبی، سینه و پروستات (۲۴، ۲۳)، یک روش ایمن نمی باشد. در مقابل، به نظر می رسد که، گیاهان مقاوم میزبان یک روش اقتصادی برای مدیریت آفات و حفظ محیط زیست باشند. بنابراین ضروری است، قبل از آزادسازی یک واریته جدید با ویژگی منحصر بفرد، نتایج تغذیه ای آن بر روی مصرف کنندگان احتمالی بررسی گردد. لذا، هدف از این مطالعه اندازه گیری برخی نشانگرهای تشخیص آسیب کبدی و کلیوی (ALT, AST, ALP, Cr, BUN) و بررسی هیستولوژیکی بافت های حیاتی کبد و کلیه در رت های نر نژاد ویستار می باشد تا اثرات توکسیک احتمالی ناشی از مصرف دانه های سیاه

سوسپانسیون بذر از هیچ حلال آلی استفاده نگردید. طبق مطالعات قبلی انجام شده، بر اساس روش کروماتوگرافی ستونی و دستگاه های شناسایی ساختمان هیدروژن (H-NMR) و اسکلت کربن (C-NMR)، ترکیب رنگی موجود در پوسته سیاه بذر گلرنگ احتمالاً ترکیبی از خانواده آنتوسیانیدین می باشد. این ترکیب حاوی گروه عاملی بسیار فعال دی انی می باشد که به اکسیژن حاوی بار مثبت متصل است، بنابراین به محض قرار گرفتن این ماده اولیه در مجاورت هوا تمایل به پلیمر شدن دارد که از طریق واکنش پلیمر شدن رادیکالی حلقه بنزنی با ساختار دی انی انجام خواهد شد و به دلیل پلیمر شدن به رنگ سیاه و مشکی تبدیل وضعیت خواهد داد. این پلیمر که از پلیمر شدن عرضی به وجود آمده است در اکثر حلال های آلی حل نخواهد شد (۲۵).

۲. حیوانات آزمایشی

در این مطالعه از ۵۴ موش نر نژاد ویستار (۱۰-۸ هفته سن، ۱۸۰-۲۰۰ گرم وزن) استفاده شد. موش ها قبل از اجرای تیمار، به مدت ۱۰ روز در شرایط استاندارد از نظر نور، دما و رطوبت (۱۲ ساعت تاریکی-روشنایی، رطوبت نسبی 50 ± 5 درصد و درجه حرارت 22 ± 3 سانتیگراد) و دسترسی آزاد به آب و غذا فشرده شده مخصوص (پلت) نگهداری شدند. کلیه حیوانات مورد آزمایش از مرکز پژوهشی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه جندی شاپور اهواز تهیه گردید. مراحل نگهداری و گاوای حیوانات ضمن رعایت کلیه مسایل اخلاقی و پرهیز از هرگونه آزار جسمی و روش های غیر ضروری در همان مرکز اجرا گردید.

۳. طراحی آزمایش

حیوانات به طور تصادفی به دو گروه تیماری (CTWS, CTBS) ۲۴ تایی و یک گروه کنترل ۶ تایی

رنگ واریته جدید گلرنگ "A82" در مقایسه با دانه های سفید رنگ واریته زراعی گلرنگ "C111" تعیین گردد.

روش بررسی

۱. آماده سازی سوسپانسیون بذر

مواد گیاهی استفاده شده در این مطالعه شامل دانه های پوسته سیاه (CTBS) و پوسته سفید (CTWS) گلرنگ به ترتیب مربوط به لاین اصلاحی "A82" و واریته زراعی "C111" می باشد (شکل ۱).



شکل ۱. گلرنگ زراعی (واریته C111) پوسته سفید (سمت راست) و گلرنگ زراعی (واریته جدید A82) پوسته سیاه (سمت چپ)

لاین اصلاحی "A82" نتیجه هیبریداسیون بین گونه ای و تلاقی واریته "C111" به عنوان والد مادری با یک ژنوتیپ وحشی با پوسته سیاه رنگ گلرنگ می باشد. نسل پیشرفته حاصل از این تلاقی بعد از چندین نسل تلاقی برگشتی و هشت نسل خودگشتی یک جمعیت یکنواخت با دانه های سیاه رنگ می باشد. دانه های گلرنگ از مزرعه آموزشی دانشگاه صنعتی اصفهان که در قالب بلوک کامل تصادفی کشت شده بودند، برداشت شد. یک نمونه تصادفی از دانه ها آسیاب گردید و سپس در آب مقطر، سوسپانسیونی با دوزهای ۳۰، ۶۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ میلی گرم در کیلوگرم تهیه گردید. لازم به ذکر است که در تهیه

آمیزی و با فتومیکروسکپ نوری (Zeiss, Germany) تغییرات هیستولوژیکی بافت ها مشاهده گردید.

۶. آزمون های بیوشیمیایی سرم خون

نمونه خون های جمع آوری شده به لوله های سانتریفیوژ دوکی شکل و کریستالی سایز ۱۵ بدون مواد ضد انعقاد، برای استخراج سرم خون منتقل شدند. لوله ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و پس از جداسازی سرم خون، سطح آنزیم های سرم خون از جمله آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) به عنوان مهم ترین نشانگرهای سرمی آسیب کبدی و نیتروژن اوره خون (BUN) و کراتینین (Cr) به عنوان مهم ترین نشانگرهای سرمی آسیب کلیوی با استفاده از کیت های تشخیصی شرکت سیگما و دستگاه آنالیزر اندازه گیری شدند.

روش تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه میانگین صفات کمی در گروه های مورد بررسی، ابتدا نرمال بودن صفت با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک تأیید شد. سپس میانگین صفات کمی نرمال بین گروه ها با استفاده از روش تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مقایسه شد. برای مقایسه های دوتایی نیز از روش تکمیلی حداقل اختلاف معنی دار (LSD) استفاده شد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد. P-value کمتر از ۰/۰۵ نیز به عنوان سطح معنی دار تعیین شد. کلیه آزمون های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

یافته ها

۱. تغییرات وزن و ارگان های بدن

در طول آزمایش هیچ حیوان مرده یا حیوانی با علائم خاص بیماری کبدی یا کلیوی از جمله تغییر رنگ ادرار، لاله

تقسیم شدند. هر گروه تیماری نیز به ۴ زیرگروه با ۶ حیوان تقسیم شد. در شروع آزمایش، حیوانات وزن شدند. گروه های تیماری با ۴ زیرگروه به ترتیب و جداگانه دوزهای ۳۰، ۶۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ میلی گرم در کیلوگرم سوسپانسیون مربوط به دانه های پوسته سیاه "CTBS" و دانه های پوسته سفید "CTWS" را به مدت ۵ هفته به جای آب، با استفاده از سرنگ تغذیه گاوآژ شدند و حیوانات گروه کنترل به جای سوسپانسیون بذر به همان مدت آب دریافت نمود. تغییر در وزن بدن، رفتار و علائم احتمالی در موش ها به طور روزانه به مدت ۵ هفته بررسی و ثبت گردید.

۴. نمونه برداری بافت

روز سی و ششم پس از بیهوشی، از عروق ژوگولار گردن حیوانات، خونگیری آغاز شد. پس از خونگیری، موش ها به روش جابجایی مهره های گردنی قربانی شده، سپس بافت کبد و کلیه حیوانات به سرعت جدا و وزن شد. بافت ها در محلول ۱۰ درصد فرمالین برای بررسی های هیستولوژیکی فیکس گردیدند. تمام آزمایشات بر اساس موازین اخلاقی رفتار با حیوانات انجام شد که به تأیید کمیته اخلاقی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز رسیده است.

۵. ارزیابی های بافت شناسی

پس از فیکس کردن نمونه ها به مدت ۴۸ ساعت، مراحل آماده سازی بافت ها انجام گرفت و بلوک های پارافینی تهیه شد و با استفاده از میکروتوم چرخشی مدل لایتنر ساخت کشور آلمان، برش های پارافینی به ضخامت ۴-۵ میکرون گرفته شد. قطعات برش یافته با استفاده از سری های زایلن و الکل به طور تدریجی پارافین زدایی گردیده و با استفاده از روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ

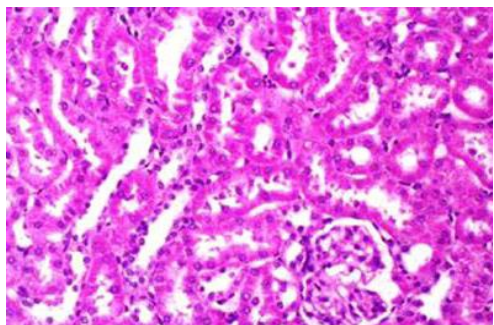
گوش، چشم، پوست، کبودی لب و تورم اعضاء بدن مشاهده نگردید. مقایسه میانگین وزن بدن بین گروه های تیماری با گروه کنترل نشان داد که اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0.05$) به طوری که وزن بدن در هر دو گروه تیماری در مقایسه با گروه کنترل روند افزایشی داشته است. روند تغییرات میانگین وزن بدن بین دو گروه تیماری نیز نشان داد که بین گروه تیماری CTBS و CTWS اختلاف معنی دار وجود دارد و همچنین میانگین وزن بدن در گروه CTBS در مقایسه با گروه CTWS بالاتر ($P < 0.05$) می باشد. بررسی تغییرات وزن بدن بین سطوح دوزها در هر گروه تیماری نشان داد که وزن بدن در هر دو گروه تیماری در سطح ۲۴۰ میلی گرم/کیلوگرم بالاترین مقدار را داشته است و با سطوح دوزی ۳۰، ۶۰ و ۱۸۰ میلی گرم/کیلوگرم اختلاف معنی داری نشان داده است.

علی رغم تغییرات وزن بدن، وزن ارگان های حیاتی کبد و کلیه در دو گروه تیماری در مقایسه با گروه کنترل تغییرات معنی داری نشان نداد ($P > 0.05$). نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. مقایسه تغییرات وزن بدن و ارگان های کبد و کلیه در گروه کنترل و گروه های تیماری دریافت کننده سوسپانسیون پودر دانه پوسته سیاه (CTBS) و پوسته سفید (CTWS). مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار می باشند.

گروه	دوز مصرفی (mg/kg)	وزن بدن (g)	وزن ارگان ها (g)	
			کلیه	کبد
کنترل	-	$196/79 \pm 4/88$	$2/2 \pm 0/36$	$10/5 \pm 1/2$
CTBS (A82)	۲۴۰	$251/98 \pm 4/71^a$	$2/1 \pm 0/21^a$	$10/3 \pm 1/1^a$
	۱۸۰	$229/74 \pm 5/05^b$	$1/9 \pm 0/33^a$	$9/8 \pm 1/0^a$
	۶۰	$226/83 \pm 3/62^b$	$2/3 \pm 0/41^a$	$10/7 \pm 1/3^a$
	۳۰	$223/43 \pm 2/43^b$	$2/2 \pm 0/28^a$	$10/6 \pm 1/1^a$
میانگین	-	$233/00 \pm 4/74^{*A}$	$2/12 \pm 0/37^{nsA}$	$10/35 \pm 1/35^{nsA}$
CTWS (C111)	۲۴۰	$230/86 \pm 5/07^a$	$1/8 \pm 0/32^a$	$10/6 \pm 1/3^a$
	۱۸۰	$218/23 \pm 7/50^b$	$2/3 \pm 0/21^a$	$10/7 \pm 1/2^a$
	۶۰	$215/59 \pm 3/54^b$	$1/9 \pm 0/25^a$	$10/4 \pm 1/1^a$
	۳۰	$210/32 \pm 2/01^b$	$2/2 \pm 0/30^a$	$10/1 \pm 1/4^a$
میانگین	-	$218/76 \pm 5/43^{*B}$	$2/05 \pm 0/32^{nsA}$	$10/45 \pm 1/00^{nsA}$

*: $P < 0.05$ تفاوت معنی دار با گروه کنترل، علائم A, B: نشان دهنده مقایسه میانگین گروه های تیماری از یکدیگر در تمامی دوز ها، علائم a, b: نشان دهنده مقایسه سطوح دوز دریافت شده در هر گروه تیماری



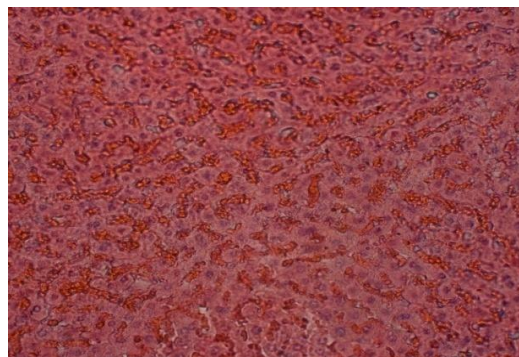
شکل ۳. مقطع بافت کلیه در گروه های تیماری و کنترل، کاملاً طبیعی و هیچ آسیبی مشاهده نمی شود.

۳. آزمون های بیوشیمیایی سرم خون

نتایج حاصل از سنجش های بیوشیمیایی نشان داد که سطوح AST و ALT در گروه های تیماری در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب افزایش و کاهش نشان داد، اما این تغییرات معنی دار نبود. همچنین بین دو گروه تیماری از نظر میزان سطوح ALT و AST تفاوت معنی داری دیده نشد. سطوح ALP در دو گروه تیماری با افزایش دوز در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داد ($P < 0.05$) به طوری که این روند کاهشی در حیوانات تیمار شده با CTBS بخصوص در دوز ۲۴۰ میلی گرم/کیلوگرم بیشتر بود. سطوح BUN و Cr در دو گروه تیماری مشابه گروه کنترل بود بین گروه های تیماری نیز تفاوت معنی داری مشاهده نشد. نتایج در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

۲. تغییرات بافتی

مطالعات هیستوپاتولوژیک تحت میکروسکپ نوری نشان دادند که در گروه کنترل و دو گروه تیماری بافت کبد طبیعی و هیچ اثری از نکروز در کبد مشاهده نگردید؛ به طوری که حاشیه سلول ها کاملاً مشخص بوده و هسته ها به وضوح مشاهده شدند. مجرای صفراوی حالت طبیعی داشته و لوپول های کبدی واضح و مشخص بودند. فضاهای پورت نیز به صورت طبیعی و آرایش منظم سلولی کاملاً نمایان بود (شکل ۲).



شکل ۲: مقطع بافت کبد در گروه های تیماری و کنترل. رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین. در تمامی گروه های حاشیه سلول ها کاملاً مشخص بوده و هسته ها به وضوح مشاهده می شوند.

همچنین ارزیابی بافت کلیه ها با میکروسکپ نوری در گروه کنترل مورفولوژی نرمالی از پارانشیم کلیوی نشان داد که به خوبی با گلومرول و لوله های نزدیک محصور شده بود. بافت کلیه حیوانات گروه های تیماری نیز ظاهر نرمالی را نشان داد و هیچ اثری از نکروز کلیوی یا آسیب گلومرولی مشاهده نگردید (شکل ۳).

جدول ۲. مقایسه تغییرات ترانس آمیناز های کبدی (AST, ALT, ALP) و مارکرهای سمیت کلیوی (Bun, Cr) در گروه کنترل و گروه های تیماری دریافت کننده سوسپانسیون پودر دانه پوسته سیاه (CTBS) و دانه پوسته سفید (CTWS). مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد می باشند

نشانه های کبدی			نشانه های کلیوی		دوز مصرفی (mg/kg)	گروه
AST	ALT	ALP	Cr	BUN		
۱۳۹/۵ $\pm$ ۲۶/۲	۶۸/۲۵ $\pm$ ۳/۴۷	۸۱۹/۵۰ $\pm$ ۳۸/۲۱	۰/۵۳ $\pm$ ۰/۱	۲۱/۳۳ $\pm$ ۱/۵۲	-	کنترل
۱۵۰/۷ $\pm$ ۲۴/۳ ^a	۶۳/۵۰ $\pm$ ۲/۴۲ ^a	۴۹۳/۶۱ $\pm$ ۲۱/۹۳ ^c	۰/۴۹ $\pm$ ۰/۱۰ ^a	۱۵/۶۶ $\pm$ ۱/۲۵ ^a	۲۴۰	CTBS (A82)
۱۵۶/۲ $\pm$ ۲۸/۱ ^a	۶۶/۶۰ $\pm$ ۲/۰۰ ^a	۵۳۹/۸۰ $\pm$ ۲۵/۳۱ ^b	۰/۵۰ $\pm$ ۰/۱۱ ^a	۱۶/۷۶ $\pm$ ۱/۳۶ ^a	۱۸۰	
۱۴۶/۰ $\pm$ ۳۲/۷ ^a	۶۷/۵ $\pm$ ۲/۱۰ ^a	۶۲۱/۸۳ $\pm$ ۳۰/۶۶ ^a	۰/۵۰ $\pm$ ۰/۱۳ ^a	۱۶/۸۹ $\pm$ ۱/۲۴ ^a	۶۰	
۱۴۷/۳ $\pm$ ۲۸/۰ ^a	۶۸/۲۵ $\pm$ ۲/۴۴ ^a	۶۱۴/۳۲ $\pm$ ۳۰/۴۳ ^a	۰/۵۱ $\pm$ ۰/۱۱ ^a	۱۷/۰۱ $\pm$ ۱/۳۲ ^a	۳۰	
۱۵۰/۰۵ $\pm$ ۲۹/۷ ^{nsA}	۶۶/۴۶ $\pm$ ۲/۶۹ ^{nsA}	۵۶۷/۳۹ $\pm$ ۳۲/۵ ^{*B}	۰/۵۰ $\pm$ ۰/۱۴ ^{nsA}	۱۶/۵۸ $\pm$ ۱/۵۵ ^{*A}	-	میانگین
۱۴۳/۵ $\pm$ ۲۶/۳ ^a	۶۲/۰۰ $\pm$ ۱/۴۱ ^a	۵۰۵/۵۰ $\pm$ ۲۴/۴۷ ^c	۰/۴۹ $\pm$ ۰/۰۹ ^a	۱۵/۹۳ $\pm$ ۱/۴۷ ^a	۲۴۰	CTWS (C111)
۱۵۹/۰ $\pm$ ۲۷/۹ ^a	۶۵/۲۱ $\pm$ ۲/۰۱ ^a	۶۱۷/۵۰ $\pm$ ۲۴/۰۹ ^b	۰/۵۱ $\pm$ ۰/۱۰ ^a	۱۶/۳۳ $\pm$ ۱/۳۶ ^a	۱۸۰	
۱۵۲/۵ $\pm$ ۲۵/۴ ^a	۶۸/۵ $\pm$ ۳/۵۳ ^a	۶۵۴/۷۵ $\pm$ ۲۹/۵۵ ^a	۰/۵۲ $\pm$ ۰/۱۰ ^a	۱۶/۸۰ $\pm$ ۱/۳۳ ^a	۶۰	
۱۵۱/۵ $\pm$ ۳۰/۹۶ ^a	۶۹/۵ $\pm$ ۳/۵۲ ^a	۶۶۲/۰۱ $\pm$ ۲۲/۳ ^a	۰/۵۲ $\pm$ ۰/۱۲ ^a	۱۷/۰۱ $\pm$ ۱/۲۱ ^a	۳۰	
۱۵۱/۶۲ $\pm$ ۳۲/۵ ^{nsA}	۶۶/۳۰ $\pm$ ۳/۱ ^{nsA}	۶۰۹/۹۴ $\pm$ ۳۰/۵ ^{*A}	۰/۵۱ $\pm$ ۰/۱۳ ^{nsA}	۱۶/۰۵ $\pm$ ۱/۶۱ ^{*A}	-	میانگین

*: $P < 0.05$ تفاوت معنی دار از گروه کنترل، علائم A, B: نشان دهنده مقایسه میانگین گرو های تیماری از یکدیگر در تمامی دوز ها، علائم a, b: نشان دهنده مقایسه سطوح دوز دریافت شده در هر گروه تیماری

گلرنگ به میزان ۲۳، ۳۵ و ۴۸ درصد کل جیره غذایی، به طور معنی داری وزن متوسط بدن جوجه ها را کاهش می دهد. همچنین Kwon و همکاران (۲۷) گزارش دادند که مصرف دانه های سفید رنگ گلرنگ به مدت ۱۳ هفته وزن موش های نژاد F344 را کاهش داد. از سوی دیگر، Koyama و همکاران (۲۸) با مطالعه بر روی افراد داوطلب سالم به منظور بررسی اثر مصرف عصاره دانه گلرنگ بر روی نشانه های ریسک اکسیداسیون و رگ های قلبی نشان دادند که مصرف دانه های سفید رنگ گلرنگ تغییری در وزن بدن افراد تحت مطالعه ایجاد نکرد. همچنین ارزیابی تغییرات وزن ارگان های حیاتی کبد و کلیه در مطالعه حاضر نشان داد که مصرف دانه های رنگی و سفید رنگ گلرنگ بر

بحث و نتیجه گیری

گونه های گیاهی حاوی مجموعه پیچیده ای از ترکیبات شیمیایی می باشند که بر کل بدن یا ارگان خاصی تأثیر می گذارند به طوری که برخی از این ترکیبات شیمیایی حتی در دوزهای بالا ایمن می باشند و برخی در دوزهای پائین قویاً دارای خاصیت سمی می باشند. در مطالعه حاضر، نتایج نشان داد که مصرف دانه های پوسته سیاه (A82) و سفید (C111) به مدت ۵ هفته وزن بدن موش های نژاد ویستار را در همه دوزهای مصرفی، در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد. بر خلاف نتایج حاضر مطالعات Mohan و همکاران (۲۶) نشان داد که استفاده از دانه های سفید رنگ

یابد. در یک کبد بیمار، مجرای صفرا غالباً مسدود می گردد و ALP ساخته شده در درون کبد باقی می ماند بنابراین این آنزیم در کبد تجمع می یابد و نهایتاً به داخل جریان خون ترشح می شود (۲۹). نتایج این تحقیق نشان داد احتمالاً مصرف دانه گلرنگ می تواند منجر به بهبود عملکرد کبد گردد؛ با این حال برای بررسی دقیق تر این نتیجه نیاز است که پیامد مصرف دانه گلرنگ در گروه های بیمار بررسی گردد. گزارشاتی مبنی بر تأثیر مثبت مصرف کلاله قرمز رنگ گلرنگ در مقابل صدمات شدید کبدی ناشی از مصرف کربن تترا کلراید (CCl₄) در موش (۳۰) و فاکتور A، بخش اصلی رنگدانه زرد گلرنگ، بر روی هیپاتیت مزمن (۳۱) وجود دارد؛ با این وجود اطلاعاتی در خصوص تأثیر مصرف دانه گلرنگ بر روی بیماری های کبدی منتشر نشده است.

همچنین مطالعه حاضر نشان داد که سطح BUN و Cr به عنوان نشانگرهای تشخیص آسیب کلیوی، در گروه های تیماری در مقایسه با گروه کنترل پائین تر بود. همچنین در تأیید نتایج نشانگرهای بیوشیمیایی سرم خون، در تمامی گروه های تیماری هیچ گونه تغییرات هیستولوژیکی کلیوی مشاهده نگردید. بر خلاف عدم تأثیر منفی مصرف دانه گلرنگ در مطالعه حاضر، فاکتور A، استخراج شده از گل و بخش اصلی رنگ دانه زرد گلرنگ، صدمات کلیوی خفیفی را در رت های آزمایشی القا نمود (۳۲).

گزارشات اندکی در خصوص امکان وجود اثرات سمی بخش های مختلف گلرنگ بر روی حیوانات آزمایشگاهی موجود است. نوبخت و همکاران (۳۳) اثرات سمی بخش گل گیاه گلرنگ را بروی سیستم عصبی گزارش دادند. نامجو و همکاران (۳۴) اثرات مصرف عصاره گل گلرنگ را در دوران شیردهی بر روی بافت های مغز، کبد و کلیه نوزادان موش سوری مورد ارزیابی قرار دادند و نتایج بررسی نشان داد که مصرف عصاره گل گلرنگ در مادران شیرده، برای نوزادان

روی وزن این ارگان ها اثری نداشته است. بنابراین این نتایج می تواند گویای اثر احتمالی افزایش اشتها ناشی از مصرف دانه های گلرنگ باشد که نهایتاً منجر به افزایش توده های چربی بدن و افزایش وزن بدن موش های تحت تیمار گردیده است؛ با این وجود ارتباط مصرف دانه گلرنگ و تغییرات اشتها تا بحال گزارش نگردیده است. همچنین این احتمال وجود دارد که تغییرات وزن بدن ناشی از میزان محتوی روغن موجود در دانه گلرنگ باشد که نهایتاً منجر به افزایش توده های چربی و افزایش وزن بدن موش ها گردیده است. در خصوص میزان یا محتوی روغن گلرنگ پوسته مشکی "A82" گزارشی منتشر نشده است اما به نظر می رسد که با توجه به تأثیر بیشتر دانه های پوسته سیاه گلرنگ بر روی وزن بدن، احتمالاً این ژنوتیپ محتوی روغن بالاتری نسبت به دانه های پوسته سفید داشته باشند.

همان طور که در نتایج گزارش گردید، سطوح آنزیم های آسپارات- ترانس آمیناز (AST) و آلانین- ترانس آمیناز (ALT) در گروه های تیماری و همچنین در مقایسه با گروه کنترل، تغییرات معنی داری را نشان ندادند. همچنین در تأیید نتایج حاصل از آزمون بیوشیمیایی سرم خون، هیچ گونه تغییرات هیستولوژیکی در کبد حیوانات تحت تیمار مشاهده نشد. ترانس آمیناز های کبدی (ALT و AST) به عنوان مهم ترین نشانگرهای تشخیص آسیب کبدی، به طور طبیعی در سلول های کبدی، کلیه و مغز وجود دارند و هنگام آسیب این سلول ها به علت اختلال در غشای پلاسمایی و یا متلاشی شدن آن ها به درون خون تخلیه شده و باعث افزایش سطوح سرمی این آنزیم ها می شوند (۲۹). علاوه بر این مصرف دانه های پوسته سیاه لاین "A82" در گروه تیماری CTBS توانست به طور معنی دار و مؤثرتری نسبت به گروه تیماری CTWS سطوح آنزیم ALP را کاهش دهد. ALP به عنوان یک آنزیم تشخیص آسیب کبدی، در کبد ساخته می شود و به صفرا ترشح می

اصفهان، جهت در اختیار قرار دادن نمونه های گیاهی تشکر و قدردانی به عمل می آید.

سمی بوده و باعث ایجاد آسیب هایی در بافت های کبد، کلیه و همچنین مغز می شود .

در مطالعه حاضر، لاین C111، یک وارسته ایرانی پوسته سفید و والد مادری لاین A82 است و از آن جایی که لاین A82 با رنگ سیاه پوسته در نتیجه تلاقی برگشتی با لاین C111 و هشت نسل خودگشتی ایجاد گردیده است؛ از نقطه نظر علم اصلاح گیاهان، این دو لاین ایزوژنتیک می باشند؛ این بدان معنا است که این دو لاین بطور تقریبی دارای زمینه ژنتیکی یکسانی می باشند. بنابراین می توان استنباط کرد که تفاوت معنی دار مشاهده شده بین گروه های تیماری CTBS و CTWS از نقطه نظر تغییرات وزن بدن و میزان آنزیم ALP احتمالاً ناشی از اثر رنگ پوسته متفاوت می باشد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مصرف دانه گلرنگ بخصوص دانه پوسته سیاه لاین A82 فاقد هرگونه اثرات منفی بر روی بافت کبد و کلیه موش نژاد ویستار می باشد. همچنین، با توجه به اثرات مثبت و افزایشی مصرف دانه های A82 بر روی وزن بدن موش های گروه تیماری CTBS، مطالعات تکمیلی توصیه می شود تا مکانیسم عمل A82 بر روی این صفت مشخص گردد، چرا که این اثر مثبت و افزایشی بر روی وزن بدن می تواند یک فاکتور مهم و تجاری قابل توجه در صنعت پرورش ماکیان باشد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از اعتبارات دانشگاه پیام نور و حاصل طرح تحقیقاتی با کد ۷۳۲۹ و کد اخلاق ۷۳۳۰ بوده است، بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور به دلیل تقبل هزینه انجام طرح و حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز و دانشکده آناتومی به دلیل همکاری در اجرای طرح و جناب آقای دکتر محمد رضا سبزلعیان دستجردی عضو هیأت علمی دانشگاه صنعتی



References

1. Hiramatsu M, Takahashi T, Komatsu M, Kido T, Kasahara Y. Antioxidant and neuroprotective activities of Mogami-benibana (safflower, *Carthamus tinctorius* Linne). *Neurochem Res*. 2009; 4: 795-805.
2. Ashrafi E, Razmjoo, K. Effect of irrigation regimes on oil content and composition of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars. *J Am Oil Chem Sci*. 2010; 87: 499-506.
3. Yeilaghi H, Arzani A, Ghaderian M, Fotovat R, Feizi M, Pouredad SS. Effect of salinity on seed oil content and fatty acid composition of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes. *Food chem*. 2012; 130: 618-625.
4. Lin JK, Weng MS. Flavonoids as nutraceuticals. Springer New York. 2006; pp: 213-238.
5. Cho SH, Lee HR, Kim TH, Choi SW, Lee WJ, Choi Y. Effects of defatted safflower seed extract and phenolic compounds in diet on plasma and liver lipid in ovariectomized rats fed high-cholesterol diets. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2004; 50: 32-37.
6. Roh JS, Han JY, Kim JH, Hwang JK. Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis. *Biol Pharm Bull*. 2004; 27: 1976-1978.
7. Suzuki K, Tsubaki S, Fujita M, Koyama N, Takahashi M, Takazawa K. Effects of safflower seed extract on arterial stiffness. *Vasc Heal Risk Manag*. 2010; 6: 1007.
8. Takahashi T, Miyazawa M. Potent α -Glucosidase Inhibitors from Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seed. *Phytother Res*. 2012; 26: 722-726.
9. Ramanamurthy GV. Relationships of cultivated safflower (*Carthamus tinctorius* L.) to the wild species *C. oxyacantha*. University of California, Davis. 1968; pp: 106.
10. Sabzalain MR, Saeidi G, Mirlohi A, Hatami, B. Wild safflower species (*Carthamus oxyacanthus*): A possible source of resistance to the safflower fly (*Acanthiophilus helianthi*). *Crop Prot*. 2010; 29: 550-555.
11. Sabzalain MR, Saeidi G, Mirlohi A. Oil content and fatty acid composition in seeds of three safflower species. *J Am Oil Chem Soci*. 2008; 85: 717-721.
12. Takimoto T, Suzuki K, Arisaka H, Murata T, Ozaki H, Koyama N. Effect of *N*-(p-coumaroyl) serotonin and *N*-feruloylserotonin, major anti-atherogenic polyphenols in safflower seed, on vasodilation, proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Mol Nutr Food Res*. 2001; 55: 1561-1571.
13. Yu SY, Lee YJ, Kim JD, Kang SN, Lee SK, Jang JY, et al. Phenolic composition, antioxidant activity and anti-adipogenic effect of hot water extract from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. *Nutr*. 2013; 12: 4894-4907.
14. Kim EO, Lee KT, Choi SW. Chemical comparison of germinated- and ungerminated-safflower (*Carthamus tinctorius*) seeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2008; 37: 1162-1167.
15. Shen Y, Jin L, Xiao P, Lu Y, Bao J. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *J Cereal Sci*. 2009; 49: 106-111.
16. Thaddi BN, Nallamilli MN. Estimation of total bioactive compounds in pigmented and non-pigmented genotypes of Sorghum (*Sorghum*

- bicolor* (L.) Moench). Int J Adv Res Sci Technol. 2014; 3: 86-92.
17. Ahuja U, Ahuja SC, Chaudhary N, Thakrar R. Red rice—past, present and future. Asian Agri-History. 2007; 11: 291-304.
18. Chung HS, Shin JC. Characterization of antioxidant alkaloids and phenolic acids from anthocyanin-pigmented rice (*Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo). Food Chem. 2007; 104: 1670-1677.
19. Finocchiaro F, Ferrari B, Gianinetti A, Dall'Asta C, Galaverna G, Scazzina F, et al. Characterization of antioxidant compounds of red and white rice and changes in total antioxidant capacity during processing. Mol Nutr Food Res. 2007; 51: 1006-1019.
20. Jang S, Xu Z. Lipophilic and hydrophilic antioxidants and their antioxidant activities in purple rice bran. J agri food chem. 2009; 57: 858-862.
21. Talpur MA, Hussan T, Rustamani MA, Gaad MA. Relative resistance of safflower varieties to safflower shoot fly, *Acanthiophilus helianthi* Rossi (Diptera: Tephritidae). Proc Pakistan Conger Zool. 1995; 15: 177-181.
22. Ashri A. Evaluation of the world collection of safflower, *Carthamus tinctorius* L. I. Reaction to several diseases and associations with morphological characters. Crop Sci. 1971; 11: 253-257.
23. Viel JF, Challier B, Pitard A, Pobel D. Brain cancer mortality among French farmers: the vineyard pesticide hypothesis. Environ Health Int J. 1998; 53: 65-70.
24. Xu X, Dailey AB, Talbott EO, Ilacqua VA, Kearney G, Asal NR. Associations of serum concentrations of organochlorine pesticides with breast cancer and prostate cancer in US adults. Environ health perspect. 2010; 60-66.
25. Sabzalain MR, Tirgir F, Mirlohi A, Saiedi Gh. Identification and application of anthocyanine from wild safflower (*Carthamus oxyacanthus*) seed coat color. J herbal drugs. 2011; 2: 83-87.
26. Mohan L, Reddy CV, Rao PV, Siddiqui SM. Safflower meal as a protein source in broiler rations. Indian J Anim Sci. 1984; 54: 870-875.
27. Kwon E, Choi HJ, Kim YS, Lee SK, Lee KH, Chung JH, et al. Toxicological Study of Safflower Seeds by Thirteen-Week Repeated Oral Administration in F344 Rats. Lab Anim Res. 2008; 24: 527-542.
28. Koyama N, Suzuki K, Furukawa Y, Arisaka H, Seki T, Kuribayashi K, et al. Effects of safflower seed extract supplementation on oxidation and cardiovascular risk markers in healthy human volunteers. Brit J Nutr. 2009; 101: 560.
29. Aragon G, Younossi ZM. When and how to evaluate mildly elevated liver enzymes in apparently healthy patients. Cleve Clin J Med. 2010; 77: 195-204.
30. Li XF, Li ZK, Wu SC, Ding H. 2013. Effect of safflower red pigment on acute liver injury induced by CC1₄ in mice. Modern Food Sci Technol. 2013; 7: 021.
31. Zhang Y, Guo J, Dong H, Zhao X, Zhou L, Li X, et al. 2011. Hydroxysafflor yellow A protects against chronic carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. Eur J Pharmacol. 2011; 660: 438-44.
32. Liu Z, Li C, Li M, Li D, Liu K. The subchronic toxicity of hydroxysafflor yellow A of 90 days repeatedly intraperitoneal injections in rats. Toxicology. 2004; 203: 139-143.

33. Nobakht M, Fattahi M, Hoormand M, Milanian I, Rahbar N, Mahmoudian MA. Study on the teratogenic and cytotoxic effects of safflower extract. J Ethnopharmacol. 2000; 73: 453-459.

34. Namjoo A, Rafieian M, Azizi S, Talebi-Juneghani A. Histopathologic effects of *Carthamus tinctorius* on the brain liver and kidney of the new born mice. J Shahrekord Univ Med Sci. 2010; 11: 38-45.



The effects *Safflower Seed* (A new variety of pigmented coat seeds) Consumption on the Liver and Kidney Tissues of Male Wistar Rats

Soraya Karami^{*1}, Layasadat Khorsandi²

1. Lecturer, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Cell & Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences

Abstract

Background & Objective: Seeds of cultivated *safflower* which are now used in pharmaceutical and food industries are in white coat color. No commercially available pigmented genotype of cultivated *safflower* has been reported yet. This study was to investigate *the* probable toxicological effects of black coat seed of a new pigmented variety of safflower (A82) on liver and kidney tissues of male wistar rats.

Method: In the present experimental study, 54 male wistar rats were randomly divided into 2 groups of 24 (including 4 subgroups of 6 rats) and a control group of 6 rats. Group 1 (control group), distilled water, group 2 (CTBS) and Group 3 (CTWS) were respectively given grain crust suspension (A82) and white shell (C111) safflower on a daily basis, at doses of 30, 60, 180 and 240 mg per kg body weight orally for 5 weeks. In order to address the biochemical tests including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cr), arterial blood samples were taken. Regarding histological studies, liver and kidney organs were removed immediately. After fixation of samples in 10% formalin, 4-5 μ m tissue sections were prepared. Hematoxylin and Eosin (H&E) staining method followed by light microscopy was used to examine the sections. One-way ANOVA was used to compare the means between groups and least significant difference (LSD) was used to perform additional tests.

Results: In both CTBS and CTWS treatment groups, the body weight of wistar rats increased significantly in a dose-dependent manner (233.00 ± 4.74 and 218.76 ± 5.43 , respectively) compared to the control group (196.79 ± 4.88). The increasing trend was significantly higher in CTBS group compared to the CTWS group ($p < 0.05$). In contrast to the results of body weight, organ weights of liver and kidney treatment groups were not significantly changed in all treatment groups. The serum levels of ALT and AST showed no significant difference between treatment groups and also in comparison to the control group. The serum level of ALP within CTBS treatment group (567.39 ± 32.5) was significantly lower than CTWS (609.94 ± 30.5) and control groups (819.50 ± 38.21) ($p < 0.05$). BUN and Cr were decreased among treatment groups in comparison to

the control group ($p>0.05$). Moreover, regarding histopathological studies, neither liver nor kidney necrosis or damages were visualized in treatment groups in a dose-dependent manner.

Conclusion: Our findings showed that safflower seed, especially black ones (A82) has no toxic effects over liver and kidney tissues. The positive effects of black seeds on body weight among wistar rats may be an interesting effect to be further investigated for exploitation in the poultry industry.

Key words: Black Seed Coat Safflower, Biochemical and Histopathology effects, Wistar Rat

Corresponding Author: Soraya Karami

Address: Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

E-mail: karamisoraya@gmail.com

