دانشور پزشکي

دوماهنامه علمي - پژوهشي دانشگاه شاهد
سال پانزدهم - شماره 76
شهريور 1387

وصول: 86/12/7
ارسال اصلاحات: 87/2/2
دريافت اصلاحات: 87/2/18

اثر کاروتنوئيدهاي محلول در آب زعفران بر پاسخ ايمني سلولي در موش BALB/c

نويسندگان: دکتر طيبه رجبيان[1]، دکتر طوبي غضنفري*[2] و فريده دانيالي[3]

1. استاديار گروه زيستشناسي دانشکده علوم‌پايه دانشگاه شاهد و عضو گروه تحقيقاتي تنظيم پاسخ‌هاي ايمني مرکز تحقيقات پزشکي
2. دانشيار گروه ايمونولوژي دانشکده پزشکي مرکز تحقيقات تنظيم پاسخ‌هاي ايمني دانشگاه شاهد
3. کارشناس ارشد فيزيولوژي جانوري دانشکده علوم‌پايه دانشگاه شاهد

* نويسنده مسئول:
E-mail: tghazanfari@yahoo.com

چکيده

مقدمه: زعفران در طب سنتي براي درمان بيماري‌هاي مختلف، از جمله سرطان و بيماري‌هاي عفوني مورد استفاده قرار مي‌گرفته‌است. در حال حاضر، فعاليت ضدتوموري، سيتوتوکسيک، ضد جهش‌زايي و آنتي‌اکسيدان متابوليت‌هاي مؤثر کلاله زعفران به‌ويژه کاروتنوئيدهاي آن (کروسين و کروستين) نشان داده شده‌است.

هدف: با توجه به ارزش غذايي زعفران و اهميت شناخت دقيق سازوکارهاي اثر آن، در اين مطالعه اثر کاروتنوئيدهاي محلول در آب کلاله اين گياه دارويي بر پاسخ ايمني سلولي در موش Balb/c مورد بررسي قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: کلاله‌هاي زعفران در فصل گلدهي تهيه و در فضاي فاقد رطوبت خشک گرديدند. ابتدا کلاله‌ها با استفاده از اتر نفت و دي اتيل اتر در يک دستگاه سوکسله و در تاريکي براي حذف کاروتنوئيدهاي غير گليکوزيدي، ليپيدها، ترکيبات معطر و پيکروکروسين عصاره‌گيري شدند و سپس در يک لوله دربوش‌دار محتوي 10 ميلي‌ليتر آب مقطر به مدت 20 دقيقه در حمام آب جوش براي جداسازي کاروتنوئيدهاي محلول در آب استخراج شدند. براي جداسازي بافت‌هاي گياهي باقيمانده، عصاره در 3000 g و در دماي 10°C به مدت 20 دقيقه سانتريفوژ شد. به 6 گروه 4 تايي موش Balb/c دوزهاي مختلف از عصاره تزريق گرديد. پاسخ ايمني سلولي با آزمون ازدياد حساسيت تأخيري و اندازه‌گيري فعاليت حياتي سلول‌ها به روش MTT انجام گرديد.

نتايج: تجويز مقادير 20 mg/kg و10 از عصاره حاوي کاروتنوئيدهاي محلول در آب زعفران، بدون حضور ميتوژن و مقدار 20 mg/kg از عصاره در حضور ميتوژن موجب کاهش معني‌داري در فعاليت حياتي سلول‌ها شدند. دوزهاي مختلف به کار رفته در اين مطالعه تاثير معني‌داري بر پاسخ DTH نداشتند.

بحث: نتايج اين مطالعه نشان داد که کاروتنوئيدهاي محلول در آب کلاله‌هاي زعفران به صورت وابسته به دوز باعث کاهش پاسخ ايمني سلولي مي‌گردند. انجام مطالعات بيشتر با دوزهاي مختلف و بررسي ساير سازوکارهاي ايمني پيشنهاد مي‌شود.

واژه‌هاي کليدي: زعفران، کاروتنوئيدها، ايمني سلولي، ازدياد حساسيت تأخيري، فعاليت حياتي سلول

مقدمه

زعفران (saffron) يک ادويه گران‌قيمت است که از کلاله‌هاي قرمز رنگ و سه شاخه زعفران زراعي (*Crocus sativus* L.) به دست مي‌آيد. زعفران گياهي پايا و علفي است که از گذشته‌هاي دور شناخته شده است. بعضي منشأ زعفران را نواحي مختلف آسيا، مانند هند و ايران مي‌دانند. هم اکنون ايران سهم عمده‌اي در توليد زعفران دنيا دارد.

زعفران به‌طور عمده به‌عنوان یک ماده رنگ‌دهنده و طعم‌دهنده در صنایع غذایي، دارویي و نساجي مورد استفاده قرار مي‌گیرد. رنگیزه هاي کاروتنوئیدي محلول در آب (کروسین‌ها)، گلیکوزید تلخ مزه پیکروکروسین و مواد فرار معطر (سافرانال) مهم‌ترین مواد کلاله زعفران را تشکیل مي‌دهند. زعفران در اروپا و مشرق‌زمین در طب سنتي براي درمان سرطان هایي چون مثانه، کبد، طحال، پستان، دهان، رحم توصیه مي‌شده است. زعفران گاهي نیز جهت درمان اسهال خوني، سرخک، تب، یرقان، بزرگ‌شدن کبد و طحال، عفونت دستگاه هاي ادراري، دیابت و همچنین به‌عنوان یک ماده محرک و آرام‌بخش مورد استفاده قرار مي‌گرفته است [1].

در طب نوین با مشخص شدن نقش زیستي برخي از فراورده هاي گیاهي، به‌ویژه کاروتنوئیدها در کاهش ابتلا به برخي بیماري‌ها به‌ویژه سرطان‌ها، مطالعات گسترده‌اي با کمک تجارب آزمایشگاهي و اپیدمولوژیکي روي مدل‌هاي حیواني و انساني بر روي خواص دارویي زعفران آغاز گردیده است[2-6]. در حال حاضر فعالیت ضد توموري، سیتوتوکسیک و ضدجهش‌زایي [7-14]، آنتي‌اکسیدان [15-18] و ضدسیت‌ژني [19-22]. متابولیت‌هاي مؤثر کلاله زعفران به‌ویژه، کاروتنوئیدهاي آن (کروسین و کروستین) نشان داده شده است.

سیستم ایمني در اتیولوژي و پاتوفیزیولوژي بیماري‌هاي متعدد دخالت مي‌کند. تعدیل پاسخ‌هاي ایمني به منظور بهبود و کنترل بیماري‌ها سال‌ها است که مد نظر محققین رشته هاي مختلف علوم‌پزشکي است. پاسخ هاي سیستم ایمني مي‌توانند توسط عوامل متعدد، از جمله برخي ترکیبات موجود در باکتري‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و نیز محصولات سنتزي تعدیل شوند. در سال‌هاي اخیر تلاش فراواني توسط محققین جهت شناسایي مواد تعدیل‌کننده سیستم ایمني صورت گرفته‌است که از این میان، توجه خاصي به گیاهان دارویي, محصولات طبیعي و طب مکمل شده‌است. لذا کنترل مطلوب پاسخ‌هاي ایمني پس از شناسایي ترکیبات ایمونومدولاتور مي‌تواند یکي از اهداف تحقیقاتي در علوم‌پایه پزشکي باشد. گیاهان دارویي به‌عنوان یکي از منابع غني از مواد ایمونومدولاتور مطرح مي‌باشند[23-31]. مطالعات فراواني در مورد آثار ایمونومدولاتوري ترکیبات دارویي گیاهي در کشورهاي با سابقه طب سنتي صورت گرفته‌است. در کشور ما علي‌رغم گنجینه غني طب سنتي ایران و منابع متنوع گیاهان دارویي متأسفانه کم‌تر به این موضوع پرداخته‌شده است. در سال‌هاي اخیر مطالعات هدفمندي در دانشگاه شاهد در مورد شناسایي و جداسازي مواد ایمونومدولاتور از گیاهان دارویي بومي آغاز گردیده است. در همین راستا و با توجه به ارزش غذایي زعفران و کاربرد وسیع آن در دنیا و با توجه به گزارش‌هاي موجود در مورد اثر آن بر مهار رشد سلول‌هاي سرطاني، در این مطالعه اثر کاروتنوئیدهاي کلاله این گیاه دارویي بر پاسخ سلولي در موش Balb/c مورد بررسي قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیري از کلاله زعفران

بنه هاي گلدار زعفران در فصل گلدهي (پاییز- آبان ماه) از مزرعه‌اي واقع در شهرگناباد تهیه شدند. پس از جدا کردن کلاله ها از دیگر اجزاي گل، آن‌ها در تاریکي در دماي اتاق و در فضاي فاقد رطوبت خشک گردیدند. مقدار 100mg از نمونه خشک کلاله به‌طور متوالي با 50mL اتر نفت (نقطه جوش 40-60°C) و 50mL دي‌اتیل اتر (BHT 0/03%) در یک دستگاه سوکسله و در تاریکي براي حذف کاروتنوئیدهاي غیرگلیکوزیدي، لیپیدها، ترکیبات معطر و پیکروکروسین عصاره‌گیري شد. سپس نمونه در یک لوله درپوش‌دار محتوي 10mL آب مقطر به مدت 20 دقیقه در حمام آب جوش عصاره‌گیري شد. پس از آن

براي جداسازي باقيمانده هاي گياهي، عصاره در 3000g و در دماي 10°C به مدت 20 دقيقه سانتريفوژ شد. محلول رو شناور (حاوي كروسين‌ها) براي آزمايش‌هاي درماني مورد استفاده قرار گرفت.

آزمايش‌ها روي حيوان

تعداد 28 سر موش نر Balb/c با ميانگين وزني 28 گرم در سن10-8 هفته‌اي كه در شرايط دما و رطوبت كنترل شده و فاقد پاتوژن نگهداري شده بودند، به‌طور تصادفي به 6 گروه 4 تايي براي تيمار با عصاره آبي كلاله زعفران و يک گروه كنترل 4 تايي گروه‌بندي شدند. در گروه هاي تيمار، دوزهاي مختلف عصاره آبي زعفران طبق جدول 1 به صورت خوراكي به حيوانات خورانده شدند. به حيوانات گروه كنترل 100µL آب مقطر سترون خورانده شد. تيمار حيوانات با عصاره به‌طور روزانه و به مدت دو هفته ادامه داشت.

روش سنجش افزايش حساسيت تأخيري (DTH)

براي تحريك سيستم ايمني سلولي، به هر موش در روز شروع تجويز عصاره، تعداد 1×10^8 گلبول قرمز خون گوسفند (sRBC) در پشت دم و در روز هفتم نيز همان مقدار سلول به‌عنوان دوز يادآور در همان محل به صورت زير جلدي تزريق گرديد. در روز آخر، همين تعداد sRBC در كف پاي موش‌ها تزريق گرديد و پس از گذشت 24 ساعت با استفاده از كوليس ورنيه با دقت 0/01، درصد افزايش قطر پاي تزريق شده و تزريق نشده اندازه‌گيري شد. سپس ميزان DTH طبق فرمول زير محاسبه گرديد[27] :

$$DTH = \frac{\text{مقدار تورم پاي تزريق شده (L)} - \text{مقدار تورم پاي تزريق نشده (R)}}{\text{مقدار تورم پاي تزريق نشده (R)}} \times 100$$

جدول 1. دوزهاي استفاده شده از عصاره آبي كلاله زعفران در گروه‌هاي مختلف تيمار

گروه ها	ميانگين وزن (gr)	دوز تجويزشده (mg/kg)	مقدار ماده (mg/mL)	حجم عصاره تجويز شده (µL)
كنترل	25	-	-	100 ميكروليتر آب‌مقطر
1	25	1	0/25	100 ميكروليترعصاره
2	30	5	0/15	100 ميكروليترعصاره
3	30	10	0/3	100 ميكروليترعصاره
4	30	20	0/6	100 ميكروليترعصاره
5	30	30	0/9	100 ميكروليترعصاره
6	30	50	1/5	100 ميكروليترعصاره

سنجش فعاليت حياتي لنفوسيت‌ها به روش MTT

پس ازپايان مدت زمان تيمار (14 روز)، موش‌ها با استفاده از پنبه آغشته به اتر بيهوش گرديدند و سپس در شرايط سترون پس از بازكردن پوست سينه، طحال آن‌ها برداشته شده و در پتري ديش‌هاي سترون قرار داده شدند. با استفاده از تزريق RPMI به داخل بافت طحال و ماساژ آرام آن با نوك پنس، سلول‌هاي بافت طحال جدا و به لوله سترون منتقل گرديدند. سپس با استفاده از بافر ليزكننده، گلبول‌هاي قرمز ليز شد و پس از دو مرحله شستشو، سلول‌هاي باقيمانده كه عمدتاً لنفوسيت بودند، جدا گرديدند. در پايان، RPMI حاوي 10% FBS اضافه و سلول‌ها با لام نئوبار شمارش شدند. سپس تعداد 2×10^5 سلول در هر چاهك پليت 96 خانه كشت و در انكوباتور 37 درجه حاوي 5 درصد CO_2 قرارداده شدند.

پس از گذشت 48 ساعت، به هر چاهك يك دهم حجم محيط چاهك MTT اضافه شد و پس از 4 ساعت قرار

دادن نمونه‌ها در انکوباتور، محلول رویي سلول‌ها برداشته شد و بلورهاي ایجاد شده بر روي سلول ها در 100µL ایزوپروپانول اسیدي حل گردیدند. پس از انتقال به پلیت الیزا، جذب نوري نمونه‌ها در طول موج 492 نانومتر اندازه‌گیري شد. میزان جذب نوري، شاخص فعالیت حیاتي سلول‌ها است[30و31].

تجزیه و تحلیل آماري داده‌ها

به منظور بررسي وجود تفاوت بین گروه‌هاي مختلف تحت تیمار با گروه کنترل از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به دنبال آن آزمون توکي(Tukey) در سطح معني‌دار $\alpha=0/05$ استفاده گردید. آنالیز آماري داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. داده‌ها به صورت میانگین ± خطاي استاندارد بیان شدند.

نتایج

سنجش DTH (ازدیاد حساسیت تأخیري)

دوزهاي مختلف عصاره آبي کلاله زعفران به مدت دو هفته به موش‌هاي نر Balb/c به صورت خوراکي تجویز شد. آنتي‌ژن sRBC طبق روشي که در بخش روش‌ها توضیح داده شد در کف پاي موش‌ها تزریق گردید و پاسخ DTH سنجیده شد.

همان‌گونه که در جدول 2 مشاهده مي‌شود با توجه به آنالیز آماري، تغییر معني‌داري در پاسخ DTH موش‌هاي تحت تیمار عصاره آبي کلاله زعفران مشاهده نشد.

پاسخ فعالیت حیاتي لنفوسیت‌ها با آزمونMTT

با استفاده از آزمون MTT میزان فعالیت حیاتي سلول‌هاي لنفوسیت طحال موش‌هاي تحت تیمار مورد سنجش قرار گرفت. نتایج جذب نوري ناشي از احیاي

جدول 2. ازدیاد حساسیت تأخیري متعاقب تجویز خوراکي دوزهاي مختلف عصاره آبي کلاله زعفران در موش‌هاي Balb/c

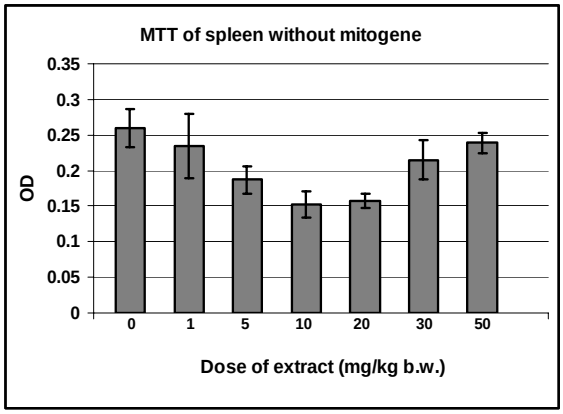
گروه ها	میزان دوز تجویزشده (mg/kg)	DTH (میانگین±خطاي استاندارد)	معني‌داري
کنترل	0	0/062±0/084	-
1	1	0/004 ±0/002	0/431
2	5	0/083±0/035	0/772
3	10	0/010±0/030	0/496
4	20	0/169 ±0/084	0/163
5	30	0/066 ±0/043	0/957
6	50	0/071±0/034	0/905

MTT در جداول3 و 4 و نمودارهاي 1 و 2 آورده شده است.

متعاقب آنالیز داده‌هاي حاصل از اندازه‌گیري جذب نوري احیاي MTT کاهش معني‌داري در فعالیت لنفوسیت‌ها موش‌هاي تحت تیمار عصاره زعفران در غیاب میتوژن بین گروه کنترل و گروه‌هاي 3 و4 (تیمار شده با دوزهاي mg/kg 20 و 10 عصاره زعفران) مشاهده گردید.

جدول 3. فعالیت حیاتي لنفوسیت‌ها با آزمون MTT متعاقب تجویز خوراکي دوزهاي مختلف عصاره آبي کلاله زعفران در موش‌هاي Balb/c بدون حضور میتوژن

گروه ها	میزان دوز تجویزشده (mg/kg)	میزان جذب (میانگین±خطاي استاندارد)	معني‌داري
کنترل	0	0/260±0/027	-
1	1	0/235 ±0/045	0/992
2	5	0/187±0/019	0/284
3	10	0/152±0/018	0/035
4	20	0/157±0/010	0/044
5	30	0/215 ±0/027	0/890
6	50	0/239 ±0/014	0/996



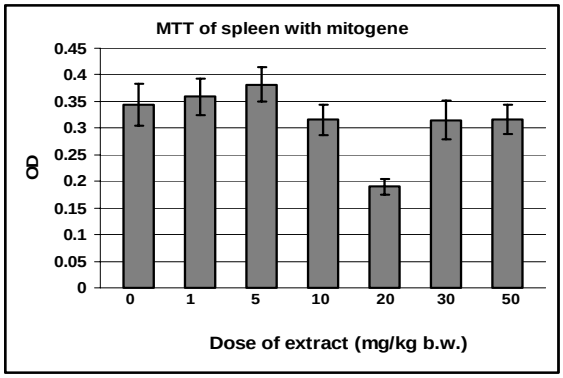
نمودار 1. فعالیت حیاتي لنفوسیت‌ها با آزمونMTT متعاقب تجویز خوراکي دوزهاي مختلف عصاره آبي کلاله

زعفران در موش‌هاي Balb/c بدون حضور ميتوژن. داده‌ها به صورت ميانگين ± خطاي استاندارد SE نشان داده شده‌اند.

جدول 4. فعاليت حياتي لنفوسيت‌ها با آزمون MTT متعاقب تجويز خوراكي دوزهاي مختلف عصاره كلاله آبي زعفران در موش‌هاي Balb/c در حضور ميتوژن

گروه‌ها	ميزان دوز تجويزشده (mg/kg)	ميزان جذب (ميانگين±خطاي استاندارد)	معني‌داري
كنترل	0	0/4385 ±0/0398	-
1	1	0/3594 ±0/0345	0/551
2	5	0/3819 ±0/0318	0/840
3	10	0/3154 ±0/0280	0/840
4	20	0/1898 ±0/0147	0/000*
5	30	0/3146 ±0/0364	0/099
6	50	0/3165 ±0/0269	0/122

*با توجه به آناليز فوق كاهش معناداري در فعاليت حياتي لنفوسيت‌ها موش‌هاي تحت تيمار عصاره آبي زعفران در حضور ميتوژن بين گروه كنترل و گروه 4 (20mg/kg b.w.) مشاهده مي‌شود.



نمودار 2. فعاليت حياتي لنفوسيت‌ها با آزمون MTT متعاقب تجويز خوراكي دوزهاي مختلف عصاره آبي زعفران در موش‌هاي Balb/c در حضور ميتوژن. داده‌ها به صورت ميانگين ± خطاي استاندارد(SE) نشان داده شده‌اند.

بحث

در اين مطالعه براي اولين بار، اثر عصاره زعفران بر پاسخ ايمني سلولي مورد بررسي قرار گرفت. از ازدياد حساسيت تأخيري (DTH) به‌عنوان شاخص ايمني سلولي *in vivo* (در زيوه) و از تست MTT جهت ارزيابي فعاليت حياتي سلول‌ها در *in vitro* (در شيشه) استفاده گرديد. دوزهاي مختلف از عصاره آبي كلاله زعفران به مدت 14 روز به موش‌هاي Balb/c خورانده شد. نتايج اين بررسي نشان داد كه پاسخ DTH به آنتي‌ژن مورداستفاده پس از تجويز دوزهاي مختلف دارو تغيير معني‌داري نمي‌كند. فعاليت حياتي سلول‌هاي طحال در گروه‌هايي كه مقادير 10 و 20mg/kg عصاره زعفران را دريافت كرده‌اند در غياب ميتوژن، و در گروهي كه 20 mg/kg از عصاره را دريافت كرده‌است، در حضور ميتوژن كاهش معني‌داري نشان داد. اين نتايج نشان داد كه عصاره آبي زعفران در مقادير مورد اشاره پاسخ سلولي را كاهش داده و در مقادير كم‌تر و بيش‌تر، فاقداين اثر مي‌باشد. دليل عدم تفاوت در پاسخ DTH را مي‌توان به دليل حساس نبودن اين آزمون دانست. بايد در نظر داشت كه اگر چه آزمون جلدي DTH از حساسيت مناسبي برخوردار نيست، اما به دليل امكان انجام آن در شرايط *in vivo* و ساده و ارزان بودن آن هنوز به عنوان يك ابزار مناسب در ارزيابي پاسخ ايمني سلولي مورد اسفاده قرار مي‌گيرد. در اين مطالعه، عدم تغيير معني‌دار در DTH و كاهش فعاليت حياتي سلول‌ها تنها در برخي از گروه‌ها در آزمون MTT بيانگر اين موضوع است كه اين اثر كاهشي، خيلي قوي نبوده‌است. در مطالعات ديگري نشان داده شده است كه زعفران موجب اثر سيتوتوكسيك بر سلول‌هاي سرطاني شده‌است [2-7 و 9-12]. نتايج تحقيقات نشان داده‌اند كه كاروتنوئيدهاي كلاله زعفران، به‌ويژه كروسين‌ها داراي آثار وابسته به دوز بر روي سلول‌هاي بدخيم انساني مي‌باشند. در بررسي‌هاي انجام شده اثر كاروتنوئيدهاي زعفران در دوزهاي مختلف (200mg/kg, 100 ,80 ,50 ,40 ,25 ,20 ,10) بر روي انواعي از نژادهاي سلول سرطاني انسان (HeLa, A549, VA31, A-204, HepG2, S-180, EAC, DLA, P388) مورد مطالعه قرار گرفته و

نتایج نشان داده‌اند که دوزهای بیش از 50mg/kg مؤثرتر بوده‌اند و بازه غلظت کشندگی عصاره‌های آبی و الکلی کلاله برای نژادهای مختلف سلول‌های سرطانی بین 7-200 µg/mL تغییر می‌کند. فرضیه‌های متعددی تاکنون درباره چگونگی اثر ضدسرطانی زعفران ارائه شده است. در فرضیات مختلف، سازوکار عمل زعفران را عمدتاً به اثر بازدارندگی آن بر سنتز نوکلئیک اسیدها و واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد (به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان)، تداخل در عملکرد سیستم آنزیمی درگیر در برهم‌کنش پروتئین-DNA و اثر آن در مرگ برنامه ریزی شده سلولی (آپوپتوز) می‌دانند[11]. مهم‌ترین ویژگی کاروتنوئیدهای کلاله زعفران به منظور استفاده از آن به‌عنوان یک دارو در ممانعت از رشد سلول‌های سرطانی را حلالیت آن‌ها در آب می‌دانند. علی‌رغم وجود گزارش‌های متعدد در باره آثار ضد سرطانی زعفران، داده‌ها در رابطه با اثر زعفران به عنوان یک ماده ایمونومودولاتور بسیار اندک بوده، تنها به چند گزارش محدود می‌شود [3و19-22]. دوزهای مؤثر در غالب گزارش‌های موجود بیشتر (>80mg/kg) از دوزهای مورد استفاده در تحقیق حاضر است. نتایج این مطالعه با اثر ضدالتهابی گزارش شده در مورد زعفران [32] همخوانی دارد. با توجه به اندک بودن اطلاعات در مورد آثار تعدیل‌کنندگی ایمنی زعفران، نتایج تحقیق حاضر می‌تواند راهگشای مطالعات بعدی در این زمینه باشد. با توجه به خواص متعدد دارویی زعفران و نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، بررسی خواص ضدالتهابی آن با بررسی سازوکارهای مولکولی لازم به نظر می‌رسد. همچنین سایر خواص ایمونومدولاتوری آن با استفاده از دوزهای کم‌تر و بیشتر ضروری است. برای رسیدن به این هدف، لازم است مطالعات کامل‌تری در مورد اثر مواد مؤثر زعفران به‌ویژه فراکشن‌های کاروتنوئیدی آن در دوزهای مختلف بر پاسخ‌های ایمنی، به‌ویژه مولکول‌های ایمنی از جمله سایتوکاین‌ها انجام شود. از آن‌جا که نتایج این تحقیق اثر ضدالتهابی را برای کاروتنوئیدهای زعفران مطرح می‌کند و با توجه به ارزشمند بودن این اثر پیشنهاد می‌شود بررسی‌های بیشتر در این مورد در مدل‌های سلامت و بیماری‌های التهابی صورت گیرد.

سپاسگزاری

این پژوهش با پشتیبانی مالی مرکز تحقیقات پزشکی دانشگاه شاهد انجام شده که بدین‌وسیله از حمایت و همکاری مسئولان محترم آن مرکز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. ابراهیم‌زاده ح، رجبیان ط، ابریشم چی پ، کرمیان ر و صبورا ع. زعفران ایران با نگاه پژوهشی. انتشارات اطلاعات، 1385، 644 صفحه.

2. Nair SC, Kurumboor SK, Hasegawa JH. Saffron chemoprevention in biology and medicine: a review. Cancer Biother 1995 winter; 10(4):257-640.

3. Deng Y, Guo ZG, Zeng ZL, Wang Z. Studies on the pharmacological effects of saffron (*Crocus sativus* L.). Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2002 Aug; 27(8):565-8.

4. Abdullaev Jafarova F, Caballero-Ortega H, Riveron-Negrete L, Pereda-Miranda R, Rivera-Luna R, Manuel Hernandez J, Perez-Lopez I, Espinosa-Aguirre JJ. *In vitro* evaluation of the chemopreventive potential of saffron. Rev Invest Clin 2002 Sep-Oct; 54(5):430-6.

5. Giaccio M. Crocetin from saffron: an active component of an ancient spice. Crit Rev Food Sci Nutr 2004; 44(3):155-72.

6. Schmidt M, Betti G, Hensel A. Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses. Wien Med Wochenschr 2007; 157(13-14):315-9.

7. Nair SC, Pannikar B, Panikkar KR. Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*). Cancer Lett 1991 May 1; 57(2):109-14.

8. Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernandez JA. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. Cancer Lett 1996 Feb 27; 100(1-2):23-30.

9. Abdullaev FI, Espinosa-Aguirre JJ. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. Cancer Detect

(*Crocus sativus* L.) on chemical-induced genotoxicity in mice. Asia Pac J Clin Nutr 2003; 12(4):474-6.

23. Borchers AT, Hckman RM, Keen CL, Stem JS, Gershwin ME. Complementary medicine: a review of immunomodulatory effects of Chinese herbal medicines. Am J Clin Nutr 1997; 66(6):1303-12.

24. Qiu Y, Hu YL, Cui B A, Zhang HY, Kong XF, Wang DY, Wang YG. Immunopotentiating effects of four Chinese herbal polysaccharides administered at vaccination in chickens. Poult Sci 2007 Dec; 86(12):2530-5.

25. Clarke JO, Mullin GE. A review of complementary and alternative approaches to immunomodulation. Nutr Clin Pract 2008 Feb; 23(1):49-62.

26. Leemol D, Girgia K. Immunomodulatory activity of *Withania sominifera*. Journal of Ethnopharmacol 2000; 71(1):193-200.

27. غضنفري ط، محمد حسن ز. بررسي تاثير سير بر ايمني سلولي: افزايش حساسيت تأخيري (DTH). دانشور، دوماهنامه علمي-پژوهشي دانشگاه شاهد، 1373، 7، 8(2): 82 -87.

28. Ghazanfari T, Hassan ZM, Khamesipour A. Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against *Leishmania major* by Garlic (*Allium Sativum*) treatment. J Ethnopharmacol 2006; 103(3): 327-332.

29. Ghazanfari T, Hassan ZM, Ebrahimi M. Immunomodulatorn activity of a protein isolated from garlic extract on delayed type hypersensitivity. International Immunopharmacol 2002 Oct; 2(11):1541-9.

30. غضنفري ط، شاهرخي س، ناصري م و همكاران. بررسي سميت فرآورده گياهي ACA1 بر رده سلول سرطاني ملانوماي انساني. مجله علوم پزشكي مازندران، 1385، دوره 16، شماره 42،55-49.

31. غضنفري ط، يارايي ر، ناصري م و همكاران. تاثير فرآورده گياهيACA1 بر پاسخ تكثيري و توليد نيتريك اكسايد توسط ماكروفاژهاي صفاقي موش Balb/c.. مجله علوم پايه پزشكي ايران, 1386، ج10، ش1، 8-15.

32. Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. BMC Pharmacol 2002 Mar 15; 2:7.

Prev 2004; 28(6):426-32.

10. Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernandez JA. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells *in vitro*. Cancer Lett 1996 Feb 27; 100(1-2):23-30.

11. Abdullaev Fikrat I.. Cancer Chemopreventive and Tumoricidal Properties of Saffron (*Crocus sativus* L.). Experimental Biology and Medicine 2002, 227:20-25.

12. Bathaie SZ, Bolhasani A, Hoshyar R, Ranjbar B, Sabouni F, Moosavi-Movahedi AA. Interaction of saffron carotenoids as anticancer compounds with ctDNA, Oligo (dG.dC)15, and Oligo (dA.dT)15.DNA Cell Biol 2007 Aug; 26(8):533-40.

13. Chryssanthi DG, Lamari FN, Iatrou G, Pylara A, Karamanos NK, Cordopatis P Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different *Crocus* species. Anticancer Res 2007 Jan-Feb; 27(1A):357-62.

14. Premkumar K, Thirunavukkarasu C, Abraham SK, Santhiya ST, Ramesh A. Protective effect of saffron (*Crocus sativus* L.) aqueous extract against genetic damage induced by anti-tumor agents in mice. Hum Exp Toxicol 2006 Feb; 25(2):79-84.

15. Ochiai T, Ohno S, Soeda S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin prevents the death of rat pheochromyctoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of alpha-tocopherol. Neurosci Lett 2004 May 13; 362(1):61-4.

16. Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. Phytother Res 2005 Nov; 19(11):997-1000.

17. Shen XC, Qian ZY. Effects of crocetin on antioxidant enzymatic activities in cardiac hypertrophy induced by norepinephrine in rats. Pharmazie 2006 Apr; 61(4):348-52.

18. Kanakis CD, Tarantilis PA, Tajmir-Riahi HA, Polissiou MG. Crocetin, dimethylcrocetin, and safranal bind human serum albumin: stability and antioxidative properties. J Agric Food Chem 2007 Feb 7; 55(3):970-7.

19. Abdullaev FI, Riveron-Negrete L, Caballero-Ortega H, Manuel Hernandez J, Perez-Lopez I, Pereda-Miranda R, Espinosa-Aguirre JJ. Use of *in vitro* assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). Toxicol *In Vitro* 2003 Oct-Dec; 17(5-6):731-6.

20. Premkumar K, Kavitha S, Santhiya ST, Ramesh AR, Suwanteerangkul J. Interactive effects of saffron with garlic and curcumin against cyclophosphamide induced genotoxicity in mice. Asia Pac J Clin Nutr 2004; 13(3):292-4.

21. Premkumar K, Abraham SK, Santhiya ST, Ramesh A. Protective effects of saffron (*Crocus sativus* Linn.) on genotoxins-induced oxidative stress in Swiss albino mice. Phytother Res 2003 Jun; 17(6):614-7.

22. Premkumar K, Abraham SK, Santhiya ST, Ramesh A. Inhibitory effects of aqueous crude extract of [1; 2]