

Protective effect of saffron (*Crocus sativus*) on cadmium chloride-induced Genotoxicity on mice macrophage and Lymphocyte cells

Zaree Mahmudabadi A.¹ PhD, Masoomi Karimi M.^{*} MSc, Sharif F.² MSc, Jafari Sani M.² MSc

^{*} Department of Immunology, Faculty of Medicine, Totbat heydariyeh University of Medical Science, Khorasan Razavi, Iran

¹Department of Biochemical and Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Science, Tehran, Iran.

² Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Totbat Heydariyeh University of Medical Science, Khorasan Razavi, Iran

Abstract:

Aims: Cadmium is one of the industrial and environmental pollutants which are potentially the production of free radicals. On the other hand it has an important role in DNA oxidative damage, mutagenesis, aging and cancer. This study investigated the protective effect of saffron on the rate of DNA breakage against cadmium contamination in the macrophage and lymphocyte cells.

Methods: First, an appropriate numbers of macrophage obtained from peritoneum and lymphocytes from the spleens of mice. After confirmed alive, they were treatment with kMnO₄ and cadmium in the presence and absence of saffron (in RPMI medium). We use Comet assay method to assay rate of DNA damage.

Results: In normal cells, the average movement of DNA was 21.01±2.53 microns, while the cells were treated with kMnO₄, cadmium and cadmium + extract (61.24±5.34; 40.7±6.23; 32.03±3.84) respectively. And also amount of % DNA that remaining in the nucleus, respectively in normal cells, positive control, cadmium and cadmium + extract were (97.69±8.45; 18.54±4.28; 21.92±3.25; 87.05±7.46).

Conclusion: The results of this study indicate the anti genotoxicity effects of saffron in protecting DNA against oxidative failure that is caused by cadmium. It seems likely that oral administration of this plant will be preventing of complications of these factors.

Keywords: saffron, comet assay, cadmium, macrophage, lymphocyte, DNA damage.

بررسی تاثیر حفاظتی عصاره آبی زعفران (*Crocus sativus*) بر ژنوتوکسیسیتی ناشی از آلودگی با کادمیوم کلراید در سلول ماکروفاژ و لنفوسیت موش سوری

علی زارعی محمودآبادی PhD

گروه بیوشیمی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران.

معصومه معصومی کریمی* MSc

گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی تربت حیدریه، خراسان رضوی، ایران.

فروغ شریف MSc

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پزشکی تربت حیدریه، خراسان رضوی، ایران.

مسلم جعفری ثانی MSc

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پزشکی تربت حیدریه، خراسان رضوی، ایران.

چکیده:

اهداف: کادمیوم از جمله آلاینده های صنعتی و محیطی است که بالقوه باعث تولید رادیکال آزاد می گردد از طرفی تخریب اکسیداتیو DNA نقش مهمی در موتاژن، پیری و سرطان بازی می کند. هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر عصاره آبی زعفران بر میزان محافظت DNA در مقابل شکست ناشی از آلودگی به کادمیوم در سلولهای ماکروفاژ بود.

روش ها: ابتدا سلولهای ماکروفاژ به تعداد مناسب از صفاق و لنفوسیتها از طحال موش سوری جدا شده و پس از تایید زنده بودن، آنها را در محیط *in vitro* با KMnO_4 و کادمیوم در حضور و عدم حضور عصاره آبی زعفران (در محیط RPMI) مورد تیمار قرار داده و میزان شکست DNA را با استفاده از روش Comet assay مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: در سلول های نرمال متوسط حرکت DNA: 21.01 ± 2.53 میکرومتر بود در حالیکه در سلول های تیمار شده با KMnO_4 ، کادمیوم و کادمیوم + عصاره آبی زعفران به ترتیب $(32.03 \pm 3.84; 40.7 \pm 6.23; 61.24 \pm 5.34)$ بدست آمد. و هم چنین میزان DNA % باقیمانده در هسته نیز بترتیب در سلول های نرمال، کنترل مثبت، کادمیوم و کادمیوم + عصاره آبی زعفران به ترتیب $(87.05 \pm 7.46; 21.92 \pm 3.25; 18.54 \pm 4.28; 97.69 \pm 8.4)$ بود عصاره آبی زعفران.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر اثرات آنتی ژنوتوکسیسیتی عصاره آبی زعفران در محافظت DNA در مقابل شکست اکسیداتیو ناشی از کادمیوم است بنظر می رسد که مصرف خوراکی این گیاه احتمالاً می تواند از عوارض ناشی از این عوامل پیشگیری کند.

کلیدواژه ها: زعفران، روش کامت، کادمیوم، ماکروفاژ، لنفوسیت، شکست DNA

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰

* نویسنده مسئول: masoomikarimi@gmail.com

مقدمه

کادمیوم بصورت های مختلفی در الاینده ای صنعتی وجود دارد و از مواد سمی و خطرناک محسوب می شود. یکی از پیامدهای ناخوشایند صنعتی شدن و تمایل به کسب درآمد بیشتر در کشورهای دنیا افزایش آلودگی و در پی آن بروز فجایع زیست محیطی است.

آلودگی آب با فلزات سنگین بدنال فرآیند ذوب، ریخته گری فلزات، استفاده از سوخت های فسیلی و دیگر فعالیت های صنعتی رو به گسترش است. بروز مشکلات بهداشتی در انسان به علت تجمع فلزات سنگین در بدن ناشی از تنفس و یا مصرف مواد آلوده گزارش شده است [۱]. آلودگی حاد با فلزات سنگین در کوتاه مدت باعث مرگ فرد میشود اما آلودگی مزمن منجر به تجمع این فلزات در برخی از بافتها من جمله کبد و مغز استخوان میشود [۲-۳].

استفاده از کادمیوم در جوشکاری های صنعتی و باتری سازی ها و استنشاق بخارات حاصله باعث افزایش میزان این عنصر سمی در خون شده و میتواند باعث افزایش تولید رادیکالهای آزاد و استرس اکسیداتیو گردد [۴].

کامیوم به علت تمایل بالا به گروههای سولفیدریل (SH-) باعث غیر فعال شدن آنتی اکسیدان های حاوی عامل سولفوری (تیول) می شود و با کاهش قدرت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی منجر به افزایش استرس اکسیداتیو می شود و از این طریق باعث القاء سمیت کبدی و کلیوی می گردد [۵].

استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکالهای آزاد اکسیژن (ROS) عاملی است که میتواند منجر به شکست تک زنجیره و دو زنجیره DNA می شود که خود اولین مرحله در بیماریهای دژنراتیو انسانی نظیر سرطان و پیری است. ROSها در شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیک مختلف نظیر دفاع در مقابل میکروارگانیسم های، متابولیسم سلولی، تکثیر سلولی، القاء مرگ سلولی و آلودگی ناشی از صنایع و نیز دود سیگار و همچنین پاسخ به عوامل محیطی خاص تولید می شود [۱]. کادمیوم (CD) از جمله عوامل سرطانزا است که بطور غیر مستقیم از طریق تخلیه سیستم آنتی اکسیدانی سلول منجر به تولید رادیکالهای آزاد در سلول می گردد. تا کنون مواد مختلفی تحت عنوان پاک کننده های رادیکال آزاد، مهار کننده مرگ سلولی و عوامل فارماکولوژیکی توکسیک به منظور کاهش اثرات سمی اکسیدانها در شرایط درون تنی و برون تنی مورد استفاده قرار گرفته است [۷-۱۲] هم چنین اثرات مثبت حفاظتی آنتی اکسیدان های مختلف از جمله ویتامین E، ویتامین C، گلوکاتینون و معرفهای تیولی دیگر نظیر دی تیو تریتول و N-استیل سیستئین بر علیه سمیت ناشی از عوامل اکسیدان گزارش شده است [۱۳، ۱۴]. از آنجا که اثرات حفاظتی عصاره آبی زعفران در شکست دو زنجیره

مساوی PBS افزوده شد. از غلظت ۰/۲۵mM KMnO₄ به عنوان کنترل مثبت در شرایط مشابه سایر گروهها استفاده گردید. پس از پایان انکوباسیون مجدداً قابلیت زنده بودن و حیات سلولها تعیین و از آنها جهت بررسی ژنوتوکسیسیته استفاده شد.

تعیین میزان شکست DNA: میزان شکست تک زنجیره و دو زنجیره DNA به روش Comet assay سنجیده شد [۲۱]. بطور اختصار، ۲۵λ از سلولها را پس از تیمار با محلول ۰/۶٪ از LMPA در PBS به حجم ۵۰۰λ رسانده و ۷۵λ از آن را که حاوی ۵۰۰-۱۰۰۰ سلول بود روی مرکز اسلایدی که قبلاً با آگارروز ۰/۵٪ پوشانده شده بود قرار داده شد و در تاریکی و دمای اتاق خشک شده سپس به منظور شکست غشای سلول و غشای هسته، اسلایدها را به مدت یک ساعت در شرایط تاریکی و دمای ۴۰°C بافر لیز کننده تیمار گردید. پس از قرار دادن اسلاید در محلول سود با pH=۱۳ به منظور باز شدن رشته دو زنجیره ای DNA، اسلایدها در محیط قلیایی و ولتاژ ثابت ۷/۰ ولت به ازای هر سانتی متر مربع ژلوز به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند. پس از خنثی نمودن pH اسلایدها که با قرار دادن آنها در بافر خنثی کننده (۱۵ دقیقه) صورت پذیرفت، آنها را در دمای اتاق قرار داده تا خشک شوند و سپس با افزودن محلول اتیدیوم بروماید جهت رنگ آمیزی DNA، میزان حرکت DNA ناشی از میدان الکتریکی با استفاده از میکروسکوپ فلورسانت تعیین و از لامها عکس گرفته شد. با کمک نرم افزار comet score فاکتورهای شاخص شکست DNA (DNA in Tail, %DNA in Tail, Tail lenght, Head diameter, %DNA in head) بطور کمی تعیین گردید.

آنالیز آماری

نتایج به صورت mean±SD گزارش شد و داده ها با استفاده از t-test و ANOVA برای مقایسه تغییرات متغیرها در غلظت های مختلف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. p<0.03 به عنوان معنی دار بودن نتایج در نظر گرفته شد.

نتایج

اسلاید های حاصل از comet که با استفاده از میکروسکوپ فلورسانت مورد ارزیابی قرار گرفته بودند جهت تعیین میزان شاخص ها با کمک نرم افزار از آنها عکس گرفته شد. (شکل: ۱)

DNA ناشی از مصرف داروهای ضد سرطان و نیز اثر مهاری آن در مقابل ژنوتوکسیسیته ناشی از بنزوپیرن گزارش شده است [۱۵، ۱۶] در مطالعه حاضر اثر حفاظتی عصاره آبی زعفران روی سمیت ژنی ناشی از آلودگی با کادمیوم کلراید در سلول های ماکروفاژ و لنفوسیت بعنوان مهمترین عوامل در توانمندی سیستم ایمنی سلولی در موش سوری ارزیابی شد لذا اثر حفاظتی عصاره آبی زعفران روی ماکروفاژ ها و لنفوسیت های جدا شده در دوزهای مختلف مورد مطالعه قرار گرفت.

روش ها

موش آزمایشگاهی کوچک نژاد balb/c (متوسط وزن ۲۵-۳۰ گرم) از خانه حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه بقیه الله (عج)، گروه فیزیولوژی خریداری شد. آگارز، آگارز با نقطه ذوب پایین (LMPA)، اتیدیوم بروماید، EDTA، RPMI-1640، هیدروکسید سدیم، تریپان بلو، PBS از شرکت سیگما (St. Louis, MO, USA) خریداری گردید. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه خلوص بالا از شرکت مرک تهیه گردید. عصاره آبی زعفران نیز از آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه بقیه الله (عج) (دکتر صحرایی) دریافت شد.

جدا سازی ماکروفاژ ها و لنفوسیت

سلول های ماکروفاژ توسط شستشوی صفاق موش سوری بوسيله PBS استریل و سلولهای لنفوسیت در شرایط استریل با تزریق و تخلیه توام PBS استریل به طحال موش سوری جمع آوری گردید.

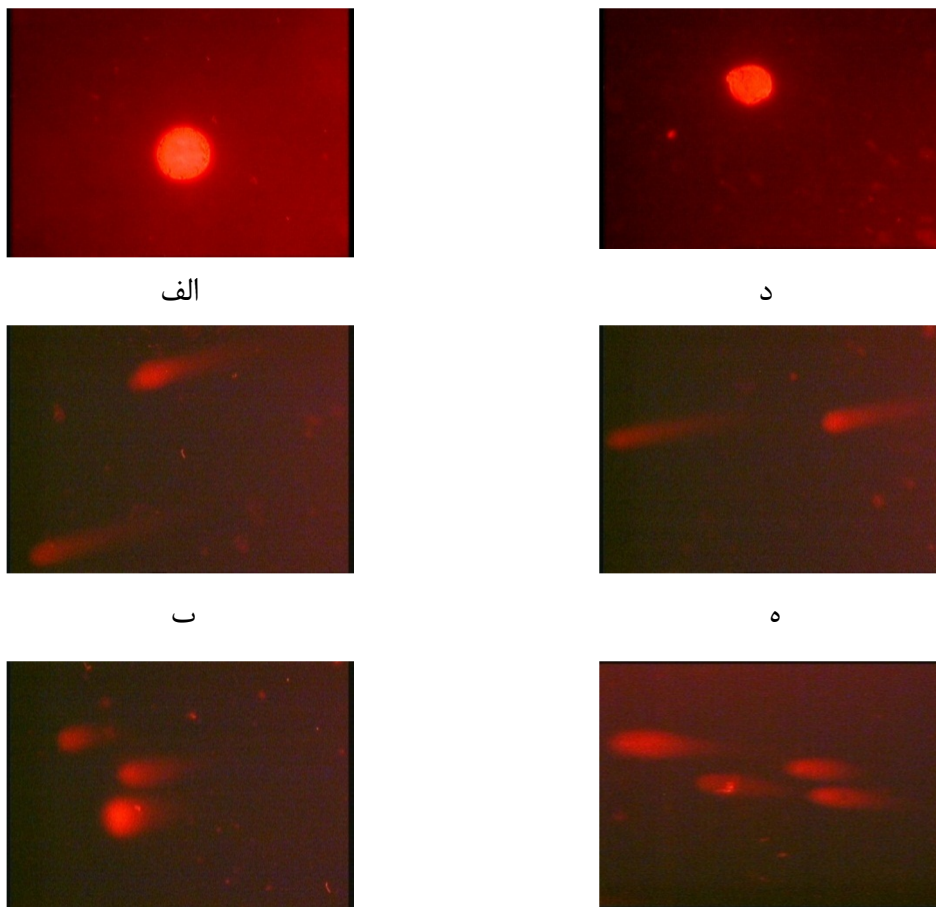
Viability سلول ها با استفاده از تریپان بلو حدود ۹۵٪ تشخیص داده شد [۱۷]. سلولها را با RPMI 1640 شستشو داده و شمارش شدند. سپس تعداد ۱×۱۰^۶ سلول در محیط RPMI 1640 با حجم نهایی ۱ml جهت ادامه کار تهیه گردید.

تیمار سلول ها

تهیه محلولها و غلظت های مختلف کادمیوم بر اساس مطالعات قبلی ما انجام شد [۱۸-۲۰]. در این مطالعه میزان ژنوتوکسیسیته ناشی از غلظت ۳۰۰μM کادمیوم کلراید در حضور و عدم حضور غلظت های (۱۰۰، ۵۰، ۲۵) عصاره آبی زعفران (۰/۵، ۰/۱، ۰/۰۵ و ۰/۵ ساعت انکوباسیون) تعیین شد. به سلول های کنترل و سلولهایی که Cd تنها دریافت کرده بودند به طور همزمان حجم

شکل ۱) تصاویر سلول نرمال و آلوده به Cd حاصل از Comet

الف: ماکروفاژ نرمال ب: ماکروفاژ آلوده به Cd ج: ماکروفاژ تیمار با کادمیوم و زعفران
د: لنفوسیت نرمال ه: لنفوسیت آلوده به Cd و: لنفوسیت تیمار با کادمیوم و زعفران



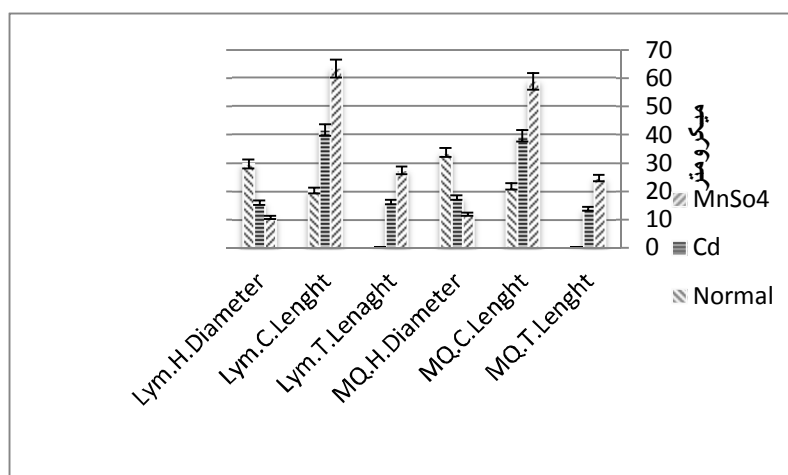
شود بطوری که میزان متغیرهای مورد سنجش قابل مقایسه با مقادیر حاصل از تاثیر $KMnO_4$ به عنوان یک عامل اکسیدان قوی و کنترل مثبت است (شکل ۲: الف و ب).

نتایج حاصل از بررسی تصاویر با کمک نرم افزار comet score⁹ بیانگر آن است که کادمیوم با غلظت ($300 \mu M$) در شرایط برون تنی به طور معنی داری موجب شکست هر دو زنجیره DNA می

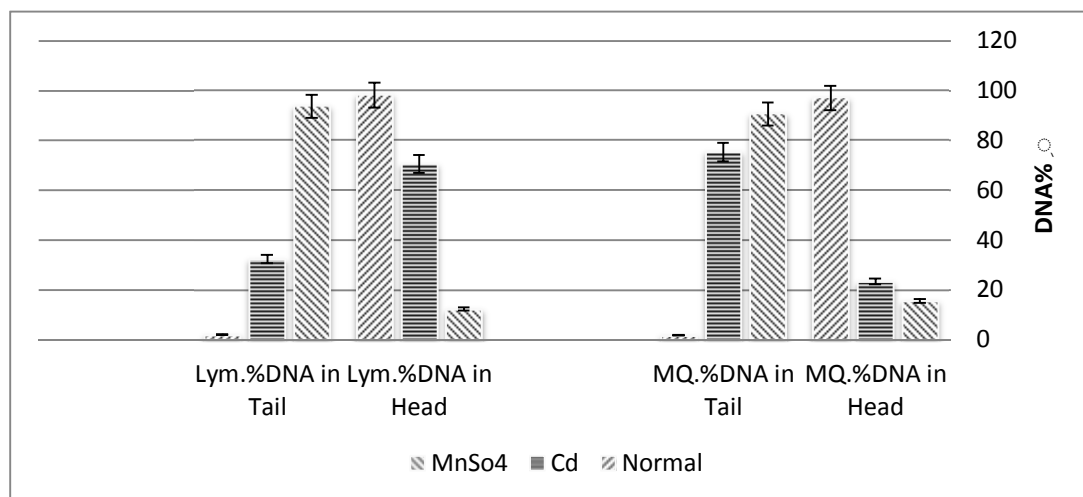
شکل ۲) شاخص های ژنوتوکسیسیتی ناشی از آلودگی با ($300 \mu M$) Cd و ($25 mM$) $KMnO_4$ در مقایسه با سلول نرمال با استفاده از روش Comet assay.

الف: مقایسه Comet Length, Head Diameter و Tail Length بر حسب μM

ب: مقایسه %DNA in head و %DNA in tail بر حسب %



(الف)



(ب)

n=100

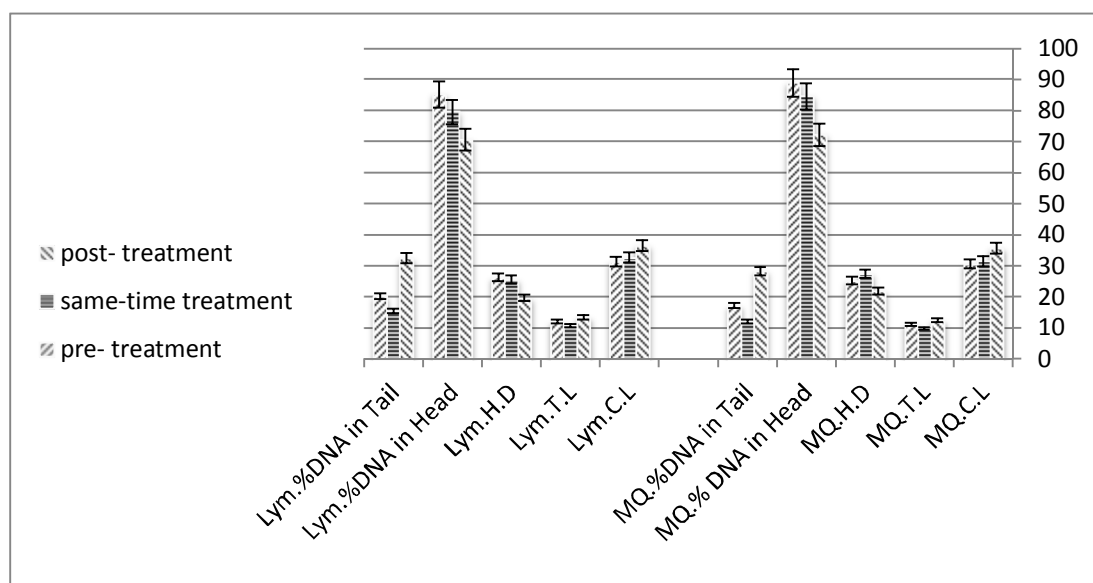
*p<0.03

**p<0.001

%DNA in head به طور معنی داری کاهش نشان می دهند که بیانگر تاثیر مثبت عصاره آبی زعفران است (شکل ۳).

با افزودن عصاره آبی زعفران قبل از آلودگی با Cd شاخص های مورد سنجش , Tail length , %DNA in Tail, Head diameter

شکل ۳: مقایسه تاثیر تک دوز عصاره آبی زعفران بر میزان ژنوتوکسیسیتی ناشی از آلودگی با Cd (۳۰۰ μM) در سلول ماکروفاژ و لنفوسیت با استفاده از روش Comet assay بصورت پیش تیمار، همزمان و پس تیمار با کادمیوم.



n=100

*p<0.03

**p<0.001

پیش گیری از ایجاد شکست DNA توسط Cd را دارا است ولی توانایی حذف اثرات ایجاد شده را ندارد. به منظور بررسی تاثیر وابسته به دوز عصاره آبی زعفران غلظت های مختلف عصاره به کار برده شده، نتایج بیانگر افزایش اثرات حفاظتی ضد ژنوتوکسیسیتی عصاره آبی زعفران در غلظت های ۲۵ و ۵۰ است ولی با به کار گیری غلظت ۱۰۰ به نسبت افزایش غلظت کاهش اثرات مشاهده نمی گردد (جدول ۲ و ۱).

افزایش همزمان عصاره با Cd نیز موجب کاهش تاثیرات سمی Cd می شود ولی در مقایسه با افزایش قبل از آلودگی با Cd تاثیرات ضعیف تری مشاهده گردید. بطوری که Tail length تفاوت معنی داری را نشان نداده ولی در مورد %DNA in Tail و %DNA in head تفاوت ها معنی دار بوده است. نتایج حاصل بیانگر آن است که افزایش عصاره آبی زعفران پس از انکوباسیون سلول ها با Cd هیچ گونه تاثیر معنی داری را ایجاد نمی کند. بنابر این به نظر می رسد که عصاره آبی زعفران توانایی

جدول ۱) مقایسه تاثیر غلظت های مختلف عصاره آبی زعفران (پیش تیمار) بر میزان ژنوتوکسیسیتی ناشی از آلودگی با Cd ($300 \mu M$) در سلول ماکروفاژ با استفاده از روش Comet assay. (mean $\pm$ SD)

	Normal	Cd	Cd+Saffron (25mM)	Cd+Saffron (50mM)	Cd+Saffron (100mM)	kMnO4
Comet length(μm)	21.7 $\pm$ 3.15	39.65 $\pm$ 6.3	35.7 $\pm$ 4.17	31.45 $\pm$ 2.73*	30.62 $\pm$ 3.19*	59 $\pm$ 5.7
Head Diameter(μm)	33.75 $\pm$ 4.31	17.78 $\pm$ 4.38	21.9 $\pm$ 2.76*	27.45 $\pm$ 3.14**	25.2 $\pm$ 4.8*	11.87 $\pm$ 5.39
Tail length(μm)	0.35 $\pm$ 0.11	13.7 $\pm$ 5.1	12.45 $\pm$ 3.4	9.75 $\pm$ 2.31**	11.1 $\pm$ 3.87*	24.69 $\pm$ 3.5
%DNA in Head	97.13 $\pm$ 2.2	23.46 $\pm$ 5.8	72.24 $\pm$ 12.57**	84.56 $\pm$ 6.9**	88.91 $\pm$ 8.47**	15.68 $\pm$ 5.5
%DNA in Tail	1.87 $\pm$ 0.47	75.43 $\pm$ 12.83	28.27 $\pm$ 4.65**	12.03 $\pm$ 4.21**	17.23 $\pm$ 3.65**	90.65 $\pm$ 4.8
n=100	*p<0.03	**p<0.001				

جدول ۲) مقایسه تاثیر غلظت های مختلف عصاره آبی زعفران (پیش تیمار) بر میزان ژنوتوکسیسیتی ناشی از آلودگی با Cd ($300 \mu M$) در سلول لنفوسیت با استفاده از روش Comet assay. (Mean $\pm$ SD)

	Normal	Cd	Cd+Saffron (25mM)	Cd+Saffron (50mM)	Cd+Saffron (100mM)	kMnO4
Comet length(μm)	20.32 $\pm$ 2.45	41.76 $\pm$ 5.6	36.51 $\pm$ 3.24	32.62 $\pm$ 4.74*	31.32 $\pm$ 1.9*	63.49 $\pm$ 5.9
Head Diameter(μm)	29.68 $\pm$ 6.37	15.19 $\pm$ 3.64	19.65 $\pm$ 4.28	25.56 $\pm$ 2.76**	26.29 $\pm$ 3.65**	10.71 $\pm$ 4.16
Tail length(μm)	0.42 $\pm$ 0.95	16.23 $\pm$ 1.7	13.38 $\pm$ 5.42	10.72 $\pm$ 3.89**	11.98 $\pm$ 2.29*	27.41 $\pm$ 4.2
%DNA in Head	98.25 $\pm$ 1.1	20.39 $\pm$ 7.3	70.64 $\pm$ 4.58**	79.56 $\pm$ 3.97**	85.19 $\pm$ 6.6**	12.4 $\pm$ 5.34
%DNA in Tail	2.12 $\pm$ 0.65	83.61 $\pm$ 7.54	32.49 $\pm$ 2.8**	15.44 $\pm$ 6.31**	20.19 $\pm$ 5.4**	93.74 $\pm$ 3.26
n=100	*p<0.03	**p<0.0				

بحث

تحقیقات در زمینه اثر زعفران روی سلولهای نئوپلاستیک در یک دهه گذشته بیانگر اثر ضد سرطانی و ضد توموری زعفران و ترکیبات حاصل از آن در شرایط برون تنی و درون تنی بوده است [۲۱-۲۳]. تجویز خوراکی عصاره آبی زعفران با روش وابسته به دوز باعث مهار رشد تومور آسیت موش، کارسینوم آسیت ارلیخ (EAC)، آسیت های دالتون لنفوما (DLA) شده و طول زندگی موش تیمار شده را دو تا سه برابر افزایش می دهد. در مطالعه مشابه دیگر دوز غیرسمی کروسین اثرات ژنوتوکسیک و نئوپلاستیک بنزوپیرین (BP) را در رده سلولی C3H10T1/2 را مهار می کند [۲۴]. بنابراین مطالعات مختلف درون تنی نشان می دهد که عصاره آبی زعفران و اجزاء خالص شده آن بطور معنی دار طول زندگی حیوانات مبتلا به انواع تومورها را افزایش می دهند اما هنوز مکانیسم اثر آنتی کارسینوژنیک آن توضیح داده نشده است. این مطالعه به منظور ارزیابی نقش احتمالی عصاره آبی زعفران در کاهش اثرات ژنوتوکسیسته عوامل جهش زا و سرطانزا انجام شد. نتایج مطالعه بیانگر آن است که عصاره آبی زعفران موجب کاهش معنی دار در شکست DNA حاصل از آلودگی با کادمیوم کلراید در ماکروفاژ و لنفوسیت موش می شود. چون کادمیوم بطور غیر مستقیم از طریق کاهش سیستم آنتی اکسیدان و تولید ROS موجب شکست زنجیره های DNA می شود، احتمالاً عصاره آبی زعفران به عنوان عامل آنتی اکسیدان از تولید ROS جلوگیری می کند. چون تیمار سلول ها با عصاره آبی زعفران قبل از آلودگی با کادمیوم موجب کاهش معنی دار در

T. Length و T.%DNA می شود و طول Tail و میزان DNA داخل هسته آن به عنوان شاخص از میزان شکست DNA و خروج آن از هسته است لذا بیانگر کاهش معنی دار در شکست دو زنجیره DNA است. ولی با تیمار همزمان و یا ۳۰ دقیقه پس از آلودگی با کادمیوم تغییرات معنی داری مشاهده نمی شود. این نتایج نشاندهنده اثرات پیشگیرانه عصاره آبی زعفران است و تاثیر چندانی در حذف و یا درمان اثرات ایجاد شده ندارد. اثرات مشابهی در مطالعه ای دیگر با استفاده از عصاره آبی زعفران به همراه عصاره سیر صورت گرفته که نتایج آن بیانگر اثرات آنتی ژنوتوکسیسیتی روی سلول های مغز موش است و سیر به عنوان یک عامل آنتی اکسیدان موجب تقویت اثر حفاظتی زعفران می شود [۲۶].

نتیجه گیری:

با توجه به موارد مشاهده شده احتمالاً از زعفران به عنوان مکمل غذایی جهت جلوگیری از بروز عوارض ژنوتوکسیسته مربوط به کارسینوژن های محیطی و از جمله کادمیوم می توان به کار برد.

تشکر و قدر دانی

از کلیه عزیزان که مارا در انجام این پژوهش یاری کردند سپاسگزاریم. از سرکار خانم دکتر مهوش جعفری مدیر محترم گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله که امکانات و لوازم لازم را در اختیار ما قرار دادند تشکر و قدر دانی می نمایم.

منابع

12. Walker IG, Cdith WJ. Protection of L-cells by thiols against the toxicity of sulfur mustard. *Can J Physiol Pharmacol* 1969; 47: 143-151.
13. Das SK, Mukherjee S, Cdith MG, Chatterjee D. Prophylactic protection by N-acetylcysteine against the pulmonary injury induced by 2-chloroethyl sulfide, a mustard analogue. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17: 177-184.
14. Shih MN, Korte WD, Cdith JR, Szafraniec LL. Reactions of sulfides with S-330, a potential decontaminant of sulfur mustard in formulations. *J Appl Toxicol* 1999; 19: 83-88.
15. Vijayaraghavan R, Kumar P, Dubey DK, Singh R. Evaluation of CC2 as a decontaminant in various hydrophilic and lipophilic formulations against sulfur mustard. *Biomed Environ Sci* 2002; 15: 25-35.
16. Premkuma 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 Human & Experiment Toxicol 2006; 25(2): 79-84.
17. Gad SC. In Vitro toxicology. 2nd ed. New York: Academic Press; 2000.
18. Zaree A, Saberi M, Pyrzad J, Golmanesh L. Investigation of acetaminophen induction effects on GSH concentration by N-acetylcysteine and 2-oxothiazolidin-4-carboxylate (OTC) and its protective effect on sulfur mustard injuries in H2FF cells. *Kowsar Med J* 2005; 10(3): 21-31.
19. Saberi M, Zaree Mahmodabady M. The Protective effects of N-Acetyl-Cysteine, Oxo-Thiazolidine- Carboxylate, Acetaminophen and their combinations against sulfur mustard cytotoxicity on human skin fibroblast cell line (HF2FF). *Iran Biomed J* 2009; 14(3): 149-158.
20. Mahmoudabady Z, Saberi, M, Pirzad J. Critical role of GSH in sulfur mustard induced oxidative stress and cytotoxicity in human skin fibroblast cell line. *Iran J Pharmaceut Res* 2008; 7(1): 35-41.
21. Escribano J, Diaz-Guerra MJ, Riese HH, Alvarez A, Proenza R, Fernandez JA. The cytotoxic effect of glucoconjugate extracted from corms of saffron plant (*Crocus sativus*) on human cell lines in culture. *Planta Med* 2000; 66(2): 157-162.
22. Abdullaev FI, Riveron Negrette L, Rotenburd Belacortu V, Kasumov FJ, Perez Lopez I, Hernandez JM, Espinosa Aguirre JJ. Saffron as chemopreventive agent In: Wenyi T, Ed. Food of 21st century: Food and resource
1. Cope W, Wiener J, Atchison G. Hepatic Cadmium, metal binding protein and bioaccumulation in bluegills exposed to aqueous cadmium. *Env Toxicol Chem* 1994; 13(4): 553- 562.
2. Gumgun B, Tez U, Gulsun Z. Heavy metal pollution in water, sediment and fish from the Tigris river in Turkey, *Chemosphere*, 1994; 29:111-116.
3. Kim D. The Effect of pollution on reproduction in fish. *Rev fish boil fisher* 1995; 5: 52-96.
4. Yen-Hua H, Chwen-Ming S, Chang-Jen H, Chun-Mao L, Chih-Ming CH, Meng-Ling T, et al. Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu, Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *J Cellul Bioch* 2006; 98: 577-589.
5. Houston Mc. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med* 2007; 13(2): 128-133.
6. Jeong JB, Park JH, Lee HK, Ju SY, Hong SC, Lee JR, et al. Protective effect of the extracts from *Cnidium officinal* against oxidative damage induced by hydrogen peroxide via antioxidant effect. *Food Chem Toxicol* 2008; 8: 670-674.
7. Gross CL, Innace JK, Hovatter RC, Meier HL, Cdith WJ. Biochemical manipulation of intracellular glutathione levels influences cytotoxicity to isolated human lymphocytes by sulfur mustard. *Cell Biol Toxicol* 1993; 9: 259-268.
8. Lindsay CD, Hambrook JL, Lailey AF. Monoisopropylglutathione ester protects A549 cells from cytotoxic effects of sulfur mustard. *Hum Exp Toxicol* 1997; 16: 636-644.
9. Meier HL, Johnson JB. The determination and prevention of cytotoxic effects induced in human lymphocytes by alkylating agent 2, 2'-dichloroethyl sulfide (sulfur mustard, HD). *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; 113: 234-239.
10. Vojvodic V, Milosavljevic Z, Boskovic B, Bojanic N. The protective effect of different drugs in rats poisoned by sulfur and nitrogen mustards. *Fundam Appl Toxicol* 1985; 5: S160-168.
11. Bhattacharya R, Lakshmana Rao PV, Pant SC, Kumar P, Tulsawani RK, Pathak U, et al. Protective effects of amifostine and its analogues on sulfur mustard toxicity *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 176: 24-33.

technology environment. China: Light Industry Press; 2000: 185-195.

23. Molnar J, Szabo D, Pusztai R, Mucsi I, Berek L, Ocsowski I, Kawata E, Shoyama Y. Membrane associated antitumor effects of crocine, ginseniside and cannabinoid derivates. *Anticancer Res* 2000; 20(2a): 861-867.

24. Chang VC, Lin YL, Lee MJ, Show SJ, Wang CJ. Inhibitory effect of crocetin on benzo (a) pyrece genotoxicity and neoplastic transformation in C3H1OT1/2 cells. *Anticancer Res* 1996; 765: 3603-3608.