اثرات رنگیزه کاروتنوئیدی زعفران (.Crocus Sativus L) بر پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها و رشد سلول‌های HeLa

مهدی علی جانیان زاده [*۱]، حسین زارعی جلیانی [۲]

۱. دانشجوی دکترای بیوفیریک، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا
۲. مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک (IBB)، دانشگاه تهران، تهران

مکان انجام تحقیق: تهران، خیابان کارگر شمالی، روبروی مرکز قلب، شماره ۴۶۱، طبقه چهارم، واحد ۲۰ آزمایشگاه پارس ژن

مسؤول مکاتبات: مهدی علی‌جانیان‌زاده، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، پست الکترونیکی: Alijanianzadeh_m@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۲۳

چکیده

رنگیزه‌های کاروتنوئیدی زعفران در طی دهه‌های گذشته توجه زیادی را در بخش تحقیقاتی به خود جلب کرده‌اند. کروسین یکی از این کاروتنوئیدهاست که خصوصیات ضدسرطان را در محیط بدن جاندار و نیز در شرایط in vitro از خود نشان داده است. پروتئین‌های میکروتوبولی از پروتئین‌های موجود در تقریباً تمام سلول‌های جانوری هستند که در تمامی های سلولی از قبیل انتقال مواد و اندامک‌ها، جابه جایی سلولی و همچنین تقسیم سلولی می‌توان آن ها را سهیم دانست. در نورون‌ها نیز میکروتوبول‌ها در جا به جایی ناقلین عصبی نقش دارند. کروسین با پروتئین‌های سلولی میان‌کنش داشته و فعالیت‌های آن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد، اما مولکول‌های هدف این رنگیزه در داخل سلول‌ها به‌طور دقیق تاکنون مشخص نشده است. در این تحقیق تاثیر کروسین بر روند پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها و ساختمان پروتئین‌های توبولینی با استفاده از طیف سنجی ماورای بنفش و فلورسانت بررسی شده است. همچنین تاثیر این رنگیزه بر روی رشد سلول‌های HeLa مورد ارزیابی قرار گرفته است. نتایج این تحقیق نشان داد کروسین باعث افزایش میزان و سرعت پلیمریزاسیون می‌شود. طیف های فلورسانت، نشان دهنده میان کنش این لیگاند با پروتئین‌های توبولینی و تغییرات ساختمانی این پروتئین‌ها بودند. از بین رفتن سلول‌های HeLa نیز از دیگر اثرات بررسی شده در این پروژه تحقیقاتی بود. این نتایج منجر به شناخت بیشتر نقش کروسین در فرایند تکثیر سلولی خواهد شد و امید می‌رود در ادامه بتوان از این لیگاند در درمان بیماری سرطان استفاده نمود.

واژه های کلیدی: کروسین، توبولین، میکروتوبول، طیف فلورسانت ذاتی

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.)، یکی از ادویه‌های با ارزشی است که در طب سنتی در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است. از مهم‌ترین ترکیبات موجود در زعفران می‌توان کاروتنوئیدهای آن یعنی کروسین، کروستین و دی متیل کروستین را نام برد. کروسین، استر دی جنتیوبیوزید کروسین است. گزارش‌های زیادی در مورد اثرات مفید عصاره‌های زعفران بر روی سلامت بدن وجود دارد که از آن جمله می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدان، اثرات ضد توموری و پیش‌گیری‌کننده از سرطان اشاره کرد. در این میان مدارکی وجود دارند که نشان می‌دهند کروسین، کروستین و مشتقات آن‌ها، رشد برخی سلول‌های سرطانی و بدخیم را در محیط کشت مهار می‌کنند (۱،۲). در این خصوص، رشد سلول‌های سرطانی K562 و

Archive of SID
www.SID.ir

HL60 به‌طور واضحی توسط کروسین، کروستین و دی متیل کروستین مهار شده است (۳). در مطالعاتی دیگر این اثر روی سلول‌های سرطان سینه به صورتی وابسته به دوز مشاهده شده است که البته مشخص شد این اثر، مستقل از گیرنده استروژن در سلول‌های سرطان سینه اعمال می‌شود (۴). مطالعات in vivo و in vitro روی سلول‌های T24 (کارسینوم مثانه انسانی) حاکی از آن است که اثرات مهار رشد سلولی به موازات اثرات القای آپوپتوزی رخ می‌دهد که با تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های مزبور همراه است. در این سلول‌ها بیان برخی از پروتئین-های آنتی‌آپوپتوزی نظیر Bcl-2 و سروایوین، کاهش شدیدی نشان داده است (۵). در القای تومور در مدل‌های حیوانی نیز مشخص شده است که عصاره-های زعفران، عمر حیوان مبتلا به تومور القایی را تا حدود دو برابر افزایش داده است (۱). ترکیبات موجود در زعفران توانسته‌اند تومورزایی (تومور پانکراس) را در موش‌های برهنه فاقد تیموس به کلی مهار کنند (۶). با وجودی که بسیاری از داروهای ضدسرطان در حال حاضر به خاطر اثرات سمی، دارای محدودیت‌هایی در استفاده می‌باشند ولی تاکنون چنین اثراتی برای عصاره‌های زعفران مشاهده نشده است. علاوه بر این عصاره‌های زعفران توانسته-اند از اثرات سمی داروهای رایجی از قبیل سیس پلاتین، سیکلوفسفامید و میتومایسین C نیز جلوگیری کنند (۷). مشکل دیگری که در بسیاری از داروها وجود دارد، اثرات سمی دارو بر سلول‌های نرمال و سالم بدن است که در این مورد نیز مشخص شده است. کاروتنوئیدهای زعفران، هیچ گونه اثرات سمی روی سلول‌های غیرسرطانی و نرمال ندارند، در حالی که در غلظت‌های مورد استفاده مشابه، اثرات مهار رشد سلول‌های سرطانی واضح است (۸،۹). در مطالعات دیگری که عصاره‌های زعفران و محتویات آن‌ها اثرات مهار سنتز DNA و پروتئین از خود نشان داده‌اند نیز سلول‌های سالم، کمتر از سلول‌های سرطانی، متاثر از این اثرات شده‌اند (۱۰). به نظر می‌رسد در میان مواد موجود در زعفران، کروسین قوی‌ترین کاروتنوئیدی باشد که اثرات ضدتوموری و پیش‌گیری‌کننده از سرطان را داراست (۱۱). اخیراً نیز نشان داده شده است که عصاره‌های اتانلی زعفران و مخصوصاً کروسین موجود در آن، از تشکیل پاپیلوما در مدل موشی کارسینوژنز پوست جلوگیری می-کنند. شواهد کافی وجود دارد که این اثرات به تنهایی توسط گروه جنتیوبیوزید موجود در ساختار کروسین القا نمی‌شود (۱۲). در این تحقیق، اثرات کروسین روی سیستم پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها به‌عنوان کاندیدی برای هدف مولکولی اجزای زعفران بررسی شده است. همچنین به موازات این بررسی‌ها، اثر کروسین روی رشد سلول‌های HeLa نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این تحقیق بشرح زیر می-باشند. گلیسرول، گوانوزین تری فسفات (MgGTP)، بافر PIPES و سولفات منیزیم از شرکت سیگما و از درجه بیولوژی مولکولی انتخاب شدند. بقیه مواد شامل اسید کلریدریک، اسید فسفریک، اتانل، کوماسی بلو G250، پروتئین آلبومین سرم گاوی و پتاس (KOH) از شرکت مرک (MERCK) تهیه شدند. کروسین به صورت خالص و پودر قرمز نارنجی‌رنگ از دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد و در انجام آزمایشات در بافر PIPES با پایه آب حل شده و مورد استفاده قرار گرفت.

روش جداسازی توبولین از مغز گوسفند

مغز یکی از اندام‌های غنی از میکروتوبول است که راندمان بالای استخراج، آن را به منبع مناسبی برای جداسازی این پروتئین با ارزش تبدیل نموده است. مراحل زیر، روند جداسازی توبولین از مغز گوسفند را نشان می‌دهند.

۱) مغزها را از زمان کشته شدن حیوان تا انتقال به آزمایشگاه، در یک کیسه پلاستیکی و روی یخ نگه می‌داریم.

۲) در سردخانه ۴ درجه سانتی‌گراد، به آرامی و با احتیاط، مننژ و رگ‌های خونی را کاملاً از بقیه مغز جدا می‌کنیم. این کار را برای همه سطوح خارجی و داخلی مغز انجام می‌دهیم تا هیچ گونه رگ خونی در تاخوردگی‌های مغز دیده نشود.

Archive of SID

www.SID.ir

۳) مغزهای تمیز شده را به مکعب‌های ۲ تا ۳ سانتی‌متری بریده و پس از وزن کردن بافت، آن را با مقدار کافی بافر هموژنیزه‌کننده (نیم میلی لیتر به ازای هر گرم بافت) که حاوی غلظت نهایی یک میلی مولار MgGTP است در یک مخلوط‌کن خوب خرد می‌کنیم تا مخلوط یکنواختی حاصل شود.

۴) عمل هموژنیز را در ظرفی مخصوص به مدت ۵ ثانیه با سرعت بالا و ۴۵ ثانیه با سرعت پایین، انجام می‌دهیم. این عمل منجر به ایجاد سوسپانسیونی با رنگ شیری‌رنگ متمایل به رنگ توت فرنگی خواهد شد.

۵) حجم هموژنات اولیه را اندازه گرفته و آن را به تیوب‌های سانتریفیوژ منتقل می‌کنیم.

۶) سانتریفیوژ هموژنات اولیه را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه در سرعتی معادل با 100000 g انجام می‌دهیم تا بافت‌های تخریب نشده از اجزای سیتوزولی جدا شوند.

۷) پس از سانتریفیوژ فوق، سوپرنات را در دمای اتاق در ظرفی شیشه‌ای با نسبت یک به یک، با بافر PMG رقیق کرده و MgGTP را تا غلظت نهایی ۰،۲ میلی‌مولار برای شروع پلیمریزاسیون به آن اضافه می‌کنیم.

۸) برای مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم اجازه پلیمریزاسیون می‌دهیم و روتور و دستگاه سانتریفیوژ را تا دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرم می‌کنیم.

۹) میکروتوبول‌ها را به‌مدت ۴۵ دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در سرعتی معادل با 100000 g رسوب می‌دهیم.

۱۰) در سردخانه، سوپرنات را دور ریخته و رسوب را در یک پنجم حجم هموژنات اولیه از بافر PEM به همراه GTP با غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مولار حل می‌کنیم و در یک هموژنایزر مدتی آن را با دست و به آرامی هموژنایز می‌کنیم تا سوسپانسیون یکنواختی حاصل شود. به مدت نیم ساعت دپلیمریزاسیون را روی یخ با انجام هموژنایز با دست و هر پنج دقیقه یک بار و به آرامی انجام می‌دهیم. در طی این مدت، سانتریفیوژ را تا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد خنک می‌کنیم.

۱۱) عمل سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۵ دقیقه با سرعتی معادل 100000 g در این مرحله برای شفاف کردن محلول انجام می‌گیرد.

۱۲) انجام سیکل دوم پلیمریزاسیون با رقیق‌کردن سوپرنات مرحله قبلی با نسبت یک به یک با PMG به همراه GTP (تا ۰/۲ میلی مولار) و به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود. در طی این مدت، سانتریفیوژ را تا دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرم می‌کنیم.

۱۳) میکروتوبول‌ها را این بار نیز از بقیه پروتئین‌های اضافه و همچنین از توبولین‌های فاقد قدرت پلیمریزاسیون با انجام عمل سانتریفیوژ جدا می‌کنیم (با سرعتی معادل 100000 g یا 29000 rpm).

۱۴) دپلیمریزاسیون رسوب ایجاد شده را با هموژنایز دستی در سردخانه به مدت نیم ساعت و با مقدار کافی از بافر PEM به همراه GTP انجام می‌دهیم.

۱۵) یک مرحله سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با همان سرعت و روتور قبلی در این مرحله می‌تواند به‌طور انتخابی انجام شود (این مرحله در صورت کدر بودن محلول توصیه می‌شود وگرنه، نیازی به انجام آن نیست).

پس از این مرحله سوپرنات حاصل را جدا کرده و به صورت الیکوت‌های یک میلی‌لیتری در نیتروژن مایع، فریز کرده و برای مطالعات بعدی در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌کنیم.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد

در این روش، ماده رنگی برادفورد با ریشه‌های امینواسیدی آرژینین و تا حد کمتری با هیستیدین، لیزین، تیروزین، تریپتوفان و فنیل آلانین میان کنش می‌دهد. با افزودن پروتئین، در نتیجه میان کنش‌های یونی و هیدروفوبیک با ریشه‌های امینواسیدی یاد شده، جذب ماده رنگی از طول موج ۴۶۵ به ۵۹۵ نانومتر تغییر می‌کند. با افزودن پروتئین به محلول آماده شده رنگ، رنگ سبز لجنی آن به آبی تغییر

Archive of SID

www.SID.ir

می‌یابد. روش مورد استفاده در این تحقیق، بهبود یافته روش اصلی برادفورد است.

برای تهیه محلول رنگ، ۱۰۰ میلی‌گرم از کوماسی بلو G250 را در مخلوطی از ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد و ۵۰ میلی‌لیتر اتانل ۹۵ درصد حل می‌کنیم. پس از حل‌شدن کامل رنگ، حجم را با آب مقطر به یک لیتر می‌رسانیم.

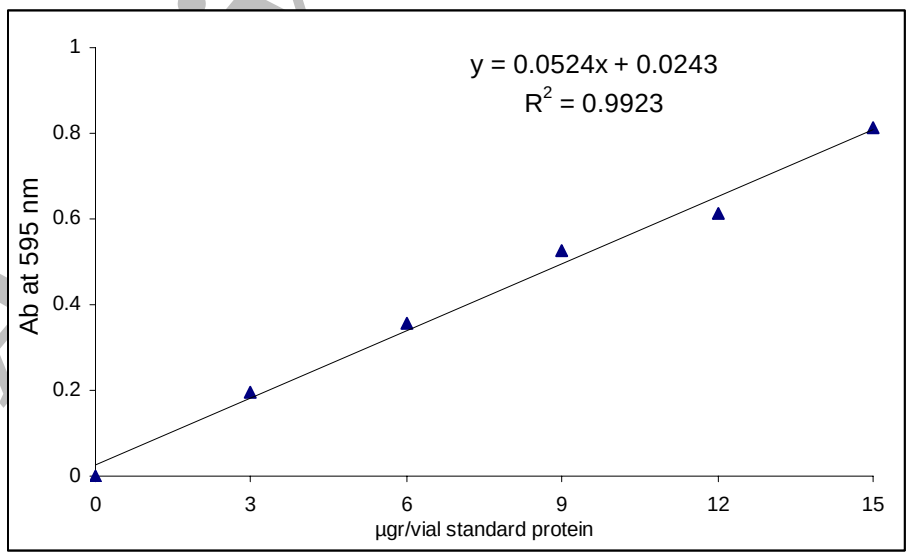
روش اندازه‌گیری

۲۰ میکرولیتر از نمونه پروتئینی را با ۵۰ میکرولیتر سود یک نرمال مخلوط کرده و به مجموع آن‌ها یک میلی‌لیتر محلول رنگ، اضافه و مدت ۵ دقیقه انکوبه می‌کنیم. جذب را نسبت به شاهد در طول موج ۵۹۰ نانومتر می‌خوانیم. منحنی استاندارد را با مقادیر ۳، ۶، ۹، ۱۲و ۱۵ میکروگرم از BSA به‌عنوان پروتئین استاندارد رسم می‌کنیم و با استفاده از معادله خطی که رسم خواهد شد، غلظت نمونه مجهول را به دست می‌آوریم. مقادیری که در رسم منحنی استاندارد استفاده شده‌اند بر طبق جدول ۱ است.

منحنی به دست آمده، در قالب تصویر ۱ نمایش داده شده است. با استفاده از OD بدست آمده از هر نمونه پروتئینی و قرار دادن آن در معادله منحنی به جای y می‌توان غلظت را به دست آورد.

جدول ۱- مقادیر مواد برای اندازه گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد (برحسب میکرولیتر).

	Blank	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5
Protein (1mg/ml)	-	3	6	9	12	15
H2O	20	17	14	11	8	5
NaOH (1M)	50	50	50	50	50	50
Dye reagent	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Total	1070	1070	1070	1070	1070	1070



ژل الکتروفورز نمونه ها

جهت تعیین میزان خلوص و شناسایی پروتئین‌های توبولینی، از روش الکتروفورز (SDS-PAGE) استفاده شد. برای جداسازی پروتئین‌های توبولینی، ژل جدا کننده ۱۰ درصد مورد استفاده قرار گرفت. زمان آزمایش بین ۲ تا ۳ ساعت طول کشید تا نمونه ها در ژل از هم جدا شوند. رنگ‌آمیزی ژل نیز به‌روش کوماسی بلو انجام شد.

Archive of SID
www.SID.ir

در روش کوماسی بلوژل‌ها به مدت ۴ ساعت به وسیله شیکر در معرض رنگ قرار گرفتند و سپس نمونه ها ۲ یا ۳ مرتبه با محلول رنگ بر، شسته شدند.

بافر نمونه از Tris با غلظت ۰/۰۶۲۵ مولار و pH=6.8 بوده و حاوی ۲ درصد SDS، ۵ درصد ۲-مرکاپتو اتانل، ۱۰ درصد گلیسرول و ۰/۰۰۲ درصد برموفنل‌بلو است. این بافر، آبی‌رنگ است. بافر تانک نیز حاوی تریس با غلظت ۲۵ میلی‌مولار و گلیسین با غلظت ۰/۱۹۲ مولار و SDS به میزان ۰/۱ درصد بوده و pH آن ۸/۳ می‌باشد.

کروماتوگرافی تعویض یونی با ستون فسفو سلولز

۱۰ گرم از پودر ستون فسفو سلولز P=11 واتمن را ابتدا با ۲۰۰ میلی‌لیتر سود ۰/۱ نرمال و سپس با ۲۰۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال شستشو می‌دهیم. در این دو مرحله، pH باید بترتیب به ۱۲ و ۳ برسد. پس از آن با آب دیونیزه شستشو می‌دهیم. در مرحله بعد شستشوی رزین با سولفات منیزیم ۰/۱ مولار و پس از آن دوباره با سود ۰/۱ نرمال تا pH به ۶/۶ برسد. ستون آماده شده را با بافر PIPES حاوی سولفات منیزیم به تعادل می‌رسانیم و سپس پروتئین به‌دست آمده از سیکل دوم پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون را روی ستون بارگذاری می‌کنیم. پس از اتمام بارگذاری نمونه، بلافاصله شستن با بافر ستون را برای خروج نمونه‌ها آغاز می‌کنیم. سرعت عبور محلول‌ها از ستون را حدود یک میلی‌لیتر بر دقیقه و خروجی ستون را فرکشن‌های ۳ میلی‌لیتری انتخاب می‌کنیم.

تقریباً تمام پروتئین‌ها به جز توبولین‌ها به ستون چسبیده و توبولین‌های خالص‌شده بدون دادن شیب نمک و در void volume خارج می‌شوند. کروماتوگرام در بخش نتایج دیده می‌شود.

اندازه‌گیری فعالیت میکروتوبول‌ها به‌روش کدورت‌سنجی

ابتدا یکی از ویال‌های توبولین استخراج شده را از یخچال ۷۰- درجه سانتی‌گراد بیرون آورده و در محیط آزمایشگاه روی یخ قرار می‌دهیم تا پس از حدود ۴۵ دقیقه به آرامی ذوب شود. گرم‌کردن سریع، پروتئین را واسرشت می‌نماید. پس از آن، شرایط پلیمریزاسیون پروتئین را مهیا و اندازه‌گیری را شروع می‌کنیم. برای انجام این آزمایش، از مد سینتیکی دستگاه اسپکتروفتومتر Cary در دمای ثابت ۳۷ درجه با فواصل زمانی ۰/۱ دقیقه و برای مدت ۲۰ یا ۳۰ دقیقه استفاده شد. در تمامی اندازه-گیری‌ها از کووت ۰/۹ میلی‌لیتری از جنس کوارتز استفاده شد. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۵۰ نانومتر خوانده شده است.

پس از به‌دست آمدن نمودار نرمال پلیمرشدن میکروتوبول‌ها، فعالیت آن‌ها در غلظت‌های مختلف لیگاند و تحت شرایط مختلف اندازه‌گیری شد. غلظت‌های مورد استفاده برای کروسین در این آزمایش به‌ترتیب ۳۲، ۶۴ و ۹۶ میکروگرم بر میلی-لیتر است.

بررسی فلورسانت ذاتی پروتئین در حضور کروسین

میزان فلورسانت ذاتی پروتئین در عدم حضور و همچنین حضور لیگاند با غلظت‌های افزاینده بررسی گردید. برای این منظور، غلظت ۱/۸ میکرومولار پروتئین خالص شده را در حضور غلظت‌های افزاینده کروسین بررسی کردیم. تهییج تریپتوفان‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر و نشر آن‌ها از ۳۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر بررسی گردید. هر بار نشر به‌دست آمده به صورت نمودار، رسم شد و در آخر، نمودارها در کنار یکدیگر مورد بررسی قرار گرفت.

تاثیر بر رشد سلول‌های سرطانی (سلول HeLa)

برای بررسی اثرات کروسین بر رشد سلول‌های سرطانی، رده سلولی HeLa انتخاب و در محیط

Archive of SID

www.SID.ir

کشت RPMI 1640 حاوی سرم گاوی ۱۰ درصد، رشد داده شد. پس از دو پاساژ متوالی در فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری، سلول‌ها که در حدود ۹۶ درصد زنده بودند با تریپسین ۰/۵ درصد از کف فلاسک، جدا و به تعداد ۱۰۰ هزار به هر چاهک از پلیت‌های شش حفره منتقل شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت دیگر از انتقال به پلیت شش حفره و البته با دوبار تعویض محیط روی سلول‌ها، غلظت‌های مختلف کروسین به این حفره‌ها اعمال شد.

برای این منظور غلظت‌های نهایی ۳۲ ، ۶۴ و ۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از کروسین در محیط کشت مزبور حاوی ۱۰درصد سرم تهیه و به سلول‌ها اضافه شد. در این مرحله، با یک پیپت پاستور محیط کشت روز قبل کاملاً از روی سلول‌ها برداشته شد. پس از طی زمان‌های ۸ ،۱۶و ۲۴ ساعت، سلول‌های پلیت‌ها با روش تریپان بلو شمرده شد و درصد زنده بودن سلول‌ها به دست آمد.

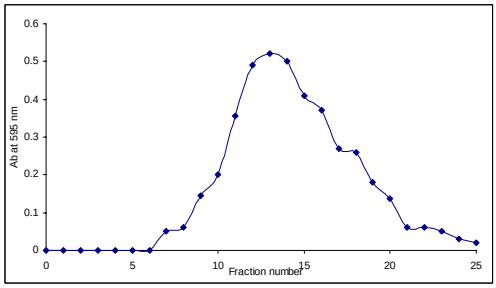
نتایج

کروماتوگرام ستون فسفو سلولز P-11

همان گونه که در تصویر ۲ مشاهده می‌شود نمونه‌های خارج شده از ستون کروماتوگرافی، هرکدام جداگانه در دستگاه طیف‌سنج uv/vis بررسی شده‌اند تا نمونه‌های حاوی پروتئین از بقیه جدا شوند. برای این کار مطابق روش برادفورد در بخش روش‌ها، ۲۰ میکرولیتر از هر فرکشن را به ۵۰ میکرولیتر سود یک نرمال، مخلوط و در معرف برادفورد انکوبه می‌کنیم و سپس OD آن را اندازه‌گیری می‌نمائیم. از نمونه‌های شماره ۱۳ و۱۴ که در پیک بالای منحنی هستند و بیشترین میزان پروتئین را دارند، برای انجام ژل الکتروفورز، نمونه‌برداری شد که نتیجه آن در تصویر ژل (تصویر ۳) دیده می‌شود.

تعیین غلظت پروتئین‌های استخراج شده با روش برادفورد

بر اساس منحنی رسم شده و محاسبه غلظت، غلظت پروتئین استخراج‌شده پس از مرحله دوم پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون، ۱/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برآورد شد.



تصویر ۲- منحنی کروماتوگرام فسفوسلولز برای تخلیص توبولین.

نتیجه ژل الکتروفورز نمونه‌های تخلیص‌شده در مراحل مختلف

تصویر ۳ مراحل مختلف استخراج و تخلیص توبولین‌ها را نشان می‌دهد. نمونه‌های بارگذاری شده در مراحل مختلفی از جداسازی و تخلیص گرفته شدند که بر طبق شماره‌های زیرند.

۱- هموژنات اولیه.
۲- پس از سانتریفیوژ اول و قبل از شروع سیکل اول پلیمریزاسیون.
۳- پس از سیکل اول پلیمریزاسیون/ دپلیمریزاسیون.
۴- سیکل دوم پلیمریزاسیون/ دپلیمریزاسیون قبل از سانتریفیوژ.
۵- سیکل دوم پلیمریزاسیون/دپلیمریزاسیون بعد از سانتریفیوژ.
۶- بعد از ستون فسفو سلولز.

چاهک m نیز مارکر پروتئینی را نشان می‌دهد که سه وزن مختلف در آن نمایان است. بالاترین آن‌ها ۷۴ کیلودالتون، وسط ۵۵ کیلودالتون و در پایین ۲۷ کیلودالتون دیده می‌شود. همان گونه که مشاهده می‌شود پروتئین‌های توبولینی در مقابل مارکر وسط، یعنی ۵۵ کیلودالتون ایستاده‌اند و در گذر از مراحل مختلف، به ترتیب خالص‌تر شده‌اند.

Archive of SID

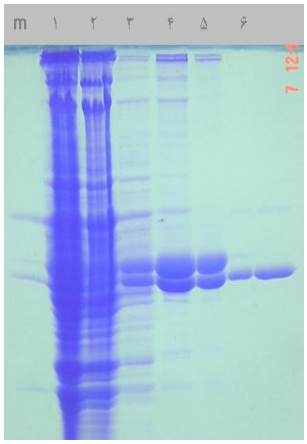
www.SID.ir

نتیجه فعالیت پلیمریزاسیون در حضور و عدم حضور کروسین

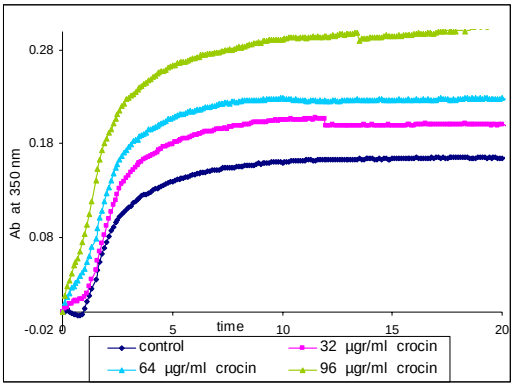
همان طور که در تصویر ۴ مشاهده می‌شود در حضور کروسین، میزان پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها افزایش شدیدی نشان می‌دهد. در غلظت ۹۶ میکروگرم بر میکرولیتر، حدود دو برابر سطح نهایی پلیمرهای توبولینی دیده می‌شود. از طرف دیگر، سرعت آغاز پلیمریزاسیون نیز که پارامتر مهمی است افزایش یافته و تاخیر ۱ تا ۱/۵ دقیقه‌ای که در شروع پلیمریزاسیون وجود داشته (زمان هسته‌گزینی) تقریباً به نزدیک ۳۰ ثانیه و حتی کمتر رسیده است.

بررسی فلورسانت ذاتی پروتئین در حضور کروسین

میزان فلورسانت ذاتی پروتئین در عدم حضور و همچنین حضور لیگاند، با غلظت های افزاینده بررسی گردید. تصویر ۵ نتیجه این بررسی را نشان می‌دهد. برای این منظور، غلظت ۱/۸ میکرومولار پروتئین خالص‌شده را در حضور غلظت‌های مختلف لیگاند بررسی کردیم. تهییج تریپتوفان‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر و نشر آن‌ها از ۳۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر بررسی گردید. همان‌طور که مشاهده می‌شود با اضافه‌کردن لیگاند کروسین به پروتئین‌های توبولین، از مقدار تریپتوفان‌های در دسترس کاسته شده است.



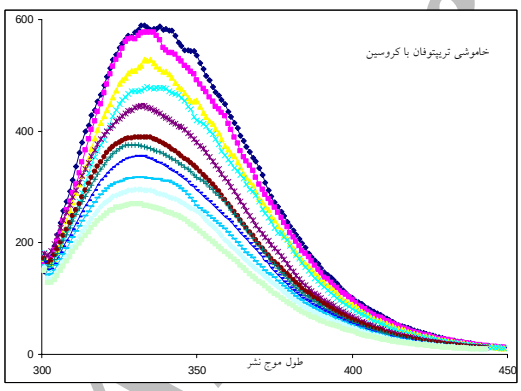
تصویر ۳- ژل الکتروفورز پروتئین توبولین در مراحل مختلف خالص‌سازی.



تصویر ۴- پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها در حضور و عدم حضور کروسین. غلظت توبولین استخراج شده مورد استفاده در این آزمایش برابر با ۱/۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر است و برای شروع واکنش، دما از ۴ درجه به ۳۷ درجه سانتی گراد افزایش می‌یابد.

نمودار اشباعی فلورسانت ذاتی توبولین در حضور کروسین

در تصویر ۶ ، اشباع شدن پروتئین توبولین در حضور غلظت های ۱۲۰ میکرومولار کروسین دیده می‌شود.



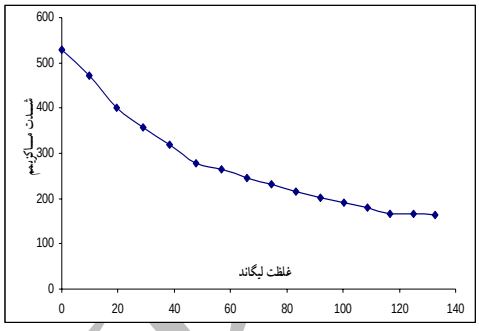
تصویر ۵- فلورسانت ذاتی پروتئین در عدم حضور و حضور لیگاند کروسین. غلظت توبولین ۱/۸ میکرومولار و دمای انجام آزمایش، ۳۷ درجه سانتی‌گراد است.

اثر رنگیزه بر رشد سلول‌های HeLa

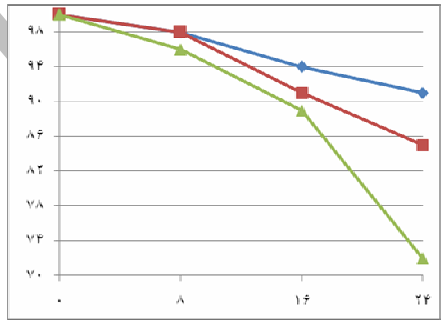
در نمودار تصویر ۷، اثر کروسین بر رشد سلول-های HeLa ترسیم شده است. محور افقی، مدت زمان پس از اعمال غلظت‌های کروسین بر روی محیط کشت سلول‌ها و محور عمودی، نشان دهنده درصد زنده بودن سلول‌هاست. همان گونه که از تصویر می‌توان فهمید کروسین در بالاترین غلظتی

www.SID.ir

که آزمایش شده است، یعنی ۹۶ میکروگرم بر میلی-لیتر، تا حد ۲۸ درصد از سلول‌های HeLa را توانسته است از بین ببرد و درصد زنده ماندن آن‌ها را به ۷۲ برساند.



تصویر ۶- نمودار اشباعی فلورسانت ذاتی توبولین در حضور کروسین. محور افقی، غلظت کروسین را برحسب میکرومول بر لیتر نشان می‌دهد. محور عمودی نیز واحد اختیاری فلورسانس دستگاه طیف سنج فلورسانس است.



تصویر ۷- اثر رنگیزه کروسین بر رشد سلول‌های HeLa در محیط کشت RPMI. محور افقی، نشان دهنده مدت زمان پس از اضافه کردن کروسین به محیط کشت برحسب ساعت است و محور عمودی، درصد زنده ماندن سلول های HeLa در زمان‌های مربوطه را نشان می‌دهد.

بحث

بسیاری از داروهای ضدسرطان که امروزه استفاده می‌شوند با تاثیر بر روند پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها اعمال اثر می‌کنند. اختلال در جدا شدن کروموزوم‌ها در مرحله تقسیم سلولی، اساسی‌ترین عملکرد این داروها به شمار می‌رود. بر اساس نمودارهای کدورت‌سنجی که در نتایج نشان داده شدند (تصویر ۴)، افزایش میزان پلیمریزاسیون و همچنین کاهش زمان هسته گزینی میکروتوبول‌ها (به شکلی وابسته به دوز) در نتیجه افزودن مقادیری از کروسین به وضوح دیده می‌شود. همان‌گونه که در تصویر ۵ در بخش نتایج دیده می‌شود، فلورسانت ذاتی توبولین خالص‌شده در حضور لیگاند کروسین کاهش می‌یابد و این امر، با کاهش طول موج ماکزیمم نشر تریپتوفان به میزان حدود ۷ نانومتر (شیفت به سمت آبی) همراه است. هر چه محیط تریپتوفان، غیرقطبی‌تر باشد، نشر آن در طول موج‌های پایین-تری صورت می‌گیرد و این امر در مورد کروسین صدق می‌کند. تاخوردگی توبولین در اثر افزودن کروسین بیشتر، و پروتئین، جمع‌تر می‌شود. در این خصوص می‌توان نتیجه گرفت که میان‌کنش این لیگاند یا با سطوحی بوده است که تریپتوفان‌های در دسترس محیط در آن جا قرار داشته‌اند و یا تغییرات کلی ساختار پروتئین بر اثر اتصال این لیگاند به نحوی بوده است که تریپتوفان‌ها پوشیده شده و یا به سمت داخل پروتئین رفته‌اند.

تاثیر کروسین بر رشد سلول‌های HeLa نیز در محیط کشت حاوی سرم در این تحقیق، بررسی و نتیجه آن در تصویر ۷ آورده شده است. ۲۸ درصد سلول‌ها در غلظت ۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر کروسین از بین رفته‌اند. این نتیجه با نتایج سایر محققین که روی سلول‌های دیگر، اثرات رنگیزه‌های زعفران را بررسی کرده‌اند، نسبتاً همخوانی دارد. از زمان شناسایی تاکسول و کلشی سین و جایگاه‌های اتصال آن‌ها روی توبولین ها تاکنون ترکیبات زیاد دیگری شناسایی شده‌اند که با میانکنش با توبولین در این جایگاه‌ها اثراتی مشابه (و بعضاً حتی قوی‌تر) با این ترکیبات معروف را از خود نشان می‌دهند. کروسین، خصوصیات پایدارکنندگی توبولین را از خود نشان می‌دهد. بنابراین، می‌توان این ترکیب را در درمان سرطان و برخی بیماری‌های دیگر استفاده کرد. امروزه در درمان بسیاری از بیماری‌ها از داروهای ترکیبی با اهداف گوناگونی استفاده می‌شود. گاهی به خاطر اثرات سمی یک دارو، مصرف آن محدود شده و به جای آن مجبور به استفاده از ترکیبات دیگر با خصوصیات مشابه و یا حتی اثرات قوی‌تری هستیم. تاکسول یکی از این داروهاست که در درمان سرطان، تاریخچه‌ای طولانی دارد، ولی

Archive of SID
www.SID.ir

اثرات سمی آن برای سلول‌های سالم دیگر بدن، مصرف آن را هر روز محدودتر می‌کند. امروزه تاکسول را در کنار داروهای دیگر به صورت افزودنی (Additive) به کار می‌برند. با توجه به اثرات مشابه کروسین با تاکسول شاید بتوان این ترکیب را همراه با تاکسول و یا به طور کلی، به جای آن مورد استفاده قرار داد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مسئولین آمایشگاه پارس ژن برای کمک‌ها و راهنمایی‌های فراوان تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1. Nair, S. C., Pannikar, B., Panikkar, K. R., 1991. Antitumour activity of saffron (Crocus Sativus L.). Cancer Lett. 57:109–114.
2. Fikrat, I., 2002. Abdullaev, Cancer Chemopreventive and Tumoricidal Properties of Saffron (Crocus sativus L.). Experimental Biology and Medicine 227:20-25.
3. Tarantilis, P. A., Morjani, H. M., Polissiou, M., Manfait, M., 1994. Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from Crocus sativus L. Anticancer Res 14: 1913-8.
4. Dimitra, G., Fotini, N., Gregoris, I., Adamantia, P., Nikos, K., Karamanos, P., Cordopatis, P.,2007. Inhibition of Breast Cancer Cell Proliferation by Style Constituents of Different Crocus Species. Anticancer Research 27: 357-362.
5. Zhao, P., Luo, C. L., Wu, X. H., Hu, H. B., 2008.. Proliferation apoptotic influence of crocin on human bladder cancer T24 cell line 15: 1869-73.
6. Animesh, D., Smita, M., Gopal, D., Kakali, D., Snigdha, B., Peter, V., Donald, R., 2009. Campbell and Sushanta K. Banerjee. Crocetin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and tumor progression in a xenograft mouse model. Mol Cancer Ther 8(2): 315–23
7. Premkumar, K., Thirunavukkarasu, C., Abraham, S. K., Santhiya, S. T, Ramesh, A., 2006. Protective effect of saffron (Crocus sativus L.) aqueous extract against genetic damage induced by anti-tumor agents in mice. Hum Exp Toxicol 25: 79-84
8. Aung, H. H., Wang, C. Z., Ni, M., Fishbein, A., Mehendale, S. R., Xie, J. T., Shoyama, C. Y., Yuan, C. S., 2007. Crocin from Crocus sativus possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells. Experimental oncology 29: 3-7.
9. Ríos, J. L., Recio, M. C., Giner, R. M., Máñez, S., 1996. An Update Review of Saffron and its Active Constituents. Phytotherapy Res 10: 189-193
10. Abdullaev, F. I., Frenkel, G. D., 1992. The effect of saffron on intracellular DNA, RNA and protein synthesis in malignant and non-malignant human cells. Biofactors 4(1): 43–45
11. Escribano, J., Alonso, G. L., Coca-Prados, M., Fernández, J .A., 1996. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (Crocus sativus L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. Cancer Lett 100(2): 23-30
12. Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H., Morimoto, S., Tanaka, H., Kawata, E., Xuan, L. J., Saito, H., Sugiura, M., Molnar, J., Shoyama, J., 1998. Crocin and crocetin derivatives inhibit skin tumour promotion in mice. Phytotherapy Research 12(6): 400 – 404

Archive of SID

www.SID.ir