

Transcriptomic analysis to identify genes and molecular pathways associated with the protective effect of saffron crocin against triptolide-induced hepatotoxicity

Hossein Naeemipour Younesi ^{1*}, Elham Behdani ², Mahdi Zia ³

1- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

ORCID: 0000-0003-4109-9142

2- Expert, Agricultural Jihad Organization of South Khorasan Province, Birjand, Iran.

ORCID: 0009-0008-9371-4905

3-Expert, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

ORCID: 0000-0002-8515-2497

* Email of corresponding author: hnaeimipour@birjand.ac.ir

Extended Abstract

Introduction: Triptolide (TP) possesses valuable therapeutic properties, including anti-inflammatory, immunosuppressive, anti-rheumatoid, and anticancer effects. However, its clinical application is severely limited by significant hepatotoxicity. Consequently, there is an urgent need to mitigate TP-related toxicity without compromising its therapeutic efficacy. Modern pharmacological studies on saffron and its primary constituents have revealed a wide range of biological activities, such as anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant, immunoregulatory, neuroprotective, cardioprotective, and anticancer effects, as well as protection against natural and chemical toxins. Crocin (CR), the main bioactive compound of saffron and a potent natural antioxidant, has demonstrated significant protective effects against liver injury. The aim of this study was to elucidate the molecular mechanisms underlying the protective effect of CR against TP-induced hepatotoxicity through the re-analysis of RNA-Seq data.

Materials and Methods: In this study, 12 male Kunming mice (body weight 20 ± 2 g) were used for the reanalysis of transcriptomic (RNA-Seq) data to investigate differential gene expression and identify key biological pathways involved in the attenuation of TP-induced hepatotoxicity following CR treatment. Mice were randomly divided into three groups (4 mice per group): a control group receiving normal saline (NC), a TP group receiving a moderate dose (300 μ g/kg; TP), and a group receiving TP (300 μ g/kg) combined with CR (100 mg/kg; TP+CR). All treatments were administered orally by gavage once daily for 7 consecutive days at a volume of 0.2 mL per 10 g body weight. At the end of the treatment period, liver tissues were collected, and total RNA was extracted. RNA quality and purity were evaluated using a NanoDrop spectrophotometer and agarose gel electrophoresis, respectively. To elucidate the molecular mechanisms of CR's protective effects, the publicly available RNA-Seq dataset (accession number GSE202175) from the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database was reanalyzed using the iDEP web-based analysis platform. Differential gene expression analysis was performed using the DESeq2 package through pairwise comparisons between treatment groups. During preprocessing, genes with low read counts were filtered based on a minimum of 0.5 counts per million (CPM) in at least one library. For gene clustering and principal component analysis (PCA), data were transformed as $\log_2(\text{CPM} + c)$ using the edgeR package, where the constant $c = 4$ was chosen as recommended by iDEP. A total of 55,487 genes were detected from 12 samples, of which 18,248 passed the filtering threshold. Among these, 18,121 genes were successfully mapped to Ensembl gene IDs, while the remaining 127 genes were retained in their original form for downstream analyses.

Results and Discussion: Differential gene expression analysis using DESeq2 and k-means clustering revealed that, out of 18,248 identified genes, 2,329 were upregulated and 2,261 were downregulated across comparisons. KEGG pathway enrichment analysis indicated significant enrichment in several pathways, including metabolic pathways, steroid hormone biosynthesis, retinol metabolism, chemical carcinogenesis–DNA adducts, arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism, drug metabolism–other enzymes, primary bile acid biosynthesis, xenobiotic metabolism by cytochrome P450, steroid biosynthesis, neutrophil extracellular trap (NET) formation, and systemic lupus erythematosus (SLE). Crocin stabilized and modulated pathways related to drug, toxin, and inflammatory mediator metabolism, thereby exerting a protective role against TP-induced hepatotoxicity and restoring hepatic cellular homeostasis toward a normal state.

Conclusion: By stabilizing and regulating the metabolic pathways of drugs, toxins, and inflammatory mediators, CR can exert a protective effect against TP-induced hepatotoxicity. The activation of these pathways reflects the body's attempt to restore biological homeostasis following exposure to TP. Overall, CR modulates the destructive activities of immune cells by targeting immune and anti-inflammatory pathways, thereby restoring the cellular status of the liver to a normal state. This targeted regulation of specific pathways may serve as the fundamental mechanism underlying the hepatoprotective effect of CR against TP-induced liver toxicity. Consequently, CR should be considered an effective strategy for reducing the adverse effects of toxic drugs, particularly TP.

Conflict of Interest: There are no conflicts of interest by the authors

Keywords: Crocin, Differential gene expression analysis, Liver, Toxicity, Triptolide.

آنالیز ترانسکریپتومی برای شناسایی ژن‌ها و مسیرهای مولکولی مرتبط با اثر محافظتی کروسین

زعفران بر سمیت کبدی ناشی از تریپتولید

حسین نعیمی پور یونسی^{*}، الهام بهدانی^۲، مهدی ضیاء^۳

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

ORCID: 0000-0003-4109-9142

۲- کارشناس سازمان جهاد کشاورزی استان خراسان جنوبی، بیرجند، ایران.

ORCID: 0009-0008-9371-4905

۳- کارشناس گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

ORCID: 0000-0002-8515-2497

*نویسنده مسئول حسین نعیمی پور یونسی hnaeimipour@birjand.ac.ir

چکیده

هدف این مطالعه، شناسایی ژن‌ها و سازوکارهای مولکولی اثر محافظتی کروسین در برابر سمیت کبدی تریپتولید، از طریق تحلیل مجدد داده‌های RNA-Seq با شماره دسترسی GSE202175 موجود در پایگاه NCBI با استفاده از نرم‌افزار تحت وب iDEP بود. در این آزمایش موش‌ها به‌طور تصادفی در سه گروه (با ۴ تکرار) تقسیم شدند: کنترل: سالین نرمال (NC)، دریافت کننده تریپتولید (۳۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم؛ TP) و دریافت کننده تریپتولید همراه کروسین (۳۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم همراه با کروسین ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم؛ CR + TP). تیمارها به مدت هفت روز به‌صورت گاوآژ خوراکی روزانه اعمال شدند. تحلیل بیان افتراقی ژن‌ها با روش DESeq2

و خوشه‌بندی **k-means**، نشان داد از مجموع ۱۸۲۴۸ ژن شناسایی شده، تعداد ژن‌های بیان متفاوت برای همه مقایسه‌ها، به ترتیب ۲۳۲۹ و ۲۲۶۱ ژن‌های با بیان بالا و پائین بودند. نتایج غنی‌سازی مسیرهای زیستی (**KEGG**) نشان داد که مسیرهای مرتبط با، مسیرهای متابولیکی، بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی، متابولیسم رتینول، سرطان‌زایی شیمیایی - اتصال مواد شیمیایی به **DNA**، متابولیسم اسید آراشیدونیک، متابولیسم اسید لینولئیک، متابولیسم داروها - سایر آنزیم‌ها، بیوسنتز اسیدهای صفراوی اولیه، متابولیسم ترکیبات خارجی (زنوبیوتیک‌ها) توسط سیتوکروم **P450**، بیوسنتز استروئیدها، تشکیل تله‌های خارج سلولی نوتروفیل (**NETs**)، لوپوس سیستمیک، به‌طور معناداری غنی‌سازی شده‌اند. کروسین با تثبیت و تنظیم مسیرهای متابولیسم دارو، سموم و واسطه‌های التهابی، نقش حفاظتی مؤثری در برابر سمیت کبدی تریپتولید ایفا می‌کند و وضعیت سلولی کبد را به حالت طبیعی نزدیک می‌کند. این یافته‌ها، شواهد ترانسکریپتومی اولیه‌ای از اثر محافظتی کروسین ارائه می‌دهند و پیشنهاد می‌کنند که بررسی بیشتر این ترکیب به‌عنوان یک راهکار کمکی در مدیریت سمیت دارویی، ارزشمند است.

واژه‌های کلیدی: تحلیل مسیرهای ژنی، تریپتولید، سمیت کبدی، کروسین

مقدمه

تریپتولید (**Triptolide**) یک دی‌ترین اپوکسید فعال زیستی است که از گیاه *Tripterygium wilfordii* Hook F استخراج می‌شود و دارای اثرات ضدالتهابی، ضدسرطانی و ایمنی سرکوب‌گر قوی است (**Yuan et al., 2019**). با وجود خواص درمانی قابل توجه، استفاده بالینی از تریپتولید به دلیل سمیت شدید آن به‌ویژه در کبد و کلیه‌ها محدود شده است (**Hu et al., 2022**). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که سمیت کبدی ناشی از تریپتولید با افزایش تنش اکسیداتیو، القای آپوپتوز سلول‌های کبدی، اختلال در عملکرد میتوکندری و فعال‌سازی مسیرهای التهابی مانند **NF-κB** و **MAPK** مرتبط است (**Shen et al., 2023**). با این حال، **TP** بسیار سمی است، حلالیت کمی در آب دارد و عوارض جانبی قابل توجهی ایجاد می‌کند که این موارد استفاده بالینی آن را محدود می‌سازد. بنابراین، نیاز فوری به کاهش سمیت مرتبط با **TP** بدون اثر بر قدرت درمانی آن وجود دارد. برای این منظور، راهبردهای متعددی از جمله طراحی شکل‌های دارویی جدید، اصلاحات ساختاری و ترکیب آن با سایر گیاهان دارویی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (**Zeng et al., 2020; Zhang et al., 2020; Yalikong et al., 2021**).

مطالعات فارماکولوژیک مدرن بر روی زعفران و ترکیبات اصلی آن، طیف وسیعی از آثار زیستی را آشکار کرده‌اند: از جمله اثرات ضد التهابی، ضد درد، آنتی‌اکسیدانی، تنظیم‌کننده سیستم ایمنی، نقش در بیماری‌های عصبی تخریبی و قلبی-عروقی، ضد سرطان، ضد آرتریت، ضد افسردگی و محافظت در برابر سموم طبیعی و شیمیایی (**Attia et al., 2021; Ali, 2024; Xing et al., 2021; Hosseinzadeh & Moudi, 2022**). کروسین (**Crocin**)، که به شکل مونو و دی‌گلیکوزید استرهای یک اسید دی‌کربوکسیلیک پلی‌ان وجود دارد، از جمله ترکیبات فعال اصلی کاروتنوئیدی زعفران (*Crocus sativus* L) است که آثار درمانی آن را رقم می‌زنند (**Abdi et al., 2022; Salem et al., 2022; Xu et al., 2022**). کروسین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی قوی شناخته می‌شود که اثرات محافظتی آن در برابر آسیب‌های بافتی ناشی از تنش اکسیداتیو به خوبی مستند شده است (**Anaeigoudari, 2021**). شواهد تجربی نشان می‌دهد که کروسین می‌تواند از طریق فعال‌سازی مسیر **Nrf2/HO-1** و مهار مسیر **NF-κB**، موجب کاهش التهاب و مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده در سلول‌های کبدی شود (**Chen et al., 2021**).

با توجه به اثرات متقابل احتمالی بین تریپتولید و کروسین، بررسی تغییرات الگوی بیان ژن‌ها در سطح mRNA می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد مسیرهای مولکولی مؤثر در کاهش سمیت کبدی ناشی از تریپتولید فراهم سازد (Zhan et al., 2019). تحلیل داده‌های ترنسکرپتومی با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی قادر است مسیرهای سیگنالینگ، ژن‌های کلیدی و شبکه‌های تنظیمی را که در اثر درمان ترکیبی تغییر یافته‌اند، شناسایی کند (Zhan et al., 2019). نرم‌افزار تحت وب iDEP (integrated Differential Expression and Pathway analysis) یکی از ابزارهای کارآمد و کاربرپسند برای تحلیل داده‌های RNA-seq است که امکان شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی، خوشه‌بندی، تحلیل غنی‌سازی مسیرها (GO و KEGG) و مصورسازی نتایج را بدون نیاز به برنامه‌نویسی فراهم می‌کند (Ge et al., 2018). هدف از این مطالعه، تحلیل مجدد داده‌های ترنسکرپتومی (RNA-Seq) جهت آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها و شناسایی مسیرهای زیستی کلیدی مؤثر در کاهش سمیت کبدی القا شده توسط تریپتولید، در حضور کروسین زعفران، با استفاده از نرم‌افزار تحت وب iDEP بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از داده‌های حاصل از پژوهش یان و همکاران (Yan et al., 2022) استفاده شد که در آن موش‌های نر نژاد Kunming (وزن 20 ± 2 گرم) برای بررسی اثر ترکیب تریپتولید (TP) و کروسین (CR) مورد استفاده قرار گرفتند. در این آزمایش موش‌ها به صورت تصادفی در سه گروه (هر گروه چهار موش) تقسیم شدند: گروه A: سالی‌ن نرمال (گروه کنترل؛ NC)، گروه B: تریپتولید با دوز متوسط (۳۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم؛ TP) و گروه C: تریپتولید با دوز متوسط (۳۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم) همراه با کروسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم؛ TP+CR). تیمار به مدت ۷ روز به صورت گاوژ خوراکی یک بار در روز و با حجم ۰/۲ میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰ گرم وزن بدن انجام شده است. در پایان دوره تیمار، نمونه‌های کبد جمع‌آوری و RNA از بافت آنها استخراج گردید.

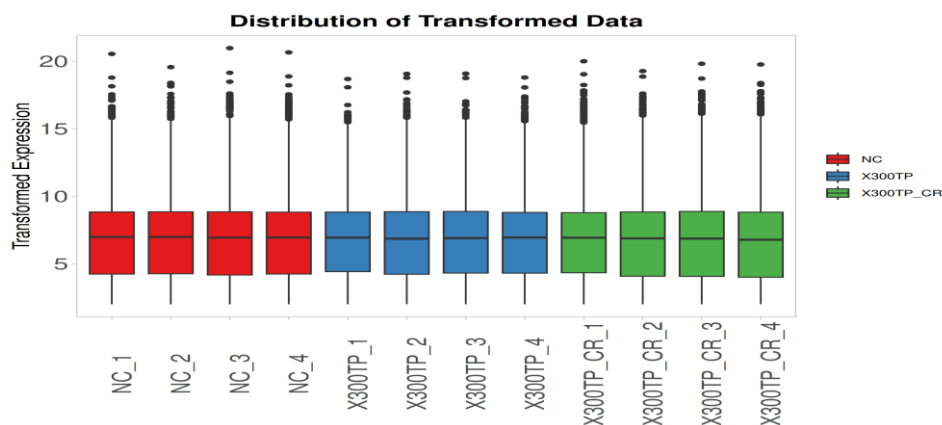
ساخت کتابخانه، mRNA-seq و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی توسط شرکت Sinotech Genomics (شانگهای، چین) انجام گرفت (Yan et al., 2022). روند کلی کار به شرح زیر بود: استخراج و بررسی کیفیت RNA، غنی‌سازی mRNA و سنتز رشته مکمل، خالص‌سازی cDNA، ترمیم انتهاها، افزودن دم A (A-tailing) و اتصال آداپتورهای توالی‌یابی، غنی‌سازی به روش PCR و ساخت کتابخانه. برای توالی‌یابی RNA از دستگاه Illumina NovaSeq 6000 (ایالات متحده) استفاده گردید (Yan et al., 2022). داده‌های خام (raw reads) تصفیه شده و توالی‌های نامرغوب حذف شدند، سپس خوانش‌های باکیفیت (clean reads) با استفاده از نرم‌افزار Hisat2 (نسخه ۲.۰.۵) روی ژنوم مرجع نقشه‌گذاری شدند. میزان فراوانی ژن‌ها به صورت FPKM (تعداد قطعه به ازای هر کیلو باز از اگزون در هر یک میلیون قطعه نقشه‌شده) بیان گردید. از نرم‌افزار Stringtie برای شمارش قطعات درون هر ژن و از الگوریتم TMM برای نرمال‌سازی استفاده شد (Yan et al., 2022).

بر اساس استانداردهای رایج RNA-Seq و استناد به برخی مقالات که حداقل سه تکرار زیستی را برای توان آماری کافی ضروری می‌دانند در این پژوهش از چهار تکرار استفاده شد (Lin et al., 2016). کیفیت و خلوص RNA با استفاده از نانودراپ و ژل الکتروفورز ارزیابی شد. شناسایی مکانیسم‌های مولکولی اثر محافظتی کروسین در برابر سمیت کبدی تریپتولید، از طریق تحلیل مجدد داده‌های RNA-Seq با شماره دسترسی GSE202175 موجود در پایگاه NCBI، با استفاده از نرم‌افزار تحت وب iDEP انجام شد. آنالیز بیان افتراقی با استفاده از روش DESeq2 انجام شد و برای کنترل نرخ کشف اشتباه در آزمون‌های چندگانه، روش Benjamini-Hochberg (BH) با آستانه $FDR < 0.05$ به کار گرفته شد (Love et al., 2014). داده‌های مورد استفاده در مرحله پیش پردازش فیلتر کردن ژن‌های با خوانش کم به صورت پیش فرض حداقل ۵/۰ خوانش در میلیون^۱ (Counts Per Million-CPM) حداقل در یک کتابخانه، انجام شد و در مرحله بعد تبدیل داده‌ها $(\log_2(CPM + c))$ برای خوشه‌بندی و آنالیز PCA با استفاده از بسته edgeR انجام شد (Dai et al., 2014). به صورت پیش فرض $c = 4$ در نظر گرفته شد (Ge et al., 2018). در مجموع ۵۵۴۸۷ ژن از ۱۲ نمونه استخراج و ۱۸۲۴۸ ژن از فیلتر عبور کردند و ۱۸۱۲۱ ژن در پایگاه داده به شناسه ژن Ensembl تبدیل شدند. باقی‌مانده یعنی ۱۲۷ ژن به صورت اصلی استفاده شدند. برای شناسایی نواحی ژنومی که در آن‌ها تجمع معنی‌داری از ژن‌های با بیان افزایش‌یافته (up-regulated) یا کاهش‌یافته (down-regulated) از بسته PREDA استفاده شد (Ferrari et al., 2011) که بر اساس تحلیل رگرسیون می‌تواند نواحی کروموزومی معنادار از نظر آماری را شناسایی کند (Ge et al., 2018). برای بررسی ارتباطات عملکردی بین ژن‌های با بیان افتراقی، یک شبکه برهم‌کنش ژنی-پروتئینی (Protein-Protein Interaction Network) ایجاد شد. ابتدا فهرست ژن‌های با بیان افتراقی به پایگاه داده STRING وارد شد تا برهم‌کنش‌های شناخته‌شده و پیش‌بینی‌شده بین پروتئین‌ها استخراج شود. سپس شبکه حاصل با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape ترسیم و تحلیل گردید (Ge et al., 2018).

نتایج و بحث

شکل ۱ توزیع داده‌های تبدیل لگاریتمی شده را نشان می‌دهد که واریانس وابسته به میانگین کاهش می‌یابد.

¹ Counts Per Million



شکل ۱: توزیع داده‌های تبدیل لگاریتمی شده
Figure 1. Distribution of log transformed data

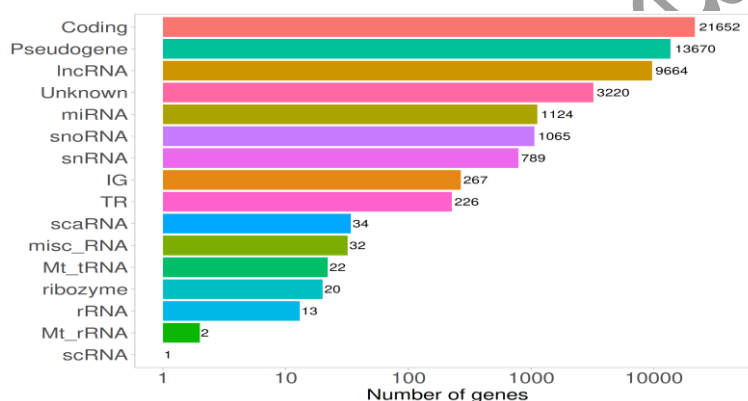
در مرحله پیش پردازش، فیلتر کردن ژن‌های با خوانش کم، براساس آستانه پیش فرض حداقل $5/CPM$ در یک کتابخانه صورت می‌پذیرد. نمونه‌ها، تعداد کل خوانش، تعداد کل خوانش بعد از فیلتر کردن و خوانش‌های فیلتر شده در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. نمونه‌ها، کل خوانش‌ها و خوانش‌های فیلتر شده

Table 1. Samples, total count, and filtered reads

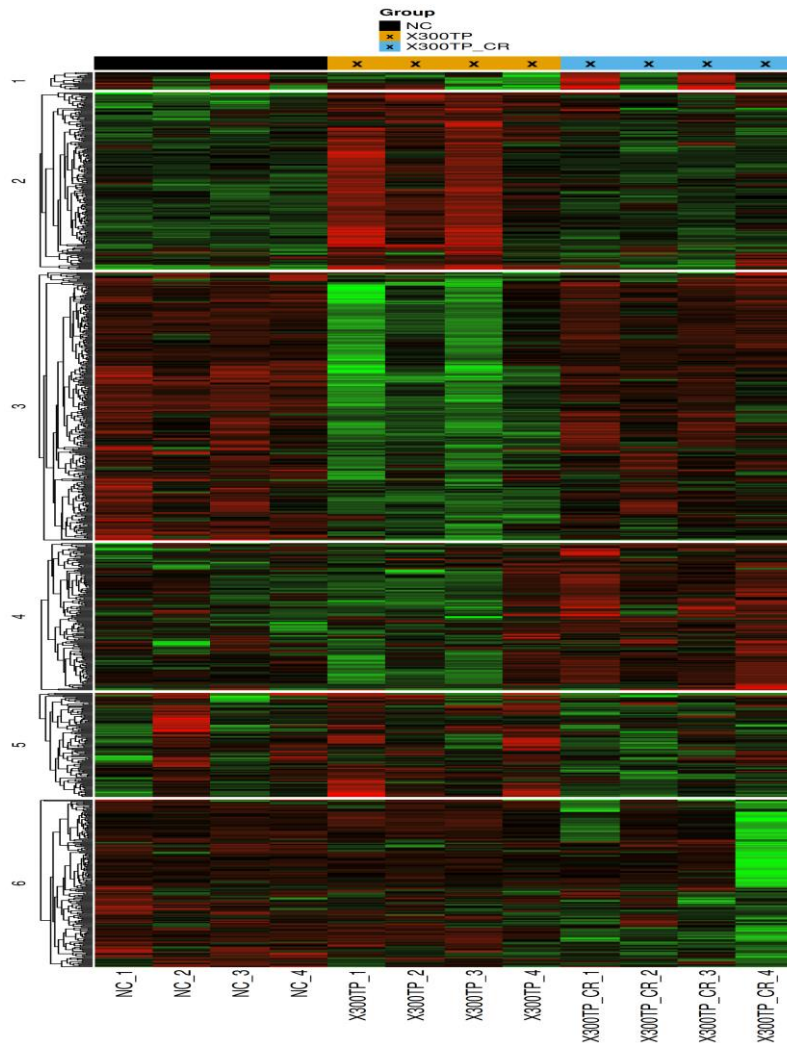
Sample	Total counts	Total counts after filter	Counts removed
NC_1	18,430,566	18,423,834	6,732
NC_2	16,455,979	16,449,596	6,383
NC_3	16,869,075	16,864,005	5,070
NC_4	15,623,775	15,618,380	5,395
X300TP_1	16,097,173	16,082,133	15,040
X300TP_2	15,655,910	15,648,707	7,203
X300TP_3	17,861,445	17,848,621	12,824
X300TP_4	17,343,289	17,335,577	7,712
X300TP_CR_1	16,243,496	16,235,573	7,923
X300TP_CR_2	15,509,226	15,503,619	5,607
X300TP_CR_3	17,915,632	17,910,005	5,627
X300TP_CR_4	16,912,326	16,907,638	4,688

شکل ۲ توزیع فراوانی انواع مختلف ژن‌ها را در ژنوم ترسیم کرده است. بر اساس این نمودار، ژن‌های کدکننده پروتئین با تعداد ۲۱۶۵۲ بیشترین سهم را در میان ژن‌های شناسایی شده دارند. علاوه بر این، تعداد قابل توجهی از عناصر غیرکدکننده نیز در ژنوم وجود دارد که شامل شبه‌ژن‌ها (۱۳۶۷۰) و RNA های بلند غیرکدکننده (lncRNA) با تعداد ۹۶۶۴ مورد مشاهده شد که نشان‌دهنده پیچیدگی تنظیم بیان ژن‌ها در سطح ژنومی است. همچنین RNA های کوچک غیرکدکننده مانند miRNA (1124)، snoRNA (1065) و snRNA (789) مشاهده می‌شوند که نقش مهمی در تنظیم پسارونویسی ژن‌ها و فرایندهای پردازش RNA ایفا می‌کنند. سایر دسته‌ها مانند ژن‌های ایمونوگلوبولین (Ig)، گیرنده سلول‌های T (TR) و RNA های میتوکندریایی با تعداد کمتر نیز حضور دارند، اما در عملکردهای تخصصی سلولی نقش اساسی دارند. در مجموع، این توزیع نشان می‌دهد که اگرچه ژن‌های کدکننده پروتئین بخش عمده ژن‌ها را تشکیل می‌دهند، بخش قابل توجهی از ژنوم شامل RNA های غیرکدکننده‌ای است که در تنظیم فعالیت‌های سلولی و بیان ژن‌ها نقش مهمی دارند.



شکل ۲: نمودار میله‌ای توزیع انواع ژن‌ها در ژنوم

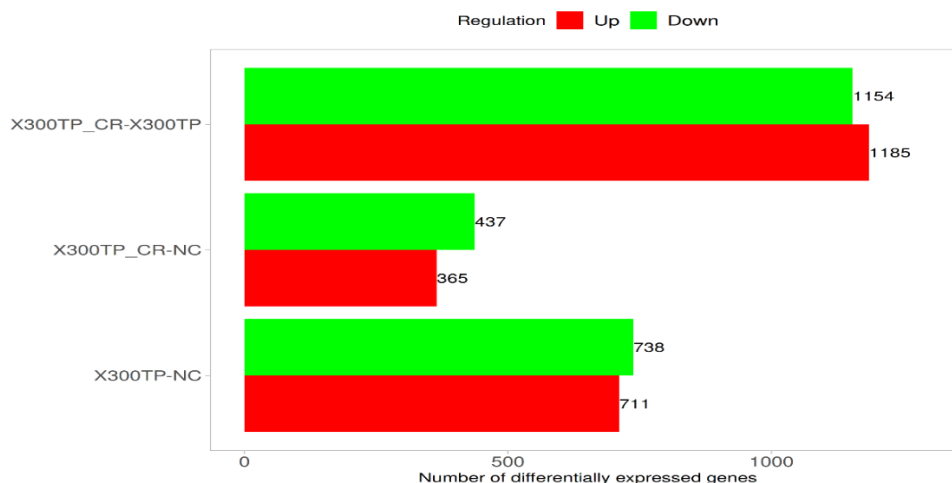
Figure 2: Bar chart showing distribution of different gene types in the genome



شکل ۳: نقشه حرارتی ژن‌های با بیان متفاوت در گروه‌های مورد مطالعه
 Figure 3: Heatmap of differentially expressed genes across the studied groups

نقشه حرارتی شکل ۳، الگوی بیان ژن‌ها را در گروه‌های مختلف مطالعه نشان می‌دهد. در این نقشه، نمونه‌ها در ستون‌ها و ژن‌ها در ردیف‌ها قرار دارند و شدت رنگ هر سلول نشان‌دهنده سطح بیان ژن است. رنگ سبز نشان‌دهنده کاهش بیان، رنگ قرمز افزایش بیان و رنگ سیاه عدم تغییر در بیان ژن می‌باشد. از مجموع ۵۵۴۸۷ ژن که از ۱۲ نمونه استخراج شد، ۱۸۲۴۸ ژن از فیلتر عبور کردند. در تحلیل بیان افتراقی ژن‌ها، بیشترین تغییرات بیان ژنی در مقایسه گروه تریپتولید همراه با کروسین (X300TP_CR) با گروه تریپتولید (X300TP) مشاهده شد (۲۳۳۹ ژن، شامل ۱۱۵۴ ژن افزایشی و ۱۱۸۵ ژن کاهش‌ی). که احتمالاً می‌تواند بیانگر تأثیر گسترده کروسین بر بازآرایی بیان ژن‌ها و بازگشت نسبی آن‌ها به حالت طبیعی، باشد (شکل ۴). در مقایسه گروه تریپتولید (X300TP) با گروه کنترل (NC) نیز ۱۴۴۹ ژن با بیان متفاوت شناسایی شد (۷۳۸ افزایشی و ۷۱۱ کاهش‌ی)، که احتمالاً می‌تواند منعکس‌کننده اثرات سمی تریپتولید بر الگوی بیان ژن‌ها، باشد. در حالی که در مقایسه گروه تریپتولید همراه با کروسین (X300TP_CR) با گروه کنترل (NC) تعداد ژن‌های تغییر یافته به‌طور قابل توجهی کمتر بود (۸۰۲ ژن)، که ممکن است نشان‌دهنده کاهش آسیب و بازگشت نسبی تعادل در بیان ژن‌ها در حضور کروسین باشد. یان و همکاران

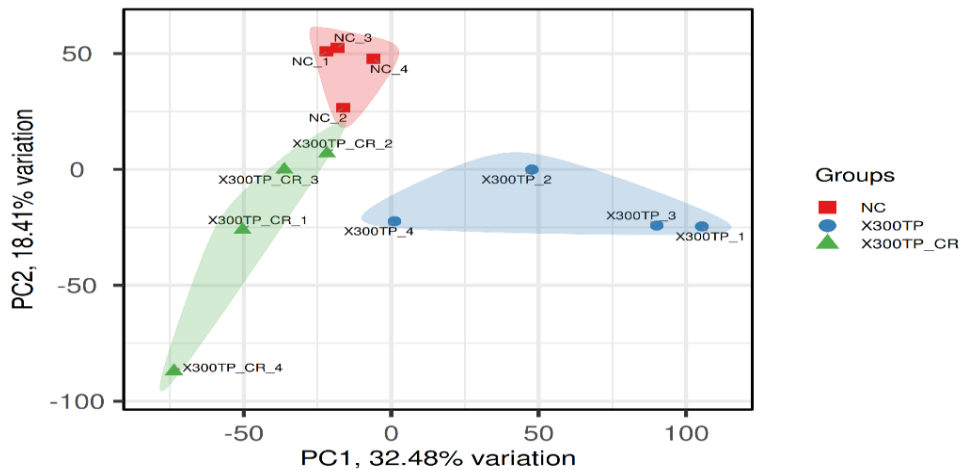
(Yan et al., 2022) گزارش کردند در مقایسه گروه تریپتولید (X300TP) با گروه کنترل (NC) ۱۱۴۸ mRNA و در مقایسه گروه تریپتولید همراه با کروسین (X300TP_CR) با گروه تریپتولید (X300TP) ۱۵۲۶ mRNA با بیان متفاوت شناسایی شدند که از نتایج این تحقیق کمتر بود. تفاوت نتایج ما با مطالعه مرجع احتمالاً ناشی از آستانه سختگیرانه‌تر تغییر بیان و تفاوت در روش‌های آماری باشد.



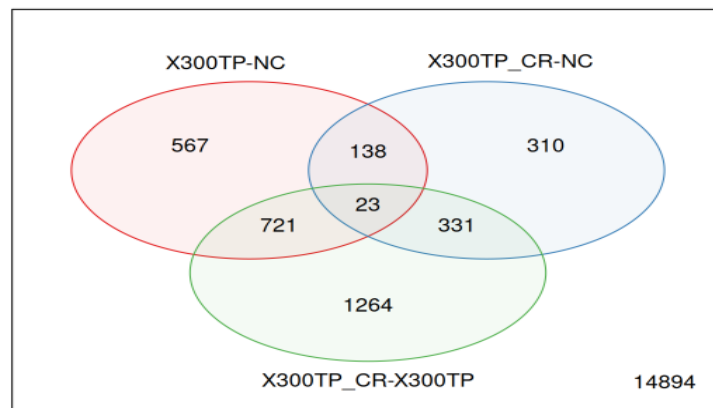
شکل ۴: ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) شناسایی شده توسط DESeq2 در مقایسه‌های بین تیمارها (کنترل، تریپتولید و تریپتولید همراه با کروسین)

Figure 4: Differentially expressed genes (DEGs) identified by DESeq2 in comparisons between treatments (control (NC), tripotide (X300TP), and tripotide plus crocin (X300TP_CR) groups)

نمودار آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA) انجام شده بر داده‌های بیان ژنی (شکل ۵)، نشان داد نمونه‌های هر گروه عمدتاً در فضای اختصاصی خود (در ابعاد PC1 و PC2) خوشه‌بندی شده‌اند و محور اول (PC1) و محور دوم (PC2) در مجموع ۵۰/۸۹ درصد از واریانس کل داده‌ها را پوشش می‌دهند. تمایز واضحی میان سه گروه آزمایشی کنترل (NC)، تریپتولید (X300TP) و تریپتولید همراه با کروسین (X300TP_CR) مشاهده شد. این جداسازی نشان می‌دهد بیان ژنی هر گروه مشخصاً با گروه‌های دیگر متفاوت است و اثر تیمارها (به ویژه اثر حفاظتی کروسین) روی الگوی بیان ژن کاملاً مشهود می‌باشد. گروه X300TP_CR نسبت به X300TP به سمت گروه کنترل نزدیک‌تر است که نشان می‌دهد احتمالاً کروسین توانسته بیان ژنی مربوط به سلامت طبیعی را تا حدی بازیابی کند یا به حالت نرمال نزدیک نماید. این یافته با گزارش هو و همکاران (Hu et al., 2022) همسو بوده است.



شکل ۵: آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA) برای تیمارهای مورد مطالعه (کنترل، تریپتولید و تریپتولید همراه با کروسین)
 Figure 5: Principal Component Analysis (PCA) for the studied treatments (Control: NC, triptotide: X300TP, and triptotide plus crocin: X300TP_CR)



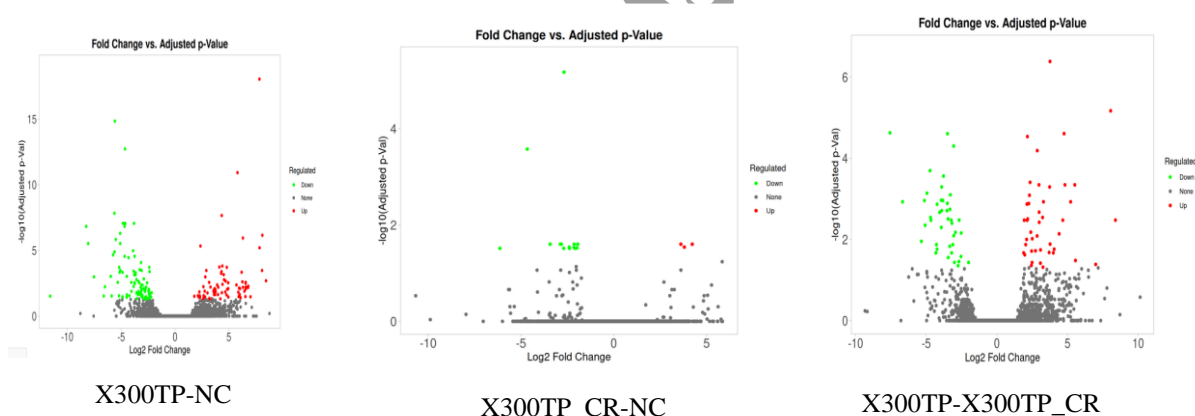
شکل ۶: ون دیاگرام تعداد mRNA های با بیان متفاوت بین تیمارهای مورد مطالعه (کنترل، تریپتولید و تریپتولید همراه با کروسین)

Figure 6: Venn diagram showing the number of differently expressed mRNAs between the studied treatments (Control: NC, triptotide: X300TP, and triptotide plus crocin: X300TP_CR)

شکل ۶ ون دیاگرام تعداد mRNA های با بیان متفاوت را نشان می‌دهد. در مقایسه‌ی گروه تریپتولید با گروه کنترل (X300TP vs NC) تعداد ۷۲۱ mRNA منحصراً تفاوت بیان داشتند، در حالی که در مقایسه‌ی گروه تریپتولید همراه با کروسین با گروه کنترل (X300TP_CR vs NC)، تعداد ۵۶۷ mRNA منحصراً به فرد بودند. از سوی دیگر، در مقایسه‌ی بین گروه تریپتولید همراه با کروسین با گروه تریپتولید (X300TP_CR vs X300TP)، تعداد ۱۲۶۴ mRNA منحصراً تفاوت بیان نشان دادند که بیانگر تغییرات قابل توجه در پاسخ ترنسکریپتومی در حضور کروسین است. علاوه بر این، ۳۳۱ mRNA به‌طور مشترک بین دو مقایسه‌ی X300TP vs NC و X300TP_CR vs NC تفاوت بیان داشتند، در حالی که ۳۱۰ mRNA بین مقایسه‌های X300TP vs NC و X300TP_CR vs X300TP مشترک بودند. همچنین ۱۳۸ mRNA بین مقایسه‌های X300TP_CR vs X300TP و X300TP vs NC

X300TP_CR vs X300TP و vs NC همپوشانی داشتند. در نهایت، ۲۳ mRNA در هر سه مقایسه به طور مشترک تفاوت بیان داشتند که علیرغم اثر محافظتی کروسین، هنوز به طور کامل به سطح کنترل بازنگشته‌اند و ممکن است اهداف بالقوه برای استراتژی‌های درمانی تکمیلی باشند. این تفاوت‌ها و تغییرات ممکن است با تعدیل مسیرهای زیستی مرتبط با پاسخ‌های التهابی، استرس اکسیداتیو و متابولیسم دارو در حضور کروسین مرتبط باشند. در یک تحقیق گزارش شده است که ترکیب تریپتولید و کروسین موجب شناسایی ۷۶ ژن با بیان افتراقی در بافت کبد شد (Yan et al., 2022). در تحقیق آنها به جای مقایسه X300TP_CR vs NC از پایگاه‌های داده (GeneCards و DisGeNet) برای شناسایی ژن‌های مرتبط با سمیت کبدی استفاده کردند که با نتایج این تحقیق مغایرت داشت.

شکل ۷، نمودار ولکانو (آتشفشانی) mRNA های با بیان متفاوت را در سه گروه نشان می‌دهد: (۱) مقایسه تریپتولید با کنترل (X300TP vs NC)، مقایسه تریپتولید همراه با کروسین با کنترل (X300TP_CR vs NC)، مقایسه تریپتولید و تریپتولید+کروسین (X300TP vs X300TP_CR). ژن‌های دارای بیان متفاوت بر اساس معیارهای نرخ کشف خطا کمتر از ۰/۰۵ ($FDR < 0.05$) و تغییر بیان بیشتر از دو برابر ($Fold-change > 2$)، شناسایی شدند.



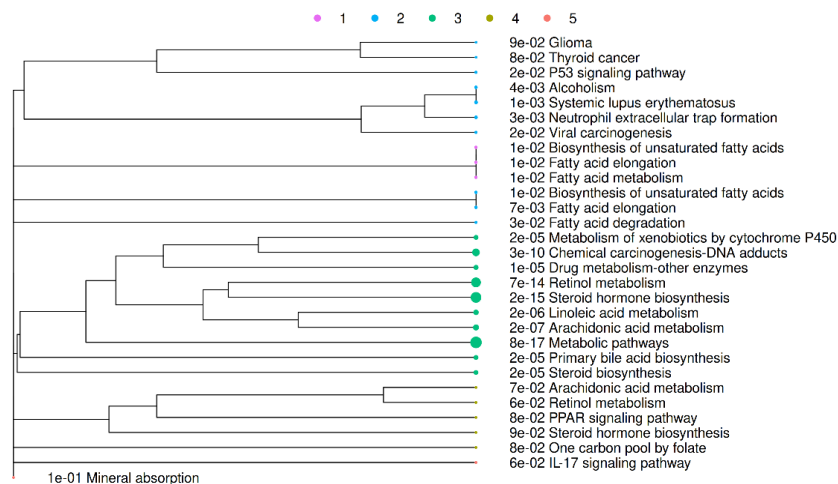
شکل ۷: نقشه‌های ولکانو ژن‌های با بیان متفاوت (بیان کاهش‌یافته و افزایش یافته) بین گروه‌ها

Figure 7: Volcano maps of differentially expressed mRNAs (downregulated and upregulate) between groups تحلیل غنی‌سازی مسیرهای زیستی و خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی در شکل ۸ نشان داده شده است. در این تحلیل، مسیرهای زیستی غنی‌شده ابتدا بر اساس شباهت عملکردی با استفاده از روش خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی (hierarchical clustering) سازمان‌دهی شدند و سپس با الگوریتم K-means در پنج خوشه عملکردی گروه‌بندی شدند.

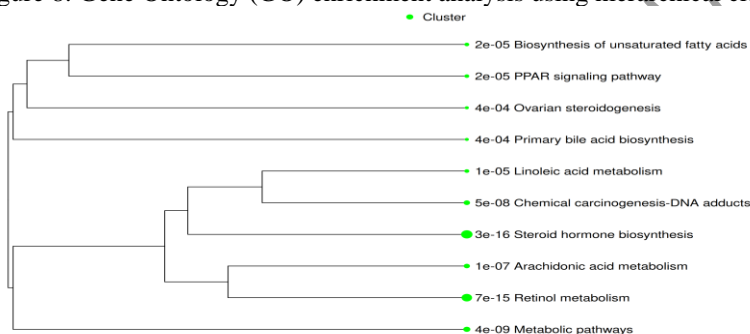
نتایج نشان داد که بخش قابل توجهی از مسیرهای غنی‌شده در خوشه‌های مرتبط با متابولیسم لیپیدها، متابولیسم دارو و سم‌زدایی کبدی قرار دارند. در میان مسیرهای غنی‌شده، مسیرهای Metabolic pathways، Metabolism of xenobiotics، Steroid hormone، Retinol metabolism، Drug metabolism-other enzymes، by cytochrome P450

Primary و Linoleic acid metabolism, Arachidonic acid metabolism, Steroid biosynthesis, biosynthesis bile acid biosynthesis مشاهده شد که نشان‌دهنده تغییرات گسترده در فرآیندهای متابولیکی و سیستم‌های سم‌زدایی کبد است. همچنین مسیرهای مرتبط با پاسخ‌های ایمنی و التهابی از جمله Neutrophil extracellular trap formation (NETs)، Systemic lupus erythematosus (SLE) و IL-17 signaling pathway نیز در میان مسیرهای غنی‌شده قرار داشتند که می‌تواند بیانگر نقش پاسخ‌های ایمنی و التهاب در سمیت کبدی القا شده توسط تریپتولید باشد. علاوه بر این، مسیرهای مرتبط با متابولیسم اسیدهای چرب شامل Fatty acid metabolism، Fatty acid elongation، Fatty acid degradation و Biosynthesis of unsaturated fatty acids نیز در خوشه‌های مجزا مشاهده شدند که می‌تواند نشان‌دهنده اختلال در هموستاز لیپیدی در بافت کبد است. به طور کلی، الگوی خوشه‌بندی مسیرهای غنی‌شده نشان می‌دهد که ژن‌های با بیان افتراقی عمدتاً در مسیرهای مرتبط با متابولیسم، سم‌زدایی وابسته به CYP450، متابولیسم لیپیدها و پاسخ‌های ایمنی/التهابی احتمالاً درگیر هستند که همگی از فرآیندهای کلیدی در بروز و تعدیل سمیت کبدی محسوب می‌شوند. این نتایج نشان می‌دهد که کروسین احتمالاً از طریق تنظیم این مسیرهای متابولیکی و کاهش پاسخ‌های التهابی و استرس اکسیداتیو در کاهش آسیب کبدی القا شده توسط تریپتولید نقش دارد.

یافته‌های این تحقیق با گزارش‌های پیشین هم‌خوانی دارد که نقش TP را در سرکوب Nrf2 و القای آپوپتوز از طریق استرس اکسیداتیو نشان داده‌اند، در حالی که CR با فعال‌سازی مسیرهای PI3K-Akt/Nrf2 و مهار MAPK از آسیب کبدی می‌کاهد و فرآیندهای متابولیکی و سم‌زدایی (به‌ویژه مسیرهای CYP450 و گلوکوتایون) را به حالت طبیعی باز می‌گرداند. به طور کلی، اثر محافظتی کروسین در کاهش سمیت کبدی تریپتولید از طریق تنظیم دوگانه مسیرهای سیگنالینگ بقا و کاهش استرس اکسیداتیو تأیید می‌شود (Guo et al., 2024; Hassani et al., 2017). تجزیه و تحلیل KEGG نشان داد که mRNA های دارای بیان افتراقی مرتبط با سمیت کبدی، عمدتاً در مسیرهای آبشارهای کمپلمان و انعقاد خون، مسیر سیگنالینگ p53، متابولیسم گلوکوتایون، مسیر سیگنالینگ IL-17 و متابولیسم داروها - سیتوکروم P450 غنی‌سازی شده بودند (Yan et al., 2022). یافته‌های حاصل از مطالعه رمندی و همکاران (Ramandi et al., 2022) نشان‌دهنده تأثیر انعقادی عصاره آبی پوشال زعفران بود که می‌تواند در جهت کاربرد بالینی بهینه زعفران و نیز در انجام پژوهش‌های تکمیلی در این زمینه کمک کننده باشد که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت.



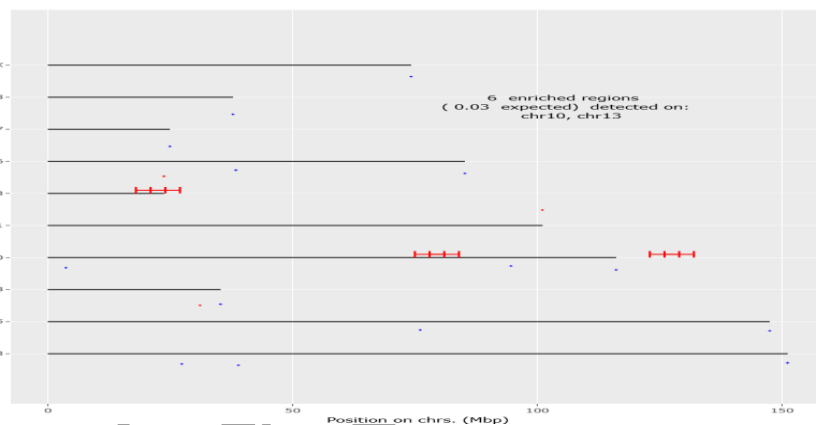
شکل ۸: تحلیل غنی‌سازی ژن‌آنتولوژی با استفاده از خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی
Figure 8: Gene Ontology (GO) enrichment analysis using hierarchical clustering



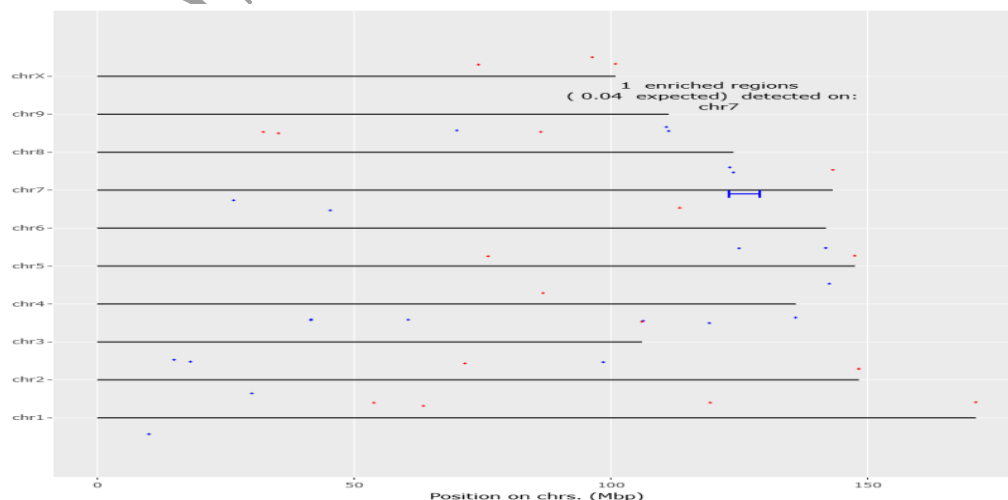
شکل ۹: تحلیل غنی‌سازی مسیرهای KEGG برای ژن‌های انتخاب‌شده در تحلیل WGCNA
Figure 9: KEGG pathway enrichment analysis for the selected genes in the WGCNA analysis

نتایج تحلیل غنی‌سازی مسیرهای KEGG برای ژن‌های انتخاب‌شده از ماژول‌های کلیدی در تحلیل Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA) در شکل ۹ نشان داده شده است. این تحلیل نشان داد که ژن‌های منتخب به طور معنی‌داری در چندین مسیر متابولیکی و سیگنال‌دهی غنی‌سازی شده‌اند. مهم‌ترین مسیرهای شناسایی‌شده شامل Linoleic acid metabolism, Arachidonic acid metabolism, Retinol metabolism, Metabolic pathways, Steroid hormone biosynthesis, Primary bile acid biosynthesis, Ovarian steroidogenesis, PPAR signaling pathway, و Biosynthesis of unsaturated fatty acids بودند. علاوه بر این، مسیر Chemical carcinogenesis-DNA adducts نیز در میان مسیرهای غنی‌شده مشاهده شد. خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی مسیرهای غنی‌شده نشان داد که بیشتر این مسیرها در چند گروه عملکردی مرتبط با متابولیسم لیپیدها، بیوسنتز استروئیدها، متابولیسم رتینوئیدها و تنظیم متابولیسم کبدی قرار می‌گیرند. حضور مسیرهایی مانند PPAR signaling pathway و Biosynthesis of unsaturated fatty acids می‌تواند نشان‌دهنده نقش مهم تنظیم متابولیسم لیپیدها و تعادل انرژی سلولی در شبکه ژنی شناسایی‌شده باشد. همچنین مسیرهای Retinol metabolism و Primary bile acid biosynthesis که از فرآیندهای

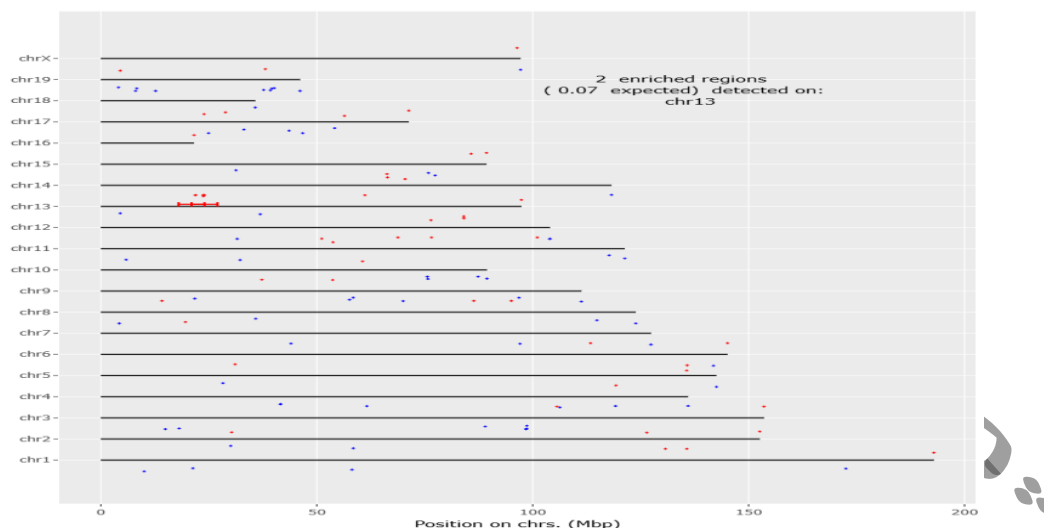
کلیدی عملکرد کبد محسوب می‌شوند، نشان می‌دهند که ژن‌های شناسایی شده در WGCNA احتمالاً به طور مستقیم با تنظیم عملکرد متابولیکی و سم‌زدایی کبد مرتبط هستند. در مجموع، نتایج تحلیل KEGG نشان می‌دهد که ژن‌های کلیدی استخراج شده از شبکه هم‌بیانی عمدتاً در مسیرهای مرتبط با متابولیسم لیپیدها، تنظیم هورمون‌های استروئیدی و فرآیندهای متابولیکی کبد درگیر هستند که می‌تواند در درک سازوکارهای مولکولی مرتبط با پاسخ کبد به تیمارهای آزمایشی نقش مهمی داشته باشد. همپوشانی نتایج حاصل از KEGG enrichment، GO analysis و clustering نشان می‌دهد که شبکه ژنی شناسایی شده عمدتاً در تنظیم مسیرهای متابولیکی، به‌ویژه متابولیسم لیپیدها و فرآیندهای سم‌زدایی کبدی ممکن است نقش داشته باشد. اشکال ۱۰، ۱۱ و ۱۲ مربوط به مقایسات زوجی گروه‌های مختلف است که در آن‌ها از نرخ کشف خطا کمتر از ۰/۰۵ (FDR < 0.05) و تغییر بیان بیشتر از دو برابر (Fold-change > 2) برای تشخیص جایگاه‌های ژنومیک غنی شده روی کروموزوم استفاده شد.



شکل ۱۰: مقایسه تغییرات بیان ژن در کروموزوم‌ها بین گروه کنترل و گروه تریپتولید همراه با کروسین
 Figure 10: Comparison of gene expression changes on chromosomes between control group and triptolide plus crocin group



شکل ۱۱: مقایسه تغییرات بیان ژن در کروموزوم‌ها بین گروه کنترل و گروه تریپتولید
 Figure 11: Comparison of gene expression changes on chromosomes between control group and triptolide group

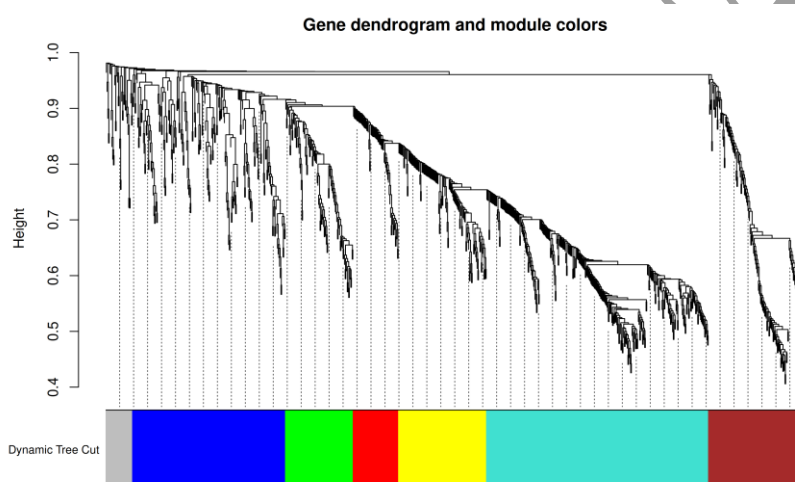


شکل ۱۲: مقایسه تغییرات بیان ژن در کروموزوم‌ها بین گروه تریپتولید با گروه تریپتولید همراه با کروسین
 Figure 12: Comparison of gene expression changes on chromosomes between triptolide group and triptolide plus crocin group

روش PREDA با در نظر گرفتن موقعیت ژن‌ها روی کروموزوم‌ها، الگوهای مکانی تغییرات بیان ژن را بررسی می‌کند و نواحی ژنومی را که در آن‌ها تعداد قابل توجهی از ژن‌ها به طور هماهنگ افزایش یا کاهش بیان دارند، شناسایی می‌کند. نتایج مقایسات زوجی نشان داد که در مقایسه گروه کنترل با گروه تیمار شده با تریپتولید همراه با کروسین (X300TP_CR vs NC) تعداد ۶ ناحیه ژنومیکی غنی‌شده بر روی کروموزوم‌های ۱۰ و ۱۳ مشاهده شد که بیانگر تغییرات قابل توجه در برخی جایگاه‌های ژنومی در اثر تیمار ترکیبی است. در مقایسه گروه تریپتولید با گروه کنترل (X300TP vs NC) نیز ۲ ناحیه غنی‌شده بر روی کروموزوم ۱۳ شناسایی شد که نشان می‌دهد تریپتولید به تنهایی نیز می‌تواند موجب تغییر در برخی نواحی ژنوم شود. همچنین در مقایسه گروه تریپتولید با گروه تریپتولید همراه با کروسین (X300TP vs X300TP_CR) تنها یک ناحیه غنی‌شده بر روی کروموزوم ۷ مشاهده شد. به طور کلی، نتایج نشان داد که تیمار ترکیبی تریپتولید و کروسین نسبت به سایر مقایسات، بیشترین تغییرات در نواحی ژنومیکی را ایجاد کرده است. این یافته می‌تواند نشان‌دهنده نقش بالقوه کروسین در تعدیل اثرات زیستی و احتمالاً کاهش عوارض ناشی از تریپتولید باشد، هرچند برای درک دقیق‌تر مکانیسم‌های مولکولی این اثرات، مطالعات تکمیلی ضروری است.

شکل ۱۳ مربوط به خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی ژن‌ها و شناسایی ماژول‌ها در تحلیل WGCNA است و به صورت Gene dendrogram and module colors نمایش داده شده است. در این نمودار، هر شاخه از دندروگرام (درخت خوشه‌بندی) نمایانگر یک ژن است و ژن‌ها بر اساس شباهت الگوی بیان (co-expression) با یکدیگر خوشه‌بندی شده‌اند. محور عمودی با عنوان Height میزان فاصله یا عدم شباهت بین ژن‌ها را نشان می‌دهد؛ هرچه ارتفاع اتصال شاخه‌ها کمتر باشد، شباهت بیان بین ژن‌ها بیشتر است. در قسمت پایین شکل، نوار رنگی با عنوان Dynamic Tree Cut نشان‌دهنده ماژول‌های ژنی

شناسایی شده است. هر رنگ بیانگر یک ماژول ژنی شامل مجموعه‌ای از ژن‌ها با الگوی بیان مشابه است که احتمالاً در یک مسیر بیولوژیکی یا عملکرد مشترک نقش دارند. در این تحلیل چندین ماژول مختلف از جمله آبی، سبز، قرمز، زرد، فیروزه‌ای و قهوه‌ای شناسایی شده‌اند. از میان این ماژول‌ها، ماژول فیروزه‌ای (turquoise) بزرگ‌ترین ماژول را تشکیل می‌دهد و شامل تعداد بیشتری از ژن‌ها با الگوی بیان مشابه است که ممکن است نشان‌دهنده مشارکت این ژن‌ها در یک فرآیند زیستی مهم باشد. ماژول‌های آبی، سبز، قرمز، زرد و قهوه‌ای نیز گروه‌های کوچکتری از ژن‌های هم‌بیان را نشان می‌دهند. به طور کلی، این نتایج نشان می‌دهد که ژن‌ها در شبکه بیان ژنی به چندین ماژول هم‌بیان سازماندهی شده‌اند که می‌توانند در مراحل بعدی تحلیل برای بررسی ارتباط با صفات مورد مطالعه یا شرایط تیماری (مانند تریپتولید و کروسین) و همچنین شناسایی ژن‌های کلیدی (hub genes) مورد استفاده قرار گیرند.

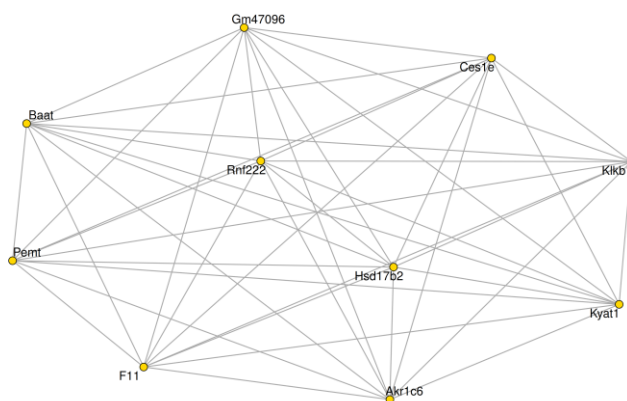


شکل ۱۳: خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی ژن‌ها و شناسایی ماژول‌ها در تحلیل WGCNA

Figure 13: Hierarchical clustering of genes and module identification in WGCNA analysis

شکل ۱۴: شبکه هم‌بیانی (co-expression network) مربوط به ۱۰ ژن برتر با بالاترین درجه اتصال (highest degree of connectivity) را نمایش می‌دهد. در این شبکه، هر گره (node) نمایانگر یک ژن و هر یال (edge) نشان‌دهنده همبستگی معنادار بین سطوح بیان دو ژن است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، وجود یال‌های متعدد میان ژن‌ها حاکی از ارتباط عملکردی و هم‌بیانی قابل توجه میان آن‌ها می‌باشد. در این شبکه ژن‌هایی مانند *Kyat1*, *Kifb1*, *Ces1e*, *Gm47096*, *Baat* و *Pem*, *F11*, *Rnf222*, *Hsd17b2*, *Akr1c6* حضور دارند که به صورت یک شبکه نسبتاً متراکم با یکدیگر در ارتباط هستند. تعداد زیاد اتصالات نشان می‌دهد که این ژن‌ها احتمالاً در مسیرهای زیستی مشترک یا فرآیندهای متابولیکی مرتبط نقش دارند. برخی ژن‌ها که اتصالات بیشتری دارند (به ویژه *Akr1c6* و *Ces1e*, *Gm47096*) می‌توانند به عنوان ژن‌های مرکزی یا hub genes در شبکه در نظر گرفته شوند و ممکن است نقش مهم‌تری در تنظیم فرآیندهای بیولوژیکی داشته باشند. این

شبکه نشان می‌دهد که ژن‌های شناسایی شده به صورت یک مجموعه به هم مرتبط عمل می‌کنند و عمدتاً در مسیرهای متابولیسمی، سم‌زدایی و تنظیم هورمونی مشارکت دارند. چنین الگویی می‌تواند بیانگر آن باشد که تیمارهای مورد مطالعه (تریپتولید و کروسین) ممکن است از طریق تأثیر بر شبکه‌ای از ژن‌های مرتبط با متابولیسم و سم‌زدایی موجب تغییرات مولکولی شوند. در یک پژوهش از میان ۷۶ ژن با بیان افتراقی، سه ژن شامل *Cyp1a2*، *Gsta4* و *Gstp1* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی در زمان واقعی (qRT-PCR) اعتبار سنجی شدند که با نتایج این تحقیق مغایرت داشت (Yan et al., 2022).



شکل ۱۴: شبکه هم‌بیانی (co-expression) ژن‌های برتر
Figure 14: Co-expression network of top genes

نتیجه گیری کلی

کروسین با تثبیت و تنظیم مسیرهای متابولیسم دارو، سموم و واسطه‌های التهابی، می‌تواند نقش حفاظتی مؤثری در برابر سمیت کبدی تریپتولید ایفا کند. فعال شدن این مسیرها بیانگر تلاش بدن برای بازیابی تعادل زیستی پس از مواجهه با تریپتولید است. در مجموع، کروسین با هدفمندسازی مسیرهای ایمنی و ضدالتهابی، فعالیت‌های مخرب سلول‌های ایمنی را تعدیل کرده و وضعیت سلولی کبد را به حالت نرمال نزدیک نموده است؛ این تنظیم هدفمند مسیرهای خاص، می‌تواند اساس مکانیسم محافظتی کروسین در مقابل سمیت کبدی ناشی از تریپتولید محسوب شود و می‌تواند به عنوان راهبردی مؤثر برای کاهش عوارض جانبی داروهای سمی به‌ویژه تریپتولید مورد توجه قرار گیرد.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

- Abdi, H., Aganj, Z., Hosseinzadeh, H., & Mosaffa, F. (2022). Crocin restores the balance of Th1/Th2 immune cell response in ConA-treated human lymphocytes. *Pharmacological Reports*, 74, 513–522. doi: <https://doi.org/10.1007/s43440-022-00362-3>
- Ali, S. (2024). Saffron (*Crocus sativus* L.) as a Promising Complementary Treatment for Depression: A Review of Basic and Clinical Studies. *Journal of Saffron Research*, 12(2), 208-226. doi: <https://doi.org/10.22077/jsr.2025.8449.1250>. [In Persian].
- Anaeigoudari, A. (2022). Hepato-and reno-protective effects of thymoquinone, crocin, and carvacrol: A comprehensive review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 12(5), 185-196. doi: <https://doi.org/10.4103/2221-1691.343386>
- Attia, A. A., Ramdan, H. S., Al-Eisa, R. A., Adle Fadle, B. O. A., & El-Shenawy, N. S. (2021). Effect of saffron extract on the hepatotoxicity induced by copper nanoparticles in male mice. *Molecules*, 26(10), 3045. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26103045>
- Chen, X., Huang, J., Lv, Y., Chen, Y., & Rao, J. (2021). Crocin exhibits an antihypertensive effect in a rat model of gestational hypertension and activates the Nrf-2/HO-1 signaling pathway. *Hypertension Research*, 44(6), 642. doi: <https://doi.org/10.1038/s41440-020-00609-7>. Epub 2021 Jan 13
- Dai, Z., Sheridan, J. M., Gearing, L. J., Moore, D. L., Su, S., Wormald, S., ... & Ritchie, M. E. (2014). edgeR: a versatile tool for the analysis of shRNA-seq and CRISPR-Cas9 genetic screens. *F1000Research*, 3, 95. doi: <https://doi.org/10.12688/f1000research.3928.2>
- Ferrari, F., Solari, A., Battaglia, C., & Bicciato, S. (2011). PREDA: an R-package to identify regional variations in genomic data. *Bioinformatics*, 27(17), 2446-2447. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr404>
- Ge, S. X., Son, E. W., & Yao, R. (2018). iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC bioinformatics*, 19(1), 534. doi: <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2486-6>
- Guo, L., Yang, Y., Ma, J., Xiao, M., Cao, R., Xi, Y., & Yan, M. (2024). Triptolide induces hepatotoxicity by promoting ferroptosis through Nrf2 degradation. *Cell Biology and Toxicology*, 40(1), 94. doi: <https://doi.org/10.1007/s10565-024-09930-0>
- Hassani, F. V., Mehri, S., Abnous, K., Birner-Gruenberger, R., & Hosseinzadeh, H. (2017). Protective effect of crocin on BPA-induced liver toxicity in rats through inhibition of oxidative stress and downregulation of MAPK and MAPKAP signaling pathway and miRNA-122 expression. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 395-405. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.007>
- Hosseinzadeh, M. S. & Moudi, M. (2022). Overview of Effective Saffron Compounds and Its Reactions on Neurodegenerative Diseases of Nervous System. *Journal of Saffron Research*, 10(2), 258-275. doi: <https://doi.org/10.22077/jsr.2022.4985.1177>. [In Persian].
- Hu, Y., Wu, Q., Wang, Y., Zhang, H., Liu, X., Zhou, H., & Yang, T. (2022). The molecular pathogenesis of triptolide-induced hepatotoxicity. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 979307. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.979307>
- Lin, Y., Golovnina, K., Chen, Z. X., Lee, H. N., Negron, Y. L. S., Sultana, H., ... & Harbison, S. T. (2016). Comparison of normalization and differential expression analyses using RNA-Seq data from 726 individual *Drosophila melanogaster*. *BMC genomics*, 17(1), 28. doi: <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2353-z>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 550. doi: <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

- Ramandi, A. , Naseri, M. & Yousefijavan, I. (2022). The Effect of Aqueous Extract of Crocus sativus Style on Blood Coagulation Indices in Rats. *Journal of Saffron Research*, 10(1), 168-160. doi: <https://doi.org/10.22077/jsr.2022.4950.1176>. [In Persian].
- Salem, M., Shaheen, M., Tabbara, A., & Borjac, J. (2022). Saffron extract and crocin exert anti-inflammatory and anti-oxidative effects in a repetitive mild traumatic brain injury mouse model. *Scientific Reports*, 12, 5004. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09109-9>
- Shen, X. L., Guo, Y. N., Lu, M. H., Ding, K. N., Liang, S. S., Mou, R. W., & Tang, L. P. (2023). Acetaminophen-induced hepatotoxicity predominantly via inhibiting Nrf2 antioxidative pathway and activating TLR4-NF-κB-MAPK inflammatory response in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 252, 114590. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114590>
- Xing, B., Li, S., Yang, J., Lin, D., Feng, Y., Lu, J., & et al. (2021). Phytochemistry, pharmacology, and potential clinical applications of saffron: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 281, 114555. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114555>
- Xu, Z., Lin, S., Tong, Z., Chen, S., Cao, Y., Li, Q., & et al. (2022). Crocetin ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by modulating mitochondrial dysfunction in L02 cells and zebrafish model. *Journal of Ethnopharmacology*, 285, 114873. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114873>
- Yalikong, A., Li, X. Q., Zhou, P. H., Qi, Z. P., Li, B., Cai, S. L., & et al. (2021). A triptolide-loaded HER2-targeted nano-drug delivery system significantly suppressed the proliferation of HER2-positive and BRAF mutant colon cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 2323–2335. doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S287732>
- Yan, M., Yan, Y., Zhang, Z., Wang, G., Shi, W., Jiang, M., & Zeng, H. (2022). The effect of triptolide combined with crocin on arthritis in mice: from side effect attenuation to therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 908227. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.908227>
- Yuan, K., Li, X., Lu, Q., Zhu, Q., Jiang, H., Wang, T., & Xu, A. (2019). Application and mechanisms of triptolide in the treatment of inflammatory diseases—A review. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1469. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01469>
- Zeng, H., Zhu, X., Tian, Q., Yan, Y., Zhang, L., Yan, M., & et al. (2020). In vivo antitumor effects of carboxymethyl chitosan-conjugated triptolide after oral administration. *Drug Delivery*, 27, 848–854. doi: <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1770370>
- Zhan, Z., Chen, Y., Duan, Y., Li, L., Mew, K., Hu, P., & Peng, M. (2019). Identification of key genes, pathways and potential therapeutic agents for liver fibrosis using an integrated bioinformatics analysis. *PeerJ*, 7, e6645. doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.6645>
- Zhang, L., Yan, M., Chen, K., Tian, Q., Song, J., Zhang, Z., & et al. (2020). Novel carboxylated chitosan-based triptolide conjugate for the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmaceutics*, 12(3), 202. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030202>