

بررسی تأثیر عصاره زعفران بر الگوی الکتروفوریک اجزای پروتئینی سرم

در موشهای سوری نر

دکتر مهرداد مدرسی^۱، دکتر منوچهر مصری پور^۲، مهران اسدی مرغملکی^۳

۱- استادیار گروه علوم دامی، دکترای تخصصی زیست شناسی تکوینی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، خوراسگان، ایران، (مؤلف مسؤول) تلفن: ۰۳۱۱۴۳۵۴۰۱
mehrdad_modaresi@hotmail.com

۲- استاد گروه بیوشیمی، دکترای تخصصی بیوشیمی کلینیکال، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، خوراسگان، ایران

۳- کارشناس ارشد علوم جانوری (فیزیولوژی)، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به کاربرد وسیع زعفران بعنوان رنگ و چاشنی در الگوی تغذیه مردم بسیاری از مناطق جهان، این تحقیق جهت تعیین اثرات احتمالی عصاره زعفران بر روی اجزای پروتئینی خون در موش سوری انجام گرفت.

روش بررسی: بدین منظور پنج گروه هشت تایی از موشهای آزمایشگاهی کوچک نر بالغ مورد استفاده قرار گرفت. گروه کنترل (sham) نرمال سالین دریافت کرد و چهار گروه دیگر چهار دوز متفاوت ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg/48h از عصاره زعفران را به مدت ۲۰ روز دریافت کردند. پروتئین‌های پره آلومین، آلومین، آلفا-۱، آلفا-۲، بتا، و گاما گلوبولین‌ها با روش الکتروفورز از سرم جدا گردید و با استفاده از آنالیز رایانه ای مقدار آنها اندازه گیری شد. نسبت A/G (نسبت آلومین به گلوبولین) با توجه به الگوی الکتروفور توگرام محاسبه گردید.

یافته‌ها: میانگین سطح سرمی پره آلومین و آلومین در گروههای تجربی دوم (۵۰ mg/kg/48h) و سوم (۱۰۰ mg/kg/48h) با گروه کنترل تفاوت معنی دار داشته اما بین سایر گروهها و گروه کنترل تفاوت معنی داری مشاهده نشد. سطح سرمی آلفا-۱ در هیچ یک از گروهها تفاوت قابل ملاحظه‌ای با گروه کنترل نداشت. میانگین سطح سرمی آلفا-۲ و بتا در گروههای تجربی تیمار شده با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg/48h و سطح سرمی گاما در گروههای تیمار شده با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg/48h نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری نشان داد ($p < 0.05$). همچنین نسبت A/G در همه گروههای تجربی در مقایسه با گروه کنترل بصورت وابسته به دوز تفاوت معنی داری نشان می‌دهد ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: با توجه به اینکه سنتز آلومینها در کبد صورت می‌گیرد افزایش میزان آلومین نشان دهنده بهبود عملکرد کبد در اثر تزریق عصاره زعفران می‌باشد. همچنین افزایش سنتز گلوبولینها و کاهش نسبت A/G نشان می‌دهد عصاره زعفران توانسته بدون ایجاد تحریک آنتی ژنیک موجب تقویت سیستم ایمنی گردد.

کلید واژه‌ها: آلومین، گلوبولین، سرم، موش سوری، زعفران

وصول مقاله: ۸۷/۴/۲۲ اصلاح نهایی: ۸۷/۸/۲۰ پذیرش مقاله: ۸۷/۸/۲۸

مقدمه

کلاله خشک شده زعفران (*Crocus sativus* L) دارای رایحه شیرین و مزه تلخ است و از زمانهای قدیم بعنوان یک چاشنی و رنگ در غذاها استفاده می‌شود. همچنین زعفران در طب سنتی کاربردهای متنوعی از

قبیل: محرک و تقویت کننده نیروی جنسی (۳-۱)، ضد اسپاسم (۴)، ضد افسردگی (۵) و التهاب داشته (۶) و از آن در درمان اختلالات وسیعی همچون بیماریهای قلبی و عروقی (۷) و ضایعات مغزی استفاده می‌شود (۸).

اخیراً مطالعات نوین فارماکولوژی بر فعالیت زیستی عصاره‌های متنوع گیاهی متمرکز شده است. این مطالعات نشان داده، عصاره زعفران شامل ترکیبات زیادی از جمله: α -کروستین (α -crocetin)، یک کاروتنوئید محلول در آب، کروستین‌ها شامل: کروستین (*Crocine*)، دی کروستین (*Dicrocine*) و تری کروستین (*Tricrocine*)، پیکروکروستین (*Picrocrocin*) و سافرانال (*safranal*) (۹) است که در جلوگیری از تحلیل نورونها و تقویت حافظه نقش دارند

(۸،۱۰)، اثرات ضد افسردگی عصاره آبی و اتانولی گلبرگهای گل زعفران در موش به اثبات رسیده است (۵). گلبرگهای زعفران منبع سرشار از فلاونوئیدهای پلی فنول به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی می‌باشند که در سرم خون بصورت متصل به آلبومین حمل می‌گردد و دارای تأثیر متقابل با ساختار این پروتئین سرم می‌باشد (۱۱). زعفران محافظ آسیب دیدن کروموزومها و تعدیل کننده پراکسیداسیون چربی‌ها و یک آنتی اکسیدان قوی و منبع سرشار ریوفلاوین است (۱۲،۱۳). ضد درد و ضد التهاب، ضد حمله‌های ناگهانی (صرع) و اسپاسم است (۴،۶) است. اثرات ضد سرطانی زعفران شامل مهار

تشکیل تومورها ضد جهش و مهارکننده سنتز نوکلئیک اسیدها در سلولهای بدخیم انسان است (۱۴،۱۵). در زمینه تأثیر عصاره زعفران بر اجزای پروتئینی سرم تا کنون گزارشی ارائه نشده است.

روش بررسی

این مطالعه از نوع تحقیق تجربی می‌باشد.

حیوانات آزمایشگاهی

در این آزمایش از موشهای کوچک آزمایشگاهی نر بالغ (۳۰-۴۰ گرم) گونه Balb/C، تهیه شده از مؤسسه پاستور کرج استفاده شد. نمونه‌ها به طور تصادفی به پنج گروه هشت تایی شامل گروه کنترل (sham) و گروههای تجربی یک، دو، سه و چهار تقسیم شدند. موشها در شرایط استاندارد ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ ، رطوبت نسبی ۵۵٪-۵۰، نور طبیعی) (۱۶) درون قفسهای پلکسی گلاس (cm $40 \times 30 \times 20$) چهار موش در هر قفس و همراه با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند

عصاره گیری زعفران

زعفران مورد اعتماد بصورت کلاله خشک شده از مزرعه زعفران کمال، واقع در علی آباد مهردشت اصفهان تهیه شد. رطوبت گیری اولیه در مزرعه به مدت یک هفته در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتیگراد) صورت گرفت. مقدار ۱۰۰ میلی گرم پودر زعفران در ۵ سی سی محلول سرم فیزیولوژی حل شد. محلول حاصل به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتیگراد) نگهداری شد. یک لوله سانتریفوژ خشک را وزن نموده و محلول حاصل را در آن ریخته و به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰، سانتریفوژ نمودیم. سپس محلول روئی را بطور کامل خارج نموده و لوله را به همراه رسوبات به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فور با دمای ۸۰ درجه سانتیگراد قرار داده تا کاملاً

یافته‌ها

در الکتروفور توگرام سرم موش سوری علاوه بر موج‌های مربوط به پروتئین‌های آلبومین، α_1 ، α_2 ، β و γ که در الکتروفورز انسان ایجاد می‌گردد موجی از پروتئین‌های پره آلبومین نیز به وضوح دیده شد (تصویر ۱).

مقایسه میانگین سطح زیر منحنی پره آلبومین و آلبومین (جدول ۱) با اطمینان بیش از ۹۵٪ نشان دهنده افزایش معنی‌دار این دو پروتئین در گروه‌های تجربی سه و چهار (50 و 100 mg/kg/48h) نسبت به گروه کنترل است اما تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین سایر گروه‌ها مشاهده نشد. مقایسه میانگین غلظت پروتئین α_1 تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های تجربی و گروه کنترل نشان نداد (جدول ۱).

سطح سرمی پروتئین α_2 در گروه‌های تجربی دو، سه و چهار (50 و 100 و 200 mg/kg/48h) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار و سطح سرمی گلبولین‌های β در این سه گروه افزایش معنی‌دار داشت (جدول ۱).

سطح سرمی گلبولین‌های γ در گروه‌های تجربی سه و چهار (100 و 200 mg/kg/48h) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد (جدول ۱).

محاسبه نسبت گلبولین‌ها به آلبومین‌ها و مقایسه A/G در گروه‌های تجربی و کنترل نشان دهنده کاهش معنی‌دار به صورت وابسته به دوز در گروه‌های تجربی می‌باشد (جدول ۱).

خشک شود. لوله سانتریفوژ و رسوبات خشک شده را وزن نمودیم تا وزن مقدار ماده حل نشده بدست آید و با کم نمودن از مقدار اولیه، وزن ماده حل شده محاسبه گردید. پس از محاسبه وزن ماده حل شده حجم محلول روئی، به مقداری افزایش یافت که غلظت آن 10 mg/ml گردید.

تزریق عصاره

تزریق عصاره بصورت درون صفاقی (IP) در محل نگهداری حیوانات، هر ۴۸ ساعت یکبار به مدت ۲۰ روز انجام شد. خونگیری از قلب در شرایط بی‌هوشی نسبی نمونه‌ها، ۱۲ ساعت پس از آخرین تزریق صورت گرفت.

الکتروفورز پروتئین‌های سرم

در این مطالعه از روش الکتروفورز با ماده زمینه‌ای استات سلولز استفاده گردید. بافر مورد استفاده باربی تورات و ولتاژ برابر 160 میلی ولت در زمان 30 دقیقه تنظیم شد. نمونه‌های سرمی در چاهک‌های معین درون ماده زمینه‌ای قرار داده شد و پروتئین‌ها بر اساس اختلاف سرعت حرکت در میدان الکتریکی از هم تفکیک شدند. پس از اسکن دانسیتومتر سطح زیر منحنی در الکتروفور توگرام توسط رایانه محاسبه و به عنوان سطح سرمی پروتئین در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری

مقایسه میانگین غلظت پروتئین‌های سرم با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن در سطح اطمینان بیش از ۹۵٪ انجام شد. تفاوتها در صورتی که $P < 0.05$ باشد معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱: مقادیر پروتئین‌های سرم موشهای سوری در گروه‌های مورد بررسی

نام گروهها	گروه ۱ (کنترل)	گروه ۱ (تجربی) ۲۵ mg/kg	گروه ۲ (تجربی) ۵۰ mg/kg	گروه ۳ (تجربی) ۱۰۰ mg/kg	گروه ۴ (تجربی) ۲۰۰ mg/kg
پروتئین پره آلبومین	۲/۷۲۵±۰/۰۴۵	۲/۸۸۸±۰/۰۵۱	۳/۱۲۵±۰/۰۶۷	۳/۰۷۵±۰/۰۴۵	۲/۸۲۵±۰/۰۹۰
پروتئین آلبومین	۲/۶۵۰±۰/۰۴۲	۲/۷۵۰±۰/۰۴۶	۲/۹۷۵±۰/۰۷۵	۳/۰۱۳±۰/۰۴۴	۲/۸۰۰±۰/۰۸۸
پروتئین آلفا ۱	۰/۷۵۰±۰/۰۱۸	۰/۷۸۸±۰/۰۳۵	۰/۶۸۸±۰/۰۲۲	۰/۷۵۰±۰/۰۶۲	۰/۷۰۰±۰/۰۳۲
پروتئین آلفا ۲	۰/۲۰۰±۰/۰۰۰	۰/۲۰۰±۰/۰۰۰	۰/۱۰۰±۰/۰۰۰	۰/۱۰۰±۰/۰۰۰	۰/۱۰۰±۰/۰۰۰
پروتئین بتا	۰/۵۶۳±۰/۰۲۶	۰/۵۸۸±۰/۰۱۲	۱/۱۳۸±۰/۰۱۸	۱/۱۷۵±۰/۰۳۱	۱/۳۲۵±۰/۰۵۹
پروتئین گاما	۰/۵۵۰±۰/۰۱۸	۰/۶۲۵±۰/۰۱۶	۰/۶۶۳±۰/۰۳۷	۱/۳۸۸±۰/۰۴۷	۱/۱۸۸±۰/۰۲۹
A/G	۱/۳۵۰±۰/۰۱۲	۱/۲۶۹±۰/۰۵۳	۱/۱۹۵±۰/۰۳۱	۰/۹۱۹±۰/۰۳۱	۰/۸۶۰±۰/۰۲۹

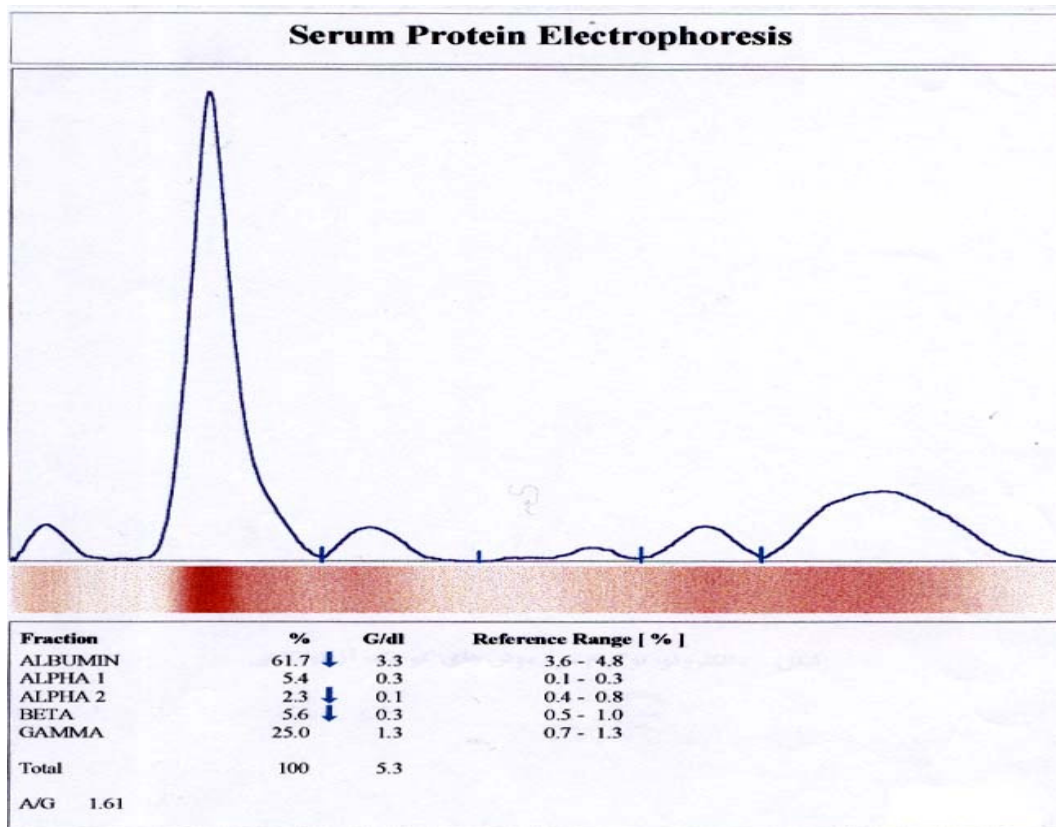
A/G

=نسبت آلبومین به گلوبولین

واحد سنجش پروتئین ها g/dl می باشد

داده ها بر اساس "انحراف معیار ± میانگین" می باشد

× P<۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل



نمودار ۱: تصویر الکتروفورتوگرام موش سوری گروه کنترل که در آن موج پره آلبومین دیده می شود

بحث

در منحنی الکتروفورز سرم موش سوری اولین موج مربوط به یک مولکول پیش ساز به نام «پره آلبومین» است. این پیش ساز در ناحیه انتهای آمینی خود واجد یک هگزا پتید اضافی است (۱۷). مقایسه الکتروفورتوگرام انسان و موشهای کوچک آزمایشگاهی نشان می دهد که مقدار پره آلبومین در سرم انسان، کمتر از حدی است که در الکتروفورز آن مشاهده گردد (۱۷) اما الکتروفورتوگرام موشهای کوچک آزمایشگاهی به طور خیلی مشخص، وجود نوار پره آلبومین را نشان می دهد که حاکی از مقدار بالای پره آلبومین در سرم موشها می باشد.

سنتز آلبومین در بیماریهای مختلف به خصوص در بیماریهای کبدی، کاهش می یابد (۱۸). بنابراین افزایش مقدار پره آلبومین و آلبومین در گروههای دو و سه نشان می دهد که تزریق عصاره زعفران نه تنها آسیبی به بافت کبد نرسانده بلکه احتمال می رود موجب افزایش در فعالیت کبدی شود. البته در مورد عمل کبد به غیر از اندازه گیری مقدار آلبومین، باید مقادیر پروتئین تام، گلبولین و نسبت آلبومین به گلبولین نیز بررسی گردد. تأثیر عصاره زعفران بر میزان سنتز آلبومین در کبد تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته اما پرم کومار و همکاران تأثیر عصاره زعفران را بر مهار آنزیم گلوکاتین ترانسفراز کبدی توسط برخی سموم مورد بررسی قرار داده و نشان دادند تیمار موشها با عصاره زعفران باعث بهبود عملکرد این آنزیم کبدی در حضور ترکیبات سمی می گردد (۱۶). همچنین مشخص شده گلبرگهای زعفران دارای ترکیب آنتی اکسیدان قوی از دسته فلاونوئیدهای پلی فنل می باشد که در خون بصورت

متصل به آلبومین حمل می گردد و دارای تأثیر متقابل در افزایش میزان این پروتئین حمل کننده می باشد (۱۱). در این تحقیق، تغییر معنی داری در مقدار آلفا-۱- گلبولین در گروههای تجربی مشاهده نشد. بیشترین جزء آلفا-۱- گلبولینها را آلفا-۱- آنتی پروتئیناز تشکیل می دهد. کاهش آلفا-۱- آنتی پروتئیناز با آمفیزم و نوعی بیماری کبدی ارتباط دارد و افزایش آلفا-۱- آنتی پروتئیناز در پاسخ به آماس حاد مشاهده می گردد (۱۸، ۱۹).

اما در گروههای تحت مطالعه تفاوت معنی داری در مقدار این پروتئین در مقایسه با کنترل مشاهده نشد. پروتئینهای اصلی در نوار آلفا-۲- گلبولین، شامل آلفا-۲- ماکرو گلبولین و هاپتو گلبولین می باشند (۱۷). استفاده از عصاره زعفران در این مطالعه، باعث کاهش معنی داری در مقدار آلفا-۲- گلبولین در گروههای تجربی دوم، سوم و چهارم گردید. افزایش نفوذپذیری مویرگهای گلو مرون در سندروم نفروتیک، با از دست رفتن سایر پروتئینهای کوچک، موجب افزایش مقدار آلفا-۲- ماکرو گلبولین به ده برابر یا حتی بیشتر می گردد. در این بیماری در الگوی الکتروفورزی افت آلبومین و آلفا-۱- گلبولین و افزایش آلفا-۲- ماکرو گلبولین به چشم می خورد (۱۸). افزایش مقدار آلبومین در گروههای دو و سه و عدم تغییر در مقدار آلفا-۱- گلبولین و کاهش میزان آلفا-۲- گلبولین در گروههای تجربی، نشان می دهد که احتمالاً مقادیر افزایش یافته زعفران، بدون ایجاد تغییر در نفوذپذیری مویرگهای گلو مرون سنتز پروتئینهای آلفا-۲- گلبولین را مهار نموده است.

در این مطالعه مقدار بتا- گلبولین در گروههای تجربی اول، دوم، سوم و چهارم افزایش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. ترانسفرین، بیشترین جز

بتا-گلوبولین را تشکیل می‌دهد. پروتئین فوق، یونهای فریک را از ذخایر داخل یاخته‌ای آهن یا فریتین مخاطی، به مغز استخوان انتقال می‌دهد (۲۰). افزایش میزان بتا-گلوبولین در گروههای تجربی، نشان می‌دهد که احتمالاً مقادیر افزایشدهنده عصاره زعفران در غلظت‌های بیش از ۲۵ mg/kg/48h می‌تواند نقش مثبتی به صورت وابسته به دوز در متابولیسم آهن در موش سوری داشته باشد.

افزایش معنی‌دار مقدار گاما-گلوبولین‌ها در گروههای تجربی سوم و چهارم نشان می‌دهد عصاره زعفران بدون ایجاد تحریک آنتی‌ژنیک توانسته موجب افزایش تولید ایمونوگلوبولین‌ها از پلاسماوسیت‌های خون گردد. تعیین نوع این ایمونوگلوبولین‌ها می‌تواند در تحقیقات بعدی مورد بررسی قرار گیرد. همه داروها باید از نظر تأثیر بر سیستم ایمنی مورد بررسی قرار گیرند. کاهش در سطح گلوبولین‌های سرم می‌تواند نشان دهنده کاهش تولید ایمونوگلوبولین‌ها باشد. اگر چه کاهش سطح سرمی پادتن‌ها یک شاخص نسبتاً غیر حساس است، پاسخ آنتی‌بادی برای تعیین مهارکنندگی سیستم ایمنی باید مورد ارزیابی قرار گیرد. افزایش گلوبولین‌های سرم در این مطالعه بدین معناست که زعفران می‌تواند تأثیر فرایندهای روی فعالیت سیستم ایمنی در موشهای سوری داشته باشد. جولویو و همکاران در یک تحقیق نشان دادند پروتئوگلیکان جدا شده از کورم زعفران با افزایش نیتریک اکساید و پروتئین کیناز C باعث بهبود عملکرد سیستم ایمنی می‌گردد (۲۱).

مطالعه بر روی موشهای کوچک آزمایشگاهی نشان داد که با تزریق عصاره زعفران، مقدار نسبت آلبومین به گلوبولین در تمامی گروههای تجربی، متناسب با افزایش دوز عصاره زعفران به طور معنی‌داری کاهش یافته است. سنتز آلبومین در بیماریهای مختلف به خصوص در بیماریهای کبدی، کاهش می‌یابد و در پلاسمای مبتلایان به بیماریهای کبدی غالباً نسبت آلبومین به گلوبولین، کاهش نشان می‌دهد. اما در این مطالعه با توجه به افزایش مقدار آلبومین در گروههای تجربی دوم و سوم و افزایش مقدار گلوبولین‌های بتا و گاما در اثر تزریق عصاره زعفران، این کاهش احتمالاً به علت افزایش شدیدتر مقدار گلوبولین‌ها، نسبت به آلبومین می‌باشد.

با توجه به نقش کبد در سنتز آلبومین، افزایش سنتز آلبومین را می‌توان به عنوان یک نشانه در بهبود فعالیت سلولهای کبدی پیشنهاد نمود. عدم تغییر در میزان پروتئین‌های آلفا-۱ و کاهش سطح سرمی آلفا-۲ نشان می‌دهد که احتمالاً عصاره زعفران بدون ایجاد تغییر در نفوذپذیری مویرگهای گلومرول، سنتز پروتئین‌های آلفا-۲ را مهار می‌کند. افزایش سطح بتا و گاما گلوبولینها علاوه بر اینکه موجب کاهش نسبت A/G می‌گردد، نشان دهنده این است که زعفران در متابولیسم آهن نقش مثبتی دارد و بدون ایجاد تحریک آنتی‌ژنیک باعث تقویت سیستم ایمنی موش سوری می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کلیه همکارانی که در این طرح ما را یاری نمودند تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Gopumadhavan S, Mohammad R, Venkataranganna MV, Kala Suhas K, Mitra SK. Assessment of 'Tentex royal' for sexual activity in an experimental model. *Indian Journal of Clinical Practice* 2003; (13): 23-26.
2. Kuram AH, Venkataraman BV. Assessment of a Polyherbal Ayurvedic Medicine for Sexual Activity in Rats. *Indian Drugs* 1999; 36: 576-582.
3. Mitra SK, Muralidhar TS Rao DRB. Experimental assessment of relative efficacy of drugs of herbal origin on sexual performance and hormone levels in alcohol exposed and normal rats *Phytotherapy. Res* 1996; 10: 296-299.
4. Hosseinzadeh H, Talebzadeh F. Anticonvulsant evaluation of safranal and crocin from *Crocus sativus* L in mice. *phytoterapia* 2005; 76: 722-724.
5. Moshiri E, AkhondzadehBasti A, Noorbala AA, Jamshidi AH, Abbasi SH, *Crocus sativus* L. (petal) in the treatment of mild-to-moderate depression: A double-blind, randomized and placebo-controlled trial; *Phytomedicine* 2006; 13: 607-611.
6. Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacology* 2002; 2: 147-155.
7. Fatehi M, Rashidabady T, Fatehi-Hassanabad Z. Effects of *Crocus sativus* petals' extract on rat blood pressure and on responses induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 84: 199-203.
8. Ochiai T, Shimeno H. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury invitro and invivo. *Biochimica Biophysica Acta* 2007; 1770: 578-584.
9. Abolhasani A, Bathaie SZ, Yavari I, Moosavi-movahedi AA Ghaffari M. Separation and Purification of Some Components of Iranian Saffron. *Asian Journal of Chemistry*. 2005; 2: 727-729.
10. Kazuho A, Hiroshi S. Effects of Saffron extract and its constituent crocin on learning behavior and long-term potentiation. *Phytotherapy Research*, 2000; 14: 149-152.
11. Kanakis CD, Tarantilis PA, Polissiou MG, Diamantoglou S, Tajmir-Riahi HA. Antioxidant flavonoids bind human serum albumin. *Journal of Molecular Structure* 2006; 798: 69-74.
12. Lindi L, Haolin Ch, Michael A, Trush MD. Show MD. Anway and Barry R. Zirkin; Aging and the Brown Norway Rat Leydig Cell Antioxidant Defense System; *Journal of Andrology* November 2005; 22: 46-50.
13. Premkumar K, Abraham SK, Santhiya ST, Ramesh A. Protective effects of saffron (*Crocus sativus* L) on genotoxin-induced oxidative stress in Swiss albini mice. *Phytother Res* 2003; 17: 614-7.
14. Abdullaev FI, Espinosa JJ. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detection and Prevention* 2004; 28: 426-432.
15. Abdullaev FI, Frenkel GD. Effect of saffron on cell colony formation and cellular nucleic acid and protein synthesis. *Biofactors* 1992; 3: 201-204.
16. Premkumar K, Abraham SK, Santhiya ST, Gopinath PM, Ramesh A. Inhibition of genotoxicity by saffron (*Crocus sativus* L) in mice *Drug and Chemical Toxicology*, 2001 24: 421-428.
17. West JB. Best and tailors physiological basis of medical practice. London: Williams & Wilkins; 1985. pp: 334-40.
18. Dugenci SK, Arda N, Candan A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *J Ethnopharmacol* 2003; 88: 99-106.
19. Isnard B C, Deray G, Baumelou A, Le Quintrec M, Vanherweghem JL. Herbs and the kidney. *Am J Kidney Dis*. 2004; 44: 1-11.
20. Jacobs A, Worwood M. Ferritin in serum. Clinical and biochemical implications. *N Engl J Med*. 1975; 292: 951-956.
21. Julio Escribano M, Jose AM. DoAaz-Gu, Hans H, Riesec J, OntanAo A. In vitro activation of macrophages by a novel proteoglycan isolated from corms of *Crocus sativus* L *Cancer Letters* 1999; 144: 107-114.