DOI: 10.22092/VJ.2021.355910.1893
شماره ۱۳۶ پاییز ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران بر عملکرد تخم‌گذاری مرغ‌های لگهورن و اثرات مهارکنندگی تخم‌مرغ‌های حاصل، بر رشد سلول‌های سرطانی MCF-7 و PC3

• **رضا وکیلی (نویسنده مسئول)**
گروه علوم دامی، واحد کاشمر، دانشگاه آزاد اسلامی،کاشمر، ایران
• **مینا طرقیان**
گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد
• **شراره رضائیان**
گروه زیست‌فناوری قارچ‌های صنعتی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی
• **مهدی الهی‌ترشیزی**
گروه علوم دامی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۲۱-۰۶-۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: ۱۹-۰۸-۱۴۰۰
Emali: rezavakili2010@yahoo.com

چکیده

آزمایشی به منظور بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران بر شاخص‌های عملکردی، صفات کیفی تخم‌مرغ و رشد سلول‌های سرطانی در مرغ‌های تخمگذار انجام گرفت. در این آزمایش از ۲۰۰ قطعه مرغ تخمگذار سویه هایلاین W36 در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار، پنج تکرار و ۱۰ قطعه مرغ در هر تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل: تیماریک: شاهد (جیره پایه)، تیماردو: جیره پایه + ۴۰ ppm عصاره گلبرگ زعفران، تیمارسه: جیره پایه + ۶۰ ppm عصاره گلبرگ زعفران، تیمار چهار: جیره پایه + ۸۰ ppm عصاره گلبرگ زعفران بود. نتایج این تحقیق نشان داد که مصرف خوراک، ضریب تبدیل، وزن تخم‌مرغ و توده تخم‌مرغ در کل دوره‌ی آزمایشی تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفت (P>۰/۰۵). درصد تولید تخم‌مرغ تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت(P<۰/۰۵). وزن زرده، وزن پوسته، واحد هاو، ضخامت پوسته و رنگ زرده بطور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند (P<۰/۰۵). در تیمار سه بالاترین میزان ارتفاع زرده، وزن زرده، وزن پوسته و ضخامت پوسته مشاهده شد. همچنین بالاترین میزان واحد هاو در تیمارهای یک و چهار و بیشترین رنگ زرده در تیمارهای سه و چهار مشاهده شد.تیمارهای آزمایشی بر بازدارندگی رشد سلول‌های سرطانی MCF-7 و PC3 در غلظت‌های مختلف در شکل وابسته به غلظت تاثیر معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). نتایج به دست آمده از این آزمایش نشان داد که افزودن عصاره گلبرگ زعفران باعث بهبود کیفیت تخم‌مرغ و اثر بازدارندگی بر روی سلول‌های سرطانی می‌شود و بهترین دزهای مورد استفاده از گلبرگ زعفران در تیمارهای سه و چهار مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: عصاره هیدروالکلی زعفران، صفات کیفی تخم‌مرغ، سلول‌های سرطانی، مرغ‌های تخمگذار

Veterinary Researches & Biological Products No 136 pp: 52-61

The effect of hydroalcoholic extract of saffron petals on egg laying performance of Leghorn chickens and the inhibitory effects of obtained eggs on the growth of MCF-7 and PC3 cancer cells

By: Vakili R., (Corresponding Author) Animal Science Department, Kashmar Branch,Islamic Azad University, Kashmar, Iran. Toroghian, M., Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad. Rezaeian, SH., Industrial Fungi Biotechnology Research Department, Research Institute for Industrial Biotechnology, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR)-Khorasan Razavi Branch. and Elahi Tourshizi, M., Animal Science Department, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Received:2021-09-12 Accepted: 2021-11-10

Emali: rezavakili2010@yahoo.com

An experiment was performed to investigate the effect of hydroalcoholic extract of saffron petals on performance indices, egg quality and cancer cells in laying hens. , Five replicates and 10 chicken pieces per replicate were used. Experimental treatments included: treatment: control (basic diet), Timardo: basic diet + 40 ppm saffron petal extract, treatment: basic diet + 60 ppm saffron petal extract, treatment four: basic diet + 80 ppm saffron petal extract. The results of this study showed that feed consumption, conversion ratio, egg weight and egg mass were not affected by the treatments during the whole experimental period (P <0.05). The percentage of egg production was affected by experimental treatments and increased significantly (P <0.05).Yolk weight, shell weight, units, shell thickness and yolk color were significantly affected by experimental treatments (P <0.05). As in the three treatments, the highest yolk height, yolk weight, shell weight and shell thickness were observed. Also, the highest amount of units was observed in treatments one and four and the highest yolk color was observed in treatments three and four. Experimental treatments had a significant effect on growth inhibition of MCF-7 and PC3 cancer cells at different concentrations in concentration-dependent form (P <0.05). The results of this experiment showed that the addition of saffron petal extract improves egg quality and inhibitory effect on cancer cells and the best doses of saffron petal used were observed in treatments three and four.

Keywords: Hydroalcoholic extract of saffron, Qualitative traits of eggs, Cancer cells, Layers

مقدمه

در سال‌های اخیر استفاده از زعفران به عنوان یک افزودنی برای بهبود کیفیت تخم‌مرغ و ثبات اکسیداتیو زرده تخم‌مرغ مورد توجه بوده است (۵). با توجه به مضرات آنتی‌اکسیدانت‌های مصنوعی، استفاده از زعفران که حاوی آنتی‌اکسیدانت‌های طبیعی هست؛ گزینه مناسبی برای جلوگیری از فساد اکسیداتیو است (۱۴). گیاهان سرشار از چندین ماده شیمیایی فعال زیستی یا فیتوشیمیایی هستند (۱۹). این ترکیبات تحت فلاونوئیدها، ترکیبات فنولیک، ساپونین‌ها، آلکالوئیدها، گلیکوزیدها و ترپنوئیدها قرار می‌گیرند (۲۰). اثرات مفید مواد شیمیایی گیاهی را می‌توان به خواص ضدمیکروبی، ضدویروسی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نسبت داد. استفاده از گیاهان دارویی (گیاهان، ادویه جات و عصاره آن‌ها) به عنوان جایگزین‌های ارگانیک به دلیل افزایش آگاهی در مورد ایمنی غذا و خطرات ناشی از استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش یافته است. گیاهان ارزان هستند و به راحتی در دسترس م باشند و در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها هیچگونه سمی بر روی محصولات نهایی حیوانات ایجاد نمی‌کنند. مواد شیمیایی گیاهی به بهبود عملکرد، افزایش تکثیر سلول‌های ایمنی، رهایی از چالش‌های روده‌ای، کاهش استرس اکسیداتیو، کاهش مرگ و میر و افزایش تیتر آنتی‌بادی کمک می‌کنند (۱۹). از مدت‌ها قبل، زعفران به عنوان یک داروی گیاهی استفاده می‌شود. بیش از ۱۵۰ ترکیب مختلف در زعفران وجود دارد که شامل کربوهیدرات‌ها، پلی پپتیدها، لیپیدها، مواد معدنی و ویتامین‌ها است (۱۵). زعفران در معالجه‌ی بسیاری از بیماری‌ها در تمدن‌های باستانی مورد استفاده بوده است. تحقیقات پیشرفته در مورد خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیوشیمیایی زعفران همراه با فعالیت زیستی ترکیبات زعفران نقش آن را در داروسازی مدرن تأیید کرده است که خواص دارویی آن به دلیل وجود ترکیبات فرار و غیر فرار موجود در زعفران می‌باشد. زعفران دارای پیکروکروسین، سافرانال، کروستین و α-کروسین همراه با لیکوپن، زاگزانتین، α و β کاروتن‌ها است همچنین غنی از عناصر همچون Ca، Zn ، Fe، Cu، Se، Mg، P و Mn و بسیاری از ویتامین‌ها مانند ویتامین A، اسید فولیک، ریبوفلاوین، نیاسین و ویتامین C می‌باشد. جدا از کاربردهای زعفران در طب سنتی، تحقیقات اخیر بر استفاده از آن در کاهش آسیب اکسیداتیو، مبارزه با عفونت‌ها و التهاب‌ها، تعدیل سیستم ایمنی بدن و

به عنوان یک عامل ضد درد تأکید می‌کند (۲۰). گلبرگ زعفران، به عنوان یک محصول فرعی مهم زعفران، سالانه در مقادیر زیادی (بیش از ۱۰ هزار تن در سال) تولید می‌شود و معمولاً به عنوان یک محصول زائد دور ریخته می‌شود. خواص آنتی‌اکسیدانی گزارش شده گلبرگ زعفران به احتمال زیاد به ترکیبات فنولی آن مانند کروسین و کامفرول نسبت داده می‌شود (۲۶). برخی از پروتئین‌های تخم‌مرغ و پپتیدها می‌توانند در درمان سرطان استفاده شوند. مطالعات متعددی وجود دارد که فعالیت ضدسرطانی پروتئین‌های تخم‌مرغ را نشان می‌دهد، و این امر از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله القاء آپوپتوز، محافظت در برابر آسیب دی‌اکسی ریبو نوکلئویک اسید(DNA) کاهش توانایی تهاجمی سلول‌های سرطانی و افزایش فعالیت سمیت سلولی و فعالیت ضدزایی سلول‌ها صورت می‌گیرد. قبل از اینکه یک عامل ضد سرطان جدید مورد استفاده قرار گیرد، نیاز به آزمایشات در داخل بدن(in vivo) و مطالعات انسانی است توسعه یافته می‌باشد. تا به امروز ، به استثنای لیزوزیم، بیشتر مطالعات روی پروتئین‌های تخم‌مرغ در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است. علاوه بر این، داروهای ضد سرطان فعلی دارای مشکلات متعددی هستند، از جمله مسمومیت با سلول‌های طبیعی و هزینه بالا. پروتئین‌ها و پپتیدهای تخم‌مرغ می‌توانند بر زنده ماندن سلول‌ها تأثیر بگذارند. بنابراین، آزمایش سمیت روی سلول‌های طبیعی برای افزودن به داروهای ضدسرطان موجود ضروری است. با این حال، آزمایش سمیت تنها در چند مطالعه انجام شده است، و اکثر آنها فاقد تحقیقات در مورد مکانیسم مولکولی زیرین هستند.تعدادی گزارش در مورد مسیرهای علامت‌دهی سلولی مرتبط با سرطان (به عنوان مثال، PI3K/AKT/mTOR pathway, p53 pathway, NF-κB pathway, MAPK pathway) وجود دارد. بنابراین لازم است که مسیرهای سیگنال‌دهی دخیل در تأثیر پروتئین‌ها و پپتیدهای تخم‌مرغ بر روی سلول‌های سرطانی مطالعه شود. انتظار می‌رود مطالعات آینده در مورد فعالیت‌های ضدسرطانی پروتئین‌ها و پپتیدهای تخم‌مرغ شامل آزمایش سیتوتوکسیک دربدن(in vivo) و به دنبال آن مطالعات انسانی باشد، به این امید که مکانیسم‌های مولکولی و مسیرهای سیگنالینگ سلولی درگیر شود(۱۷). هدف از انجام این پژوهش بررسی اثرات سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران بر عملکرد تولیدی، صفات کیفی تخم‌مرغ و تاثیر زرده تخم‌مرغ حاوی زعفران بر رشد سلول‌های سرطانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در مرغداری سپید مرغ چناران انجام شد. در این تحقیق از ۲۰۰ قطعه مرغ تخم‌گذار سویه هایلاین W۳۶ ۳۹ هفته در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار، پنج تکرار و ۱۰ قطعه مرغ در هر تکرار استفاده شد.

عصاره‌گیری گلبرگ زعفران

قبل از شروع آزمایش تهیه عصاره از گلبرگ زعفران انجام شد. گلبرگ‌ها به همراه خامه وکلاله بودند. گلبرگ‌ها به همراه خامه و کلاله در سایه خشک شدند. سپس آسیاب و با اتانول ۵۰ درصد شیک و صاف شد. استخراج با نسبت یک به ۱۰ با اتانول ۵۰ درصد به مدت دو ساعت صورت گرفت. سپس به ترتیب تغلیظ و جداسازی حلال، خشک کردن با روش خشک‌کن افشانه‌ای، الک کردن و بسته‌بندی انجام شد. ترکیبات موثر یا متابولیت‌های ثانویه در عصاره گلبرگ زعفران در جدول ۱ گزارش شده است (۹).

پودر حاصل با کربنات کلسیم پودری به عنوان کریر در آسیاب رپیدمیل (Raped mill) که متشکل از یک قندان سرامیکی با سرپوش و گلوله‌های سرامیکی گرد بود، با دور ۳۵۰ دور در دقیقه آسیاب شدند و بعد از تهیه مکمل ابتدا آن را در ۱۰ kg جیره در یک میکسر کوچک مخلوط گردید و سپس در میکسر افقی مخلوط شد.

جیره‌ها بر اساس احتیاجات توصیه شده سویه و با نرم‌افزار UFFDA تنظیم شد و اجزا و ترکیبات جیره در جدول ۲ آورده شده است. این آزمایش در مدت ۱۲ هفته (سه دوره ۴ هفته‌ای) از شروع تولید مرغ‌ها تا پایان پیک تولید انجام گرفت.

تیمارهای آزمایشی عبارتند از: تیمار یک: شاهد (جیره پایه)، تیماردو: جیره پایه + ۴۰ ppm عصاره گلبرگ زعفران. تیمارسه: جیره پایه + ppm ۶۰ عصاره گلبرگ زعفران. تیمار چهار: جیره پایه + ۸۰ ppm عصاره گلبرگ زعفران.

صفات عملکردی

میزان خوراک مصرفی طبق راهنمای سویه مورد نظر (۱۳) در نظر گرفته

جدول ۱- ترکیبات موثر یا متابولیت‌های ثانویه در عصاره گلبرگ زعفران.

ترکیبات	مقادیر
کل ترکیبات فنلی(mg)	۳/۴۲
کل فلاونوئیدها (mg/g)	۲/۷۵
کامپفرول (٪)	۱۲/۶
کروسین (٪)	۰/۶
آنتوسیانین (mg/l)	۱۷۱۲

شد. در طی آزمایش مصرف خوراک روزانه (gr)، تعداد و تولید تخم‌مرغ (day/hen/gr) و ضریب تبدیل خوراک محاسبه شد. مصرف خوراک روزانه هر تیمار، با اندازه‌گیری باقیمانده خوراک مصرفی در روز بعد و کسر آن از مقدار کل خوراک در نظر گرفته شده برای هر تیمار محاسبه شد.

وزن تخم‌مرغ با استفاده از ترازو دیجیتال با دقت ۰/۰۱ اندازه‌گیری می‌شد. درصد تولید، وزن تخم‌مرغ و ضریب تبدیل خوراک با استفاده از فرمول‌های زیر بدست آمد:

$$Pd = (Te/n) \times 100$$

جدول ۲- اجزا و ترکیبات جیره پایه.

ماده خوراکی	(درصد) ٪
ذرت	۴۹/۵
سویا	۲۸/۰
گندم	۱۰/۰
کربنات کلسیم	۸/۵
روغن	۰/۸
دی کلسیم فسفات	۲/۱
نمک طعام	۰/۲۵
جوش شیرین	۰/۱۵
مکمل ویتامینه*	۰/۲۵
مکمل معدنی**	۰/۲۵
دی ال متیونین	۰/۲
آنالیز محاسباتی جیره	
انرژی قابل متابولیسم (kcal/kg)	۲۶۹۶
پروتئین خام (٪)	۱۷/۲۴
کلسیم (٪)	۳/۶۹
فسفر قابل دسترس (٪)	۰/۴۹۳
سدیم (٪)	۰/۱۸
کلر (٪)	۰/۱۸
متیونین (٪)	۰/۴۶
متیونین-سیستئین (٪)	۰/۷۴۴
لایزین (٪)	۰/۹۰۳
ترئونین (٪)	۰/۶۵

*ترکیب مکمل ویتامینه برای هر کیلوگرم جیره شامل: IU۳۲۰۰۰۰۰ ویتامین A، IU۱۳۲۰۰۰۰ ویتامین D۳، ۸۰۰۰ IU ویتامین E، mg/kg ۱۰۰۰ ویتامین K۳، mg/kg ۱۰۰۰ ویتامین B۱، mg/kg ۲۲۰۰ ویتامین B۲، mg/kg ۳۲۰۰ ویتامین کالبان، mg/kg۱۲۰۰۰ نیاسین، mg/kg ۱۶۰۰ B۶، mg/kg ۳۶۰ B۹، mg/kg۹ B۱۲، mg/kg۳۰ بیوتین، mg/kg ۴۴۰۰۰ کولین، آنتیاکسیدان mg/kg ۳۰۰۰. **مکمل معدنی بدون منگنز برای هر کیلوگرم جیره پایه شامل: mg ۳۲۰۰۰ روی، mg ۳۲۰۰ مس، mg ۴۸۰ ید، mg ۸۸ سلنیوم، mg ۱۶۰۰۰ آهن. **میزان منگنز جیره پایه اندازهگیریشده در آزمایشگاه mg/kg ۷۹/۰۱ به دست آمد.

در این فرمول، Pd: ٪ تولید روزانه، Te: تعداد تخم‌مرغ هر واحد آزمایشی، n: تعداد مرغ هر واحد آزمایشی است.

وزن تخم‌مرغ

EW = EWT/n

در این فرمول، EW: میانگین وزن تخم مرغ روزانه، EWT: وزن کل تخم مرغ هر واحد آزمایشی، n: تعداد تخم‌مرغ تولیدی هر واحد آزمایشی است.

ضریب تبدیل

FCR = FI/Em

در این فرمول، FCR: ضریب تبدیل خوراک هر واحد آزمایشی، FI: مصرف خوراک هر واحد آزمایشی، Em: توده تخم‌مرغ هر واحد آزمایشی (درصد تولید ضربدر میانگین وزن تخم‌مرغ تقسیم بر ۱۰۰) است.

صفات کیفی تخم‌مرغ

جهت بررسی برخی صفات کیفی در هر ماه، تعداد چهار عدد تخم‌مرغ از هر تکرار انتخاب و پس از وزن‌کشی و ثبت آن، شاخص شکل تخم‌مرغ، شاخص زرده، رنگ زرده، ضخامت پوسته (میانگین ضخامت پوسته در سه ناحیه انتهای پهن، انتهای باریک و ناحیه استوای تخم‌مرغ با دقت ۰/۰۱ mm±)، وزن پوسته(۰/۰۱ g±)، واحد هاو و وزن تخم‌مرغ اندازه گیری شد.

شاخص شکل با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

SI= (EW / EL) × 100

در این فرمول، SI: شاخص شکل، EW : وزن تخم مرغ، EL : طول تخم مرغ است.

آزمایش سلولی

آزمایشات کشت سلول سرطانی در آزمایشگاه سلولی در گروه زیست‌فناوری قارچ‌های صنعتی جهاد دانشگاهی مشهد و بر اساس تغییراتی در روش گزارش شده قبلی انجام شد. (۲۲). بر اساس این روش‌ها، سلول‌های سرطان سینه(MCF-7) درمحیط کشت RPMI و سلول‌های سرطان پروستات (PC3) در محیط کشت DMEM کشت شدند. هر دو محیط کشت RPMI و DMEM(به صورت محلول حاوی بی‌کربنات سدیم) با ۱۰٪ سرم جنین گاوی(FBS) (غیرفعال شده با حرارت) ترکیب شده و پس از فیلتراسیون با کمک فیلتر ۰/۲۲ µm، برای کشت سلول استفاده شدند. سرطان سینه یکی از شایع‌ترین سرطان‌های مربوط به خانم‌ها بوده و سرطان پروستات هم شایع‌ترین سرطان در مردها گزارش شده است و به همین دلیل این رده‌های سلولی انتخاب شدند. کشت سلول در فلاسک‌های استریل با سطح رشد ۷۵ cm۲ دارای درب فیلتردار انجام پذیرفت و سپس پاساژ سلولی صورت گرفت. انجماد و احیای سلولی با استفاده از تجربیات طرح قبلی انجام شد (۲۱). بطور خلاصه، انجماد بر روی سلول‌های در فاز تصاعدی رشدی و در محیط کشت تازه مخصوص انجماد (حاوی FBS و DMSO (Merck, Darmstadt, Germany) به نسبت ۹ به ۱ انجام گرفت. در آخر اثر غلظت‌های مختلف زرده تخم‌مرغ بر روی ممانعت از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی (Antiproliferation) بر اساس تغییرات و بهینه سازی با تست MTT انجام شد (روش رنگ‌سنجی که جهت بررسی میزان زنده بودن سلول‌ها پس از تاثیر ماده موردنظراست). جذب نوری توسط دستگاه نانودراپ (BioTek Instruments, USA) در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. درصد سلول‌های زنده در مقایسه با شاهد منفی (که ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد) محاسبه شد (۲۲).

آنالیز داده‌ها

جدول ۳- اثرات عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران بر شاخص‌های عملکردی در مرغ‌های تخم‌گذار.

تیمار	کل دوره				
	مصرف خوراک (gr)	ضریب تبدیل	وزن تخم مرغ (gr)	درصد تولید تخم مرغ	توده تخم مرغ
تیمار یک	۱۱۶/۲۴۵	۲/۲۸۳	۵۸/۶۵۷	۸۷/۲ b	۵۱/۱۵۳
تیمار دو	۱۰۷/۹۶۷	۲/۱۳۸	۵۸/۳۵۹	۸۶/۶ b	۵۰/۵۵۷
تیمار سه	۱۰۸/۷۰۹	۲/۱۸۱	۵۹/۰۹۹	۸۴/۶ b	۴۹/۹۹۱
تیمار چهار	۱۰۶/۶۲۳	۲/۰۲۶	۵۸/۵۶۱	۹۰/۰ a	۵۲/۷۱۹
SEM	۳/۵۶۶	۰/۰۹۱	۰/۴۶۲	۲/۲	۱/۲۹۹
p-value	۰/۲۵۹	۰/۲۹۲	۰/۷۱۷	۰/۰۰۰۱	۰/۵۰۲

a,bمیانگین های با حرف غیر مشابه در هر ردیف، از نظر آماری تفاوت معنی داری دارند (P<۰/۰۵)، SEM: میانگین خطای معیار. تیماریک: شاهد (جیره پایه)، تیماردو: جیره پایه + ۴۰ppm مکمل زعفران. تیمارسه: جیره پایه + ۶۰ppm مکمل زعفران. تیمار چهار: جیره پایه + ۸۰ppm مکمل زعفران.

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی ساده و طرح کاملا تصادفی با چند مشاهده(صفات کیفی تخم مرغ) در هر تکرار با ترتیب با مدل‌های زیر انجام شد:

$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$

$Y_{ijk} = \mu + T_i + e_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$

در این مدل‌ها، μ: میانگین صفت، T_i: اثر تیمار آزمایشی، ε_{ijk}: اثر خطای نمونه‌برداری، e_{ijk}: اثر خطای آزمایشی است. داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده GLM نرم‌افزار آماری SAS، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در صورت معنی‌دار شدن اختلاف میانگین، از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف استفاده شد.

همچنین برای آنالیز آماری کشت سلولی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد. در آزمایشات سلولی، بر اساس دستورالعمل کار با کشت‌های سلولی (۱۶) تمامی آزمایشات به صورت حداقل ۳ تکرار کاملا مستقل (independent replication) در روزهای جداگانه انجام شد. در هر تکرار مستقل (هر پلیت ۹۶ خانه)، تعداد ۳ چاهک به هر تیمار اختصاص داده شد (به عنوان Sub-Sample). فاکتور اصلی به عنوان تیمار (متغیر مستقل) عبارت بود از: ۴ نوع جیره غذایی که در قالب تخم‌مرغ حاصله از مرغ‌های تغذیه شده با این جیره‌های غذایی مورد مطالعه قرار گرفت. سپس زرده تخم‌مرغ استحصال و به عنوان تیمار بر روی سلول تست شد. صفت مورد مطالعه (متغیر وابسته) عبارت بود از مقدار کاهش رشد سلولی در مقایسه با کنترل منفی (که تیمار دریافت نکرده است). هر سطح جیره خود در پنج غلظت متوالی به سلول‌ها داده شد. دو رده سلولی متفاوت مورد استفاده قرار گرفت. آنالیزهای آماری با هدف بررسی اثر سطح جیره بر کاهش رشد سلولی انجام شد.

نتایج

شاخص‌های عملکردی: اثرات عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران بر شاخص‌های عملکردی در مرغ‌های تخمگذار در جدول ۳ گزارش شده است. با توجه به نتایج به دست آمده در این آزمایش درصد تولید تخم‌مرغ به طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵) بطوری‌که تیمار چهار بالاترین درصد تولید تخم‌مرغ را نسبت به باقی تیمارها به خود اختصاص داد. با این حال باقی شاخص‌های عملکردی (مصرف خوراک، ضریب تبدیل، وزن تخم‌مرغ و توده تخم‌مرغ) تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند (P>۰/۰۵).

خصوصیات کیفی تخم‌مرغ

اثرات عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران بر صفات کیفی تخم‌مرغ در مرغ‌های تخمگذار در جدول ۴ گزارش شده است. با توجه به نتایج به دست آمده شاخص شکل تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند (P>۰/۰۵). همچنین وزن زرده، وزن پوسته، واحد هاو، ضخامت پوسته و رنگ زرده بطور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند (P<۰/۰۵). بیشترین میزان وزن زرده را تیمار سه و کمترین میزان را تیمار یک به خود اختصاص دادند. در خصوص ضخامت پوسته، بیشترین میزان ضخامت پوسته را تیمار سه و کمترین ضخامت پوسته را تیمار دو به خود اختصاص دادند. این در حالی است که هر دو تیمار در مقایسه با تیمار یک و تیمار چهار از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند. بعلاوه تیمار یک و تیمار چهار بیشترین میزان واحد هاو را دارا بودند و بالاترین درجه رنگ در تیمار سه و چهار و بیشترین وزن پوسته در تیمار یک و تیمار سه مشاهده گردید.

کشت سلولی

میانگین بازدارنگی (بر حسب درصد در مقایسه با کنترل منفی) غلظت‌های مختلف زرده تخم‌مرغ حاصل از جیره‌های مختلف علیه سلول‌های سرطان سینه(MCF-7) در جدول ۵ آورده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده، تمام تیمارهای آزمایشی بر بازدارندگی بر روی سلول‌های سرطان سینه(MCF-7) در غلظت‌های مختلف تاثیر معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). بطوری که در تیمار یک بیشترین میزان در غلظت ۶۲۵ µg/ml و ۱۲۵۰ مشاهده شد و تیمار دو در غلظت‌های ۶۲۵ و ۲۵۰۰

جدول ۴- اثرات عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران بر صفات کیفی تخم‌مرغ در مرغ‌های تخمگذار.

تیمارآزمایشی	شاخص شکل	وزن زرده (gr)	وزن پوسته (gr)	ضخامت پوسته (mm)	واحد هاو	رنگ زرده
تیمار یک	۸۰/۳۰۵	۱۴/۸۱۱ c	۵/۸۲۵ a	۰/۴۶۸ ab	۹۴/۴۹۴ a	۰/۷۶۲ b
تیمار دو	۷۹/۵۳۱	۱۵/۷۸۱ ab	۵/۳۱۰ b	۰/۴۳۹ b	۸۹/۸۵۷ b	۰/۷۷۸ b
تیمار سه	۷۹/۱۳۷	۱۶/۰۲۹ a	۵/۶۸۴ a	۰/۴۸۷ a	۹۰/۸۵۳ b	۰/۸۹۱ a
تیمار چهار	۷۹/۸۹۶	۱۵/۱۴۴ bc	۵/۶۲۹ ab	۰/۴۵۶ ab	۹۶/۹۰۵ a	۰/۹۰۳ a
SEM	۰/۵۳۰	۰/۲۳۸	۰/۱۱۳	۰/۲۳۸	۱/۱۶۲	۰/۰۰۶
P-value	۰/۴۶۸	۰/۰۰۸	۰/۰۳۳	۰/۰۲۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۱

a,bمیانگین های با حرف غیر مشابه در هر ردیف، از نظر آماری تفاوت معنی داری دارند (P<۰/۰۵، SEM: میانگین خطای معیار). تیماریک: شاهد (جیره پایه)، تیمار دو: جیره پایه + ۴۰ ppm مکمل زعفران. تیمارسه: جیره پایه + ۶۰ ppm مکمل زعفران. تیمار چهار: جیره پایه + ۸۰ ppm مکمل زعفران.

بیشترین میزان بازدارندگی را به خود اختصاص دادند. همچنین در تیمار سه و تیمار چهار بالاترین میزان بازدارندگی بر روی سلول‌های سرطان سینه(V-MCF) در غلظت ۵۰۰۰ مشاهده شد. اما در تیمار چهار، مشاهده شد که اختلاف بسیار معنی‌داری بین غلظت (µg/mL ۵۰۰۰ با سایر غلظت‌ها وجود دارد (شکل ۱).

میانگین بازدارنگی (بر حسب درصد در مقایسه با کنترل منفی) غلظت‌های مختلف زرده تخم‌مرغ حاصل از جیره‌های مختلف علیه سلول‌های سرطان پروستات (PC۳) در جدول ۶ آورده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده در مقایسه میانگین، در تیمار یک درصد بازدارندگی غلظت ۱۲۵۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ در مقایسه با کنترل منفی و غلظت ۶۲۵ بیشترین میزان را به خود اختصاص دادند، اگرچه اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های ۱۲۵۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ وجود نداشت (P>۰/۰۵). از طرفی در تیمار دو غلظت‌های ۱۲۵۰ و ۵۰۰۰ بالاترین میزان بازدارندگی را دارا بودند و همچنین در تیمار سه، درصد بازدارندگی غلظت µg/ml ۶۲۵، ۱۲۵۰ و ۲۵۰۰ در مقایسه با کنترل منفی و غلظت ۵۰۰۰ بالاترین میزان را داشتند، اگرچه اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های ۶۲۵، ۱۲۵۰ و ۲۵۰۰ وجود نداشت (P>۰/۰۵). در تیمار چهار بیشترین میزان در غلظت ۵۰۰۰ و کمترین میزان در کنترل منفی مشاهده شد بطوری که با افزایش غلظت میزان بازدارندگی نیز افزایش یافته است. در تیمار چهار، بازدارندگی قابل ملاحظه‌ای در غلظت (µg/ml ۵۰۰۰)مشاهده شد که شبیه به نتایج بدست آمده در سلول‌های سرطان سینه(V-MCF) بود (شکل ۲).

بحث

مطالعات نشان می‌دهد که مکمل عصاره‌های گیاهی می‌تواند عملکرد تخم‌گذاری و کیفیت تخم‌مرغ را بهبود بخشد (۷). همسو با نتایج به دست آمده در این آزمایش، محققین بیان کردند که تفاوت معنی‌داری در مصرف خوراک در بین تیمار زعفران که به میزان mg/kg ۲۰ به جیره اضافه شده بود با تیمار شاهد وجود نداشت (۵). همچنین مغایر با نتایج این آزمایش، محققان بیان کردند که افزودن عصاره زعفران به جیره جوجه‌های گوشتی باعث کاهش ضریب تبدیل خوراک مصرفی آنها شده است (۱۰). از طرفی محققین نشان دادند که تولید تخم‌مرغ، ضریب تبدیل، وزن تخم‌مرغ، شکل تخم‌مرغ، شکل زرده، واحد هاو و ضخامت پوسته غذا در بین تیمار زعفران با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (۵). همچنین مطابق با نتایج این آزمایش، مطالعات نشان داد که استفاده از گلبرگ زعفران در جیره غذایی می‌تواند باعث افزایش رنگ زرده شود بطوری که افزودن دو یا سه درصد گلبرگ زعفران باعث پررنگ شدن معنی‌دار زرده نسبت به شاهد و گروه یک درصد گلبرگ زعفران شد (۱۴). در مطالعه‌ی دیگری، محققین بیان کردند که وقتی زعفران به عنوان مکمل غذایی استفاده شد، رنگ زرده بهبود یافت (۵). زعفران سرشار از کاروتنوئیدها است (۴). دو کاروتنوئید اصلی طبیعی زعفران، کروسین و کروستین که عامل رنگ آن هستند(۴، ۶ و ۱۸). به همین دلیل این بهبود در رنگ زرده نشانگر عبور کروسین‌ها، لیکوپن و کاروتن، از اجزای رنگ‌دهنده زعفران، از جیره مرغ به زرده تخم‌مرغ است (۲۴).

در حال حاضر، در تحقیقات نشان داده شده است که زعفران و ترکیبات آن نقش درمانی زیادی دارند از جمله فعالیت ضدسرطان و ضدتومور، اثرات ضدنوروپاتیک (۲، ۱۱ و ۱۲). زعفران در مهار تکثیر سلولی، القا آپوپتوز، اثرات آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد، خاصیت محافظت از ژن، جلوگیری از پراکسیداسیون لیپید و فرآیندهای ضدالتهابی نقش اساسی دارد. نتیجه مکانیسم‌های ذکر شده خصوصیات درمانی بالقوه زعفران را در برابر سرطان کبد، سرطان معده، سرطان روده بزرگ و

جدول ۵- میانگین بازدارنگی (بر حسب درصد در مقایسه با کنترل منفی) غلظت‌های مختلف زرده تخم مرغ حاصل از تیمارهای مختلف علیه سلول‌های سرطان سینه (MCF-۷) (p=۳) (P ≤ ۰/۰۵).

تیمار	کل دوره				
	مصرف خوراک (gr)	ضریب تبدیل	وزن تخم مرغ (gr)	درصد تولید تخم مرغ	توده تخم مرغ
تیمار یک	۱۱۶/۲۴۵	۲/۲۸۳	۵۸/۶۵۷	۸۷/۲ b	۵۱/۱۵۳
تیمار دو	۱۰۷/۹۶۷	۲/۱۳۸	۵۸/۳۵۹	۸۶/۶ b	۵۰/۵۵۷
تیمار سه	۱۰۸/۷۰۹	۲/۱۸۱	۵۹/۰۹۹	۸۴/۶ b	۴۹/۹۹۱
تیمار چهار	۱۰۶/۶۲۳	۲/۰۲۶	۵۸/۵۶۱	۹۰/۰ a	۵۲/۷۱۹
SEM	۳/۵۶۶	۰/۰۹۱	۰/۴۶۲	۲/۲	۱/۲۹۹
p-value	۰/۲۵۹	۰/۲۹۲	۰/۷۱۷	۰/۰۰۰۱	۰/۵۰۲

a,bمیانگین های با حرف غیر مشابه در هر ردیف، از نظر آماری تفاوت معنی داری دارند (P: میانگین خطای معیار، SEM<۰/۰۵). تیماریک: شاهد (جیره پایه)، تیماردو: جیره پایه + ppm۴۰ مکمل زعفران. تیمارسه: جیره پایه + ppm۶۰ مکمل زعفران. تیمار چهار: جیره پایه + ppm۸۰ مکمل زعفران.

سرطان لوزالمعده و ایلئوم را نشان می‌دهد (۱۵). همچنین در مطالعه دیگری، محققین بیان کردند که کروستین یك ماده ضدسرطان است (۳). بر اساس این، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدتکثیری و آپوپتوز از اثرات اصلی کروستین در برابر سرطان است (۳). عملکرد کروسین در برابر استرس اکسیداتیو شامل کاهش سطح مالون دی آلدئید، بهبود سطح گلوتاتیون و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌باشد (۲۳). بعلاوه کروسین، یکی دیگر از مواد فعال زعفران، خاصیت ضدسرطانی مانند کروستین دارد (۸). عصاره اتانولی زعفران توانایی القا آپوپتوز در سلول‌های توموری را دارد. همچنین محققین نقش ویژه زعفران را در مرگ سلول‌های سرطان سلول‌های کبدی انسانی (HepG2) و سلول‌های سرطان دهانه رحم انسان (HeLa) به اثبات رساندند (۲۵). محققین دو مکانسیم زعفران را که باعث فعالیت ضدسرطانی آن می‌شود را این‌گونه بیان کردند: ۱) مهار تکثیر سلولی در اوایل رشد سلولی با القای توقف چرخه سلولی و یا ممکن است توالی‌های DNA را هدف قرار داده و بیان ژن را تعدیل کند. ۲) از بین بردن سلول‌های سرطانی از طریق آپوپتوز(۱).

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی نتایج این آزمایش نشان داد، اگرچه عصاره هیدروالکلی بر صفات عملکردی تاثیر معنی‌داری نداشت اما افزودن مکمل عصاره زعفران به جیره سبب بهبود کیفیت تخم‌مرغ و اثر بازدارندگی در سلول‌های سرطانی می‌شود و این اثر به دلیل مواد موثره‌ی موجود در گیاه زعفران می‌باشد که با اثر مثبت بر این فاکتورها باعث بهبود می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از نتایج طرح تحقیقاتي اجرا شده به شماره قرارداد ۱۲۳۷۶/پ از محل اعتبارات پژوهشکده زعفران دانشگاه تربت‌حیدریه مي‌باشد.

منابع مورد استفاده

1. Amin, A., A.A. Hamza. K. Bajbouj. S.S. Ashraf. and S. Daoud. 2011. Saffron: a potential candidate for a novel anticancer drug against hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 54(3): 857-867.

2. Amin, B. and H. Hosseinzadeh. 2012. Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of saffron, Crocus sativus L., and its constituents, safranal and crocin in allodynia and hyperalgesia induced by chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. *Fitoterapia* 83(5): 888-895.

3. Bathaie., S.Z., R. Hoshyar. H. Miri and M. Sadeghizadeh. 2013. Anticancer effects of crocetin in both human adenocarcinoma gastric cancer cells and rat model of gastric cancer. *Biochemistry and Cell Biology* 91(6): 397-403.

4. Bolhassani, A., A. Khavari and S.Z. Bathaie. 2014. Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. Biochimica et Biophysica *Acta (Bba)-reviews on cancer* 1845(1) 20-30.

5. Botsoglou, N., P. Florou-Paneri. E. V. BotsoglouDotas. I. Giannenas. A. Koidis and P. Mitrakos. 2005. The effect of feeding rosemary, oregano, saffron and α-tocopheryl acetate on hen performance and oxidative stability of eggs. *South African Journal of Animal Science*, 35(3):143-151.

6. Daniel, M. 2006. Medicinal Plants: Chemistry and Properties. Enfield: Science Publishers.

7. Dilawar, M.A., H.S. Mun. D. Rathnayake. E.J. Yang. Y.S. Seo. H.S. Park and C.J. Yang. 2021. Egg Quality Parameters, Production Performance and Immunity of Laying Hens Supplemented with Plant Extracts. *Animals* 11(4): 975.

جدول ۶- میانگین بازدارنگی (بر حسب درصد در مقایسه با کنترل منفی) غلظت‌های مختلف زرده تخم مرغ حاصل از جیره‌های مختلف علیه سلول های سرطان پروستات (PC۳) (p=۳) (P ≤ ۰/۰۵).

تیمارهای آزمایشی	غلظت صفر (کنترل منفی)	غلظت (g/mLμ)			
		۶۲۵	۱۲۵۰	۲۵۰۰	۵۰۰۰
تیمار یک	b۰	۱/۸۰±۰/۹۰ b	۶/۲۲±۱/۷۵ a	۶/۹۷±۲/۷۴ a	۶/۷۲±۲/۳۱ a
تیمار دو	c۰	۲/۰۰±۰/۵۳ c	۱۴/۶۶±۲/۶۵ a	۱۰/۰۳±۱/۷۶ b	۱۴/۸۱±۴/۵۲ a
تیمار سه	c۰	۲۰/۵۶±۱/۵۹ a	۲۱/۰۰±۱/۱۱ a	۱۸/۸۴±۳/۳۹ a	۱۰/۵۶±۲/۸۲ b
تیمار چهار	e۰	۱۷/۹۱±۰/۷۶ d	۲۹/۳۰±۳/۷۹ b	۲۳/۱۷±۲/۶۳ c	۴۲/۴۶±۱/۲۱ a

a,b میانگین های با حرف غیر مشابه در هر ردیف، از نظر آماری تفاوت معنی داری دارند (P<۰/۰۵). تیماریک: شاهد (جیره پایه)، تیماردو: جیره پایه + ppm۴۰ مکمل زعفران. تیمارسه: جیره پایه + ppm۶۰ مکمل زعفران. تیمار چهار: جیره پایه + ppm۸۰ مکمل زعفران.

8. Hoshyar, R., S.Z. Bathaie and M. Sadeghizadeh. 2013. Crocin triggers the apoptosis through increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase activation in human gastric adenocarcinoma, AGS, cells. *DNA and cell biology* 32(2): 50-57.

9. Hosseini, A., B.M. Razavi. and H. Hosseinzadeh. 2018. Saffron (Crocus sativus) petal as a new pharmacological target: a review. *Iranian journal of basic medical sciences* 21(11): 1091.

10. Hosseini, S.M., M. Naghous. and S.H. Hoseinyan Bilondi. 2014. Effect of aqueous pennyroyal (Mentha pulegium) and saffron petals (Crocus sativus L.) extract on performance and meat quality in broiler. *Journal of Saffron Research* 2 (1): 1-14. (In Farsi).

11. Hosseinzadeh, H. 2014. Saffron: a herbal medicine of third millennium. *Jundishapur journal of natural pharmaceutical products* 9(1):1.

12. Hosseinzadeh, H., J. Behravan. M. Ramezani. and K. Ajgan. 2005. Anti-tumor and cytotoxic evaluation of Crocus sativus L. stigma and petal extracts using brine shrimp and potato disc assays. *Journal of Medicinal Plants* 4(15): 59-65.

13. HylineInternational. 2020. Available at: http://www.hyline.com/filesimages/Hy-Line-Products/Hy-Line-Product-PDFs/W-36/36%20COM%20ENG.pdf.(Copyright 2020).

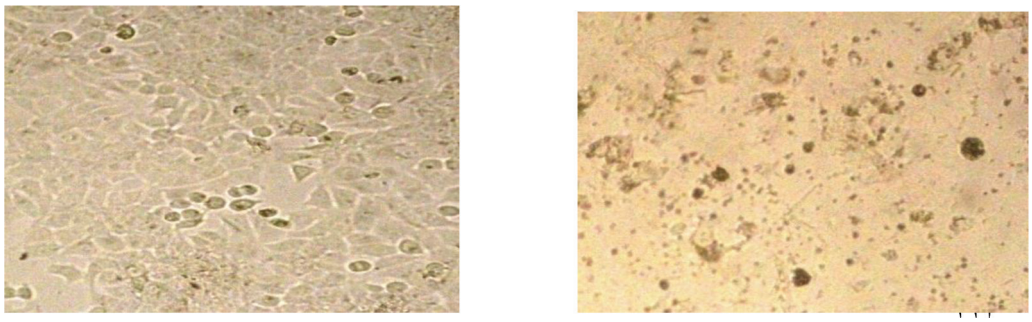
14. Jabbari Namroudi, M., M. Torki. and H. Mohammadi. 2021. Effect of adding different levels of saffron petals on productive performance, egg quality traits, and blood parameters of laying hens. *Animal Production Research* 10(1): 95-106.

15. Khorasany, A.R. and H. Hosseinzadeh. 2016. Therapeutic effects of saffron (Crocus sativus L.) in digestive disorders: a review. *Iranian journal of basic medical sciences* 19(5): 455-469.

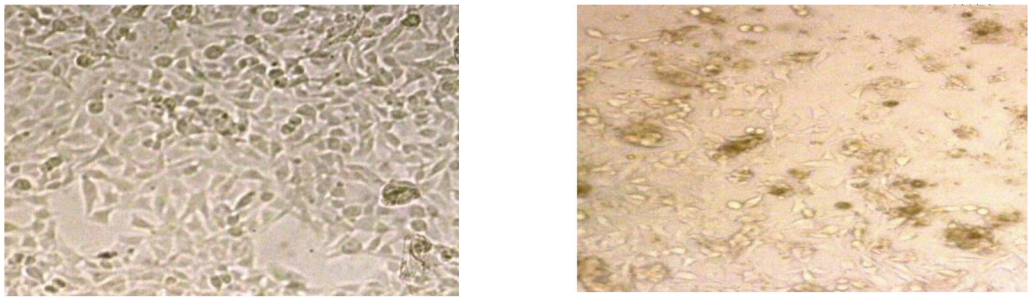
16. Lazic, S.E., C.J. Clarke-Williams and M.R. Munafò. 2018. What exactly is 'N'in cell culture and animal experiments?. *PLoS biology* 16(4): e2005282.

17. Lee, J. H. and Paik, H. D. 2019. Anticancer and immunomodulatory activity of egg proteins and peptides: A review. 98(12):6505-6516.

18. Mohajeri, S.A., H. Hosseinzadeh., F. Keyhanfar and J. Aghamohammadian. 2010. Extraction of crocin from saffron (Crocus sa-



شکل ۱- نگاره میکروسکوپی اثرات کاهنده رشد سلول سرطانی توسط زرده تخم مرغ تیمار چهار در غلظت ۵۰۰۰ µg/ml (تصویر سمت راست) در مقایسه با کنترل منفی (تصویر سمت چپ) در سلول‌های MCF-۷. این عکس ۷۲ ساعت پس از تیمار و دقایقی قبل از انجام MTT را نشان می‌دهد؛ جاییکه سلول‌ها با بافرPBS شسته شده‌اند.



شکل ۲- نگاره میکروسکوپی اثرات کاهنده رشد سلول سرطانی توسط زرده تخم مرغ تیمار چهار در غلظت ۵۰۰۰ µg/ml (تصویر سمت راست) در مقایسه با کنترل منفی (تصویر سمت چپ) در سلول‌های PC۳. این عکس ۷۲ ساعت پس از تیمار و دقایقی قبل از انجام MTT را نشان می‌دهد؛ جاییکه سلول‌ها با بافر PBS شسته شده‌اند.

tivus) using molecularly imprinted polymer solid□phase extraction. Journal of separation science 33(15): 2302-2309.
19. Oluwafemi, R.A., I. Olawale and J.O. Alagbe. 2020. Recent trends in the utilization of medicinal plants as growth promoters in poultry nutrition-A review. Research in: Agricultural and Veterinary Sciences 4(1):5-11.
20. Patil, K.D., S.B. Bagade. S.R. Sharma and K.V. Hatware. 2019. Potential of herbal constituents as new natural leads against helminthiasis: A neglected tropical disease. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 12(7): 291.
21. Qadir, S.,S. Bashir, and R. John.2020.Saffron—Immunity. pp.177-192, In: M. Sarwat and S. Sumaiya(ed.), Academic Press, Massachusetts.
22. Rezaeian, S. and H.R. Pourianfar. 2018. A comparative study on cytotoxicity and antiproliferative activities of crude extracts and fractions from Iranian wild-growing and cultivated Agaricus spp. Journal of Food Measurement and Characterization,12(4) 1-8.
23. Sun, Y., J. Yang. L.Z. Wang. L.R. Sunand and Q. Dong. 2014. Crocin attenuates cisplatin-induced liver injury in the mice. Human and experimental toxicology 33(8): 855-862.
24. Tarantilis, P., G. Tsoupras and M. Polissiou. 1995. Determination of saffron (Crocus sativus L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography UV-visible photodiode-arraydetection mass spectrometry. Journal of Chromatogrhy A 699(1-2): 107- 118.
25. Tavakkol-Afshari, J., A. Brook and S.H. Mousavi. 2008. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. Food and Chemical Toxicology 46(11): 3443-3447.
26. Zeka K., KC. Rupareli, MA. Continenza, D. Stagos and F. RR Vegliò.2015.Arroo Petals of Crocus sativus L. as a potential source of the antioxidants crocin and kaempferol. Fitoterapia 107:128-34.