Archive of SID

Kowsar Medical Journal
Vol. 16, No. 2, Summer 2011
Pages: 79-86

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰
صفحات: ۸۶-۷۹

تاثیر عصاره آبی زعفران (*Crocus sativus L.*) بر ژنوتوکسیسیتی ماکروفاژهای موش سوری

علی زارعی محمودآبادی[1] *PhD*، فروغ شریف[*] *MSc*، مسلم جعفری[2] *MSc*

[*]گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران

[1]"مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی" و "مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی"، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران

[2]گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران

چکیده

اهداف: تخریب اکسیداتیو DNA نقش مهمی در موتاژنز، پیری و سرطان بازی می‌کند. هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر عصاره آبی زعفران بر میزان محافظت DNA درمقابل شکست ناشی از آلودگی به سولفورموستارد در ماکروفاژ و تاثیر احتمالی آن به‌عنوان عامل آنتی‌ژنوتوکسیک بود.

مواد و روش‌ها: تعداد مناسب ماکروفاژ از صفاق موش سوری جدا شد و پس از تایید زنده‌بودن، به‌صورت در شیشه با kMnO4 و سولفورموستارد در حضور و عدم حضور عصاره آبی زعفران تیمار شد. میزان سمیّت ناشی از سولفورموستارد با سنجش MDA و GSH برحسب نانومولار بر میلی‌گرم پروتئین و میزان شکست DNA را به‌روش کامِت و برحسب میزان حرکت DNA در میدان الکتروفورز و درصد DNA باقی‌مانده در هسته سلول ارزیابی شد.

یافته‌ها: میزان MDA در سلول‌های نرمال، سلول‌های تیمارشده با kMnO4، سولفورموستارد و سولفورموستارد+عصاره زعفران به‌ترتیب ۰/۷۱±۹/۶، ۰/۳۲±۲/۴، ۰/۲۱±۲/۵، ۰/۳۹±۴/۸۱ نانومولار بر میلی‌گرم پروتئین و میزان GSH ۰/۸±۱/۹، ۰/۹۵±۹/۴، ۱/۲±۹/۳ و ۰/۵۵±۵/۱ نانومولار بر میلی‌گرم پروتئین بود. در سلول‌های نرمال متوسط حرکت DNA، ۱/۴۳±۲۳/۱ میکرومتر و در سلول‌های تیمارشده با kMnO4، سولفورموستارد و سولفورموستارد+عصاره زعفران به‌ترتیب ۴/۶±۲۸/۳۳، ۴/۴۲±۴۰/۴۵ و ۴/۹۲±۳۹/۷۵ میکرومتر بود. میزان DNA باقی‌مانده در هسته در سلول‌های نرمال، کنترل‌مثبت، سولفورموستارد و سولفورموستارد+عصاره زعفران به‌ترتیب ۳/۶±۹۹/۳، ۳/۸±۲۰/۷، ۴/۳±۲۲/۶۱ و ۴/۸±۶۵/۵ و بیان‌گر تاثیر معنی‌دار عصاره زعفران در کاهش شکست DNA در سلول‌های آلوده به خردل بود.

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر اثرات آنتی‌ژنوتوکسیک عصاره آبی زعفران در محافظت DNA در مقابل شکست اکسیداتیو ناشی از خردل است. مصرف خوراکی این گیاه به صورت مکمل غذایی احتمالاً می‌تواند از عوارض ناشی از این عوامل پیشگیری کند.

کلیدواژه‌ها: عصاره آبی زعفران، تکنیک کامِت، سولفورموستارد، ماکروفاژ، شکست DNA

Effect of *Crocus sativus L.* marine extract on genotoxicity of Syrian mouse macrophages

Zarei Mahmoudabadi A.[1] *PhD*, Sharif F.[*] *MSc*, Jafari M.[2] *MSc*

[*]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[1]"Chemical Injuries Research Center" & "Molecular Biology Research Center",
Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aims: Oxidative damage of DNA is very important in mutagenesis, aging and cancer. The aim of the present study was to estimate the protective effect of aqueous saffron extract on DNA damage in sulfur mustard exposed macrophage cells as a genotoxic agent.

Materials & Methods: Macrophage cells were obtained from mice peritoneum. The viability of cells was determined and then they were treated with KMnO4, SM and SM + saffron extract in culture media. The SM toxicity in macrophage cells was determined using MDA and GSH concentrations (nM/mg protein) and the extent of genotoxicity was investigated using alkaline comet assay and reported as the movement of DNA in electrophoretic field and %DNA remaining in the nucleus.

Results: The concentration of MDA and GSH in normal cells and KMnO4, SM and SM + saffron extract treated cells were respectively 1.9±0.18, 9.4±0.95, 9.3±1.2, 5.1±0.55 and 9.6±0.71, 2.4±0.32, 2.5±0.21, 4.81±0.39 nM/mg protein. The comet result showed that DNA movement in normal cell was 23.1±1.43 µm, but in KMnO4, SM and SM + saffron extract treated cells were respectively 39.75±4.92, 40.45±4.42 and 28.33±4.6 µm. Similarly, the percent of DNA in nucleus in normal, KMnO4, SM and SM+ saffron extract treated cells were respectively %99.3±3.6, 20.7±3.8, 22.61±4.3 and 65.5±4.8 that showed the significant protective effect of saffron extract on reduction of DNA damage in SM contaminated cells.

Conclusion: The results demonstrate the anti-genotoxic effect of saffron aqueous extract against the oxidative damage of DNA caused by SM. However, the genotoxic activity of SM significantly reduced by treatment with aqueous saffron extracts. Therefore, it seems that the oral supplement of saffron aqueous extract can probably prevent the complications of these oxidative agents.

Keywords: Aqueous Saffron Extract, Comet Assay, Sulfur Mustard, Macrophage, DNA damage

---

نویسنده مسئول: فروغ شریف. تمام درخواست‌ها باید به نشانی f_sharif@yahoo.com فرستاده شوند.

دریافت مقاله: ۸۹/۸/۲۳ پذیرش مقاله: ۹۰/۱/۲۷

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) منجر به شکست تک‌زنجیره و دوزنجیره DNA می‌شود که اولین مرحله در بیماری‌های دژنراتیو انسانی نظیر سرطان و پیری است. ROS در شرایط فیزیولوژیک مختلف نظیر دفاع در مقابل میکروارگانیزم‌های پاتوژن، متابولیزم سلولی، تکثیر سلولی، القای مرگ سلولی و پاسخ به عوامل محیطی خاص تولید می‌شود [۱]. سولفورموستارد (SM) عامل آلکیله‌کننده‌ای است که موجب عوارض متعددی می‌شود؛ ازجمله این که از طریق تخلیه سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول منجر به تولید ROS در سلول می‌شود [۲، ۳، ۴]. همچنین سولفورموستارد در بدن به یون سولفونیوم تبدیل شده و DNA را آلکیله می‌کند که در نتیجه منجر به شکست DNA و مرگ سلولی می‌شود [۲، ۵]. ترکیبات مختلفی تحت عنوان جمع‌کننده رادیکال آزاد، مهارکننده مرگ سلولی و عوامل فارماکولوژیک دیگر به‌منظور کاهش اثرات سمی سولفورموستارد در *محیط زنده* و *در شیشه* مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲]. همچنین تاثیر حفاظتی آنتی‌اکسیدان‌های مختلف از جمله ویتامین E، اسیداسکوربیک، گلوتاتیون و معرف‌های تیولی نظیر دی‌تیوتریتول و N– استیل‌سیستئین نیز برعلیه سمیت ناشی از سولفورموستارد گزارش شده است [۱۳، ۱۴]. با توجه به مکانیزم اثر این ترکیبات، به‌منظور کاهش سمیت یا پیشگیری از بروز اثرات سولفورموستارد باید از آلکیلاسیون و تشکیل ROS و اثرات ناشی از آن پیشگیری به‌عمل آورد. مصرف گیاهان دارویی به‌منظور پیشگیری از این اثرات و درمان عوارض آن، سال‌ها است که مورد توجه قرار گرفته است. اخیراً گزارشاتی مبنی بر استفاده از ترکیبات گیاهی به‌منظور مهار جهش‌زایی شیمیایی و اختلالات DNA منتشر شده است [۱۵].

زعفران با نام عمومی *سافرون* و نام علمی *Crocus sativus* از خانواده زنبقیان (ایریداسه) که به گل سلامتی، سلطان ادویه‌ها و طلای سرخ معروف است، از گران‌بهاترین گیاهان زراعی موجود در کره زمین و ارزشمندترین رُستنی ایران است [۱۶]. از قدیم، برخی خواص درمانی از جمله اثرات آرام‌بخش، خلط‌آور، نشاط‌آور، تحریک‌کننده معده، محرک قوه جنسی، برطرف‌کننده اسپاسم و عامل سقط جنین برای زعفران شناخته شده است که در طب سنتی در نقاط مختلف جهان با توجه به این خواص، از زعفران استفاده می‌شود. ترکیبات مهم زعفران کروسین، کروستین و پیکروسین هستند که در فعالیت‌های فارماکولوژیکی آن نقش اصلی را دارند و اثرات درمانی را به آنها نسبت می‌دهند [۱۷]. اثرات ضدسرطانی زعفران ناشی از وجود کارتنوئیدها و کاروتن در آن است. همچنین بر سنتز DNA و RNA سلولی و عملکرد آنزیمی، اثر مهاری داشته و از این طریق با سلول‌های سرطانی مقابله می‌کند [۱۷]. اثرات آنتی‌ژنوتوکسیسیتی عصاره زعفران در اسپرماتوژنز پس از مجاورت با اشعه UV گزارش شده است [۱۸، ۱۹]. مطالعات مختلفی درخصوص جلوگیری از تشکیل ROS و درنتیجه، پیشگیری از بروز عوارض ناشی از آن در گونه‌های مختلف انجام شده است.

هدف از این مطالعه، بررسی اثر حفاظتی عصاره آبی زعفران (کروسین) بر ژنوتوکسیسیتی ناشی از آلودگی با سولفورموستارد در سلول‌های ماکروفاژ موش سوری و مکانیزم اثر احتمالی آن بود.

مواد و روش‌ها

موش سوری نژاد balb/c با متوسط وزن ۳۰–۲۵ گرم، از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهیِ یکی از دانشگاه‌های شهر تهران خریداری شد. آگاروز، آگاروز با نقطه ذوب پایین (LAMPA)، اتیدیوم‌بروماید، RPMI ۱۶۴۰، EDTA، NAOH، تریپان‌بلو، PBS، GSH، اسیدباربیتوریک، ۱، ۱، ۳، ۳ تترا– اتوکسی‌پروپان، پیریدین، اتانول و DTNB از شرکت سیگمای ایالات متحده خریداری شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه خلوص بالا از شرکت مِرک آلمان تهیه شدند.

زعفران مصرفی پس از خریداری (طلاکاران مزرعه؛ ایران) به آزمایشگاه دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل و پس از شناسایی با کد ۴۰۸ ثبت شد. ابتدا پودر کلاله زعفران تهیه شد و پس از حل‌کردن در آب با کمک دستگاه تقطیر، عصاره آبی آن به‌دست آمد. برای این منظور، ۱۰۰ گرم از پودر کلاله خشک‌شده در یک مخزن شیشه‌ای ریخته شد و پس از افزودن ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن، برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. سپس محلول رویی از یک صافی عبور داده شد و به‌مدت یک هفته در دستگاه بن‌ماری با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا آب عصاره به‌آرامی تبخیر و پودر عصاره به‌دست آید. با این روش از هر ۱۰۰ گرم پودر کلاله، ۲۵ گرم عصاره حاصل شد. در آزمایشات، این عصاره در سالین حل شده و به‌صورت داخل‌صفاقی به حیوانات تزریق شد. عصاره به‌دست‌آمده با کروسین استاندارد توسط HPLC مورد بررسی قرار گرفت که حاوی ۲۳٪ کروسین بود.

جداسازی ماکروفاژها: سلول‌های ماکروفاژ از صفاق موش سوری و از طریق شست‌وشوی صفاق موش توسط بافر PBS استریل جمع‌آوری شدند. سپس میزان بقای سلول‌های جمع‌آوری‌شده با استفاده از تریپان‌بلو مورد بررسی قرار گرفت که معادل ٪۹۵ بود [۲۰]. سلول‌ها با RPMI ۱۶۴۰ شست‌وشو داده شدند و سپس برای ادامه کار، تعداد ۱×۱۰^{۶} سلول در محیط RPMI ۱۶۴۰ با حجم نهاییِ یک میلی‌لیتر تهیه و انکوبه شد.

تیمار ماکروفاژها: سولفورموستارد با غلظت ۱۸۰ میکرومولار در ایزوپروپانول و براساس مطالعات قبلی تهیه شد [۲۱، ۲۲]. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول سولفورموستارد به هر چاهک حاوی سلول ماکروفاژ افزوده شد، در حالی که به سه چاهک به‌عنوان پیش‌درمان ۳۰ دقیقه قبل از افزودن سولفورموستارد، غلظت‌های ۲۲۵، ۴۵۰ و ۹۰۰ میکروگرم عصاره و به سه چاهک دیگر ۳۰ دقیقه پس از افزودن

www.SID.ir

Archive of SID

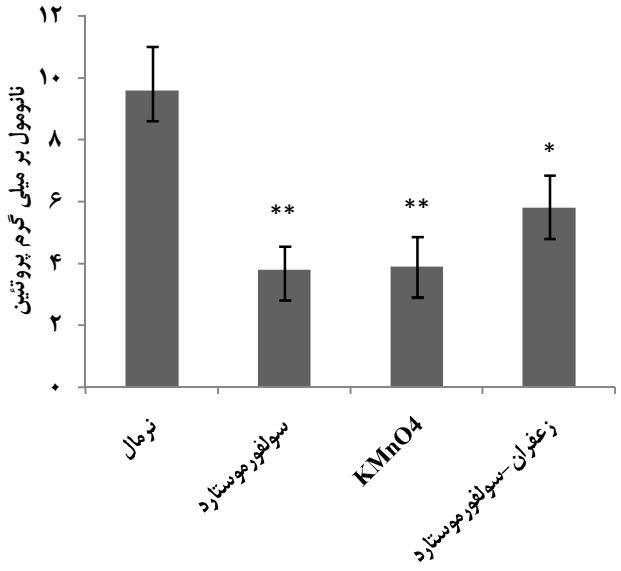
سولفورموستارد، غلظت‌های فوق افزوده شد و کلیه سلول‌ها به‌مدت ۶۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به سلول‌های کنترل و سلول‌هایی که فقط سولفورموستارد دریافت کرده بودند، به‌طور همزمان حجم مساوی PBS افزوده شد. به نمونه کنترل مثبت، ۲۰۰ میکرولیتر $KMnO_4$ با غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار با شرایط مشابه با سایر گروه‌ها اضافه شد. پس از پایان انکوباسیون، مجدداً میزان بقای سلول‌ها تعیین شد و از آنها برای بررسی ژنوتوکسیسیتی استفاده شد.

سنجش گلوتاتیون (GSH): به‌منظور بررسی تاثیر سولفورموستارد روی سلول ماکروفاژ قبل از سنجش فاکتورهای ژنوتوکسیسیتی، برخی فاکتورهای اکسیداتیو نظیر GSH و مالون‌دی‌آلدئید (MDA) نیز سنجیده شدند. برای این منظور، سلول‌های ماکروفاژ با کمک اسیدسولفوسالیسیلیک ۴٪ و روی یخ، هموژنه شده و سپس در ۱۲۰۰۰ دور به‌مدت ۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. از مایع رویی آن برای سنجش GSH با کمک روش *موورن* [۲۳] استفاده شد. به‌طور مختصر، عصاره سلول با تری‌کلرواستیک‌اسید ۲۵٪، مخلوط و در ۲۰۰۰ دور به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی حاصل با بافر فسفات (۰/۲ مولار و pH=۸) به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد و با ۲ میلی‌لیتر از DTNB ۰/۶ میلی‌مولار، مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. سپس جذب آن در طول موج ۴۱۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Thermo Spectronic؛ ایالات متحده) سنجیده شد و میزان GSHبا کمک منحنی استاندارد، تعیین و برحسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

سنجش مالون‌دی‌آلدئید (MDA): MDA (محصول حاصل از لیپیدپراکسیداسیون ناشی از تاثیر خردل بر غشای سلول) با کمک تیوباربیتوریک‌اسید و با استفاده از روش *اُکاوا* [۲۴] سنجیده شد. برای این منظور سلول‌ها با کمک KCl سرد ۱/۵ مولار لیز شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره سلول با ۱۰۰ میکرولیتر از آب دوبار تقطیر و ۵۰ میکرولیتر از SDS ۸/۱٪ مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. ۰/۳۷۵ میلی‌لیتر اسیداستیک ۲۰٪ همراه با ۰/۳۷۵ میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک‌اسید ۰/۶٪ به نمونه، افزوده و به‌مدت ۶۰ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. پس از سردشدن نمونه‌ها، ۲۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر و ۱/۲۵ میلی‌لیتر مخلوط نرمال بوتانول و پیریدین به نسبت ۱۵:۱ به آن افزوده و پس از مخلوط‌نمودن در ۵۰۰ دور به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد تا فازها جدا شوند. سپس جذب فاز بوتانول در ۵۳۲ نانومتر سنجیده شد. در این واکنش از ۱، ۱، ۳، ۳ تترا- اتوکسی‌پروپان با همان شرایط لوله‌های آزمایش به‌عنوان استاندارد عمل استفاده شد و میزان MDA به‌صورت نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه و گزارش شد.

سنجش میزان شکست DNA: میزان شکست تک‌زنجیره و دوزنجیره DNA با استفاده از روش کامت سنجیده شد [۲۵]. به‌طور اختصار، ۲۵ میکرولیتر از سلول‌های تیمارشده با محلول ۰/۶٪ از LAMPA در PBS به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد و ۷۵ میکرولیتر از آن (که حاوی ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ سلول بود)، روی مرکز اسلایدی که قبلاً با آگاروز ۰/۵٪ پوشانده شده بود، قرار گرفت و در تاریکی و دمای اتاق خشک شد. سپس به‌منظور شکست غشاهای پلاسمایی و هسته در سلول، به‌مدت یک ساعت در تاریکی و ۴ درجه سانتی‌گراد در بافر لیزکننده (تریس- بِیس ۱۰ میلی‌مولار؛ pH=۸) انکوبه شد. در ادامه، اسلایدها در محلول سود با pH=۱۳ قرار گرفتند تا دو زنجیره DNA از هم باز شوند. سپس اسلایدها در محیط قلیایی (pH=۱۳؛ NaOH) و ولتاژ ۰/۷ ولت به‌ازای هر سانتی‌متر مربع ژل به‌مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند. پس از آن، pH اسلایدها با قراردادن آنها در بافر خنثی‌کننده (تریس- بِیس ۰/۴ مولار، pH=۷/۵، به‌مدت ۱۵ دقیقه) خنثی شد و آنها در دمای اتاق قرار گرفتند تا خشک شوند. سپس با افزودن محلول اتیدیوم‌بروماید، میزان حرکت DNA در میدان الکتریکی با استفاده از میکروسکوپ فلورسانت (Zeiss؛ آلمان) تعیین و عکس گرفته شد. با کمک نرم‌افزار Comet Score فاکتورهای تعریف‌شده‌ای از روی عکس‌های الکتروفورز به مقادیر کمی تبدیل شد و فاکتورهای شاخص شکست DNA (درصد DNA در سر، درصد DNA در دم، میزان جابه‌جایی دنباله) به‌طور کمی تعیین شدند.

آنالیز آماری: نتایج به‌صورت میانگین±انحراف‌معیار گزارش شد. داده‌های مربوط به شاخص‌های کامت در هر غلظت با استفاده از آزمون T دانشجویی مقایسه شد. آنالیز واریانس برای مقایسه تغییرات شاخص‌ها در غلظت‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت. $p<0/05$ به‌عنوان مرز معنی‌داربودن نتایج در نظر گرفته شد.



نمودار ۱) میزان GSH در سلول‌های ماکروفاژ تیمارشده با سولفورموستارد، $KMnO_4$ و عصاره زعفران (n=۶) (*p<۰/۰۵ در مقایسه با سولفورموستارد، **p<۰/۰۰۱ در مقایسه با سلول نرمال)

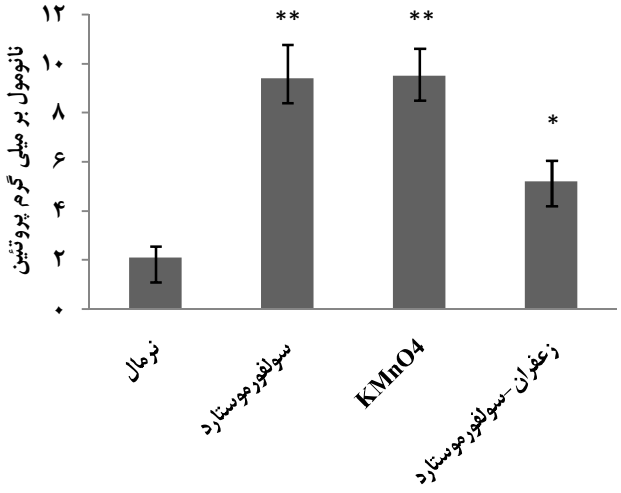
www.SID.ir

Archive of SID

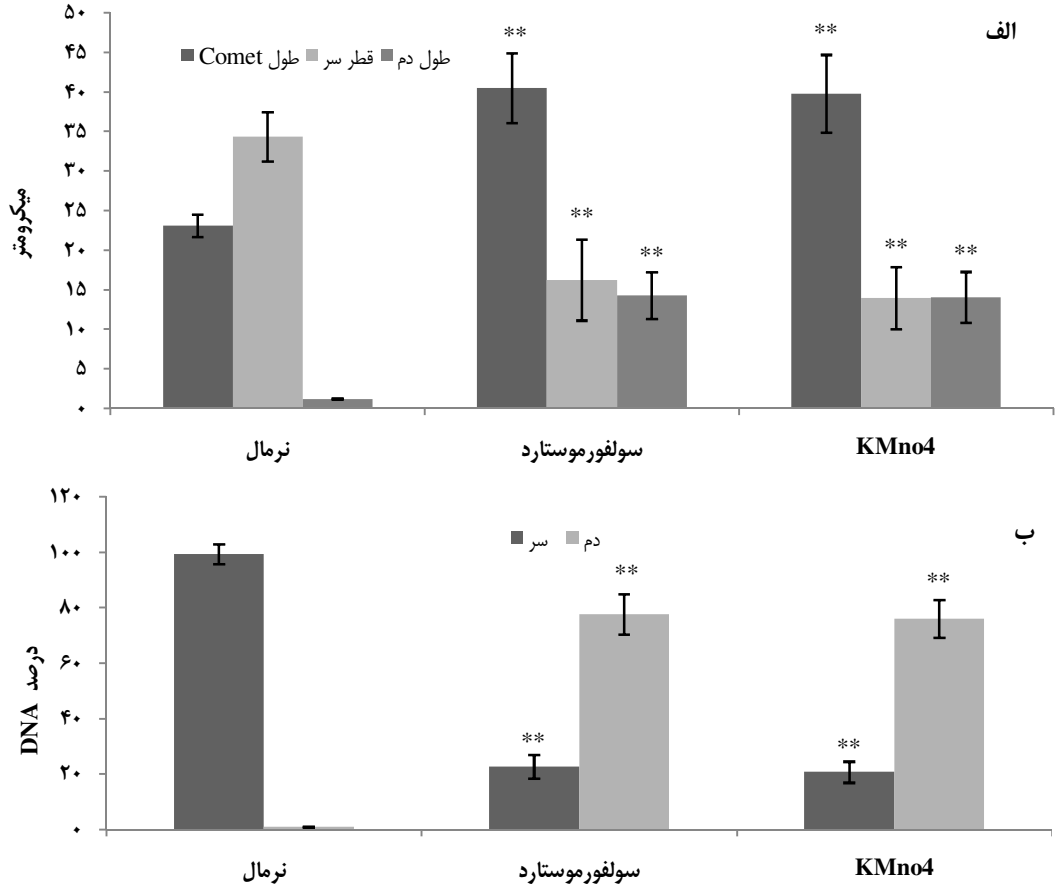
نتایج

بررسی القای سمیت با سولفوروموستارد در سلول‌های ماکروفاژ: در سلول‌های تیمارشده با سولفوروموستارد و $KMnO_4$، میزان GSH سلولی کاهش معنی‌داری را در مقایسه با نمونه نرمال نشان داد و تیمار سلول‌ها با عصاره زعفران موجب تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی و افزایش معنی‌دار در غلظت GSH شد (نمودار ۱). میزان MDA در سلول‌های آلوده به خردل در مقایسه با سلول‌های نرمال و سلول‌های تیمارشده با عصاره زعفران، افزایش معنی‌دار نشان داد (نمودار ۲).

بررسی ژنوتوکسیسیتی در سلول‌های ماکروفاژ: سولفوروموستارد با غلظت ۱۸۰ میکرومولار به‌صورت *در شیشه* (Invitro) به‌طور معنی‌داری موجب شکست هر دو زنجیره DNA شد (شکل ۱). $KMnO_4$ به‌عنوان یک عامل اکسیدان قوی و کنترل مثبت نیز موجب شکست دو زنجیره DNA شد که میزان شکست با سولفوروموستارد قابل مقایسه بود (نمودار ۳). افزودن عصاره زعفران قبل از آلودگی با سولفوروموستارد (پیش‌درمان)، شاخص‌های مورد سنجش شکست DNA را به‌طور معنی‌داری کاهش داد (نمودار ۴). افزایش همزمان عصاره با خردل نیز موجب کاهش تاثیرات مخرب سولفوروموستارد شد، هرچند اثرات ضعیف‌تری مشاهده شد (نمودار ۵). افزایش عصاره به‌صورت پس‌تیمار هیچ‌گونه تاثیر معنی‌داری ایجاد نکرد (نمودار ۶).



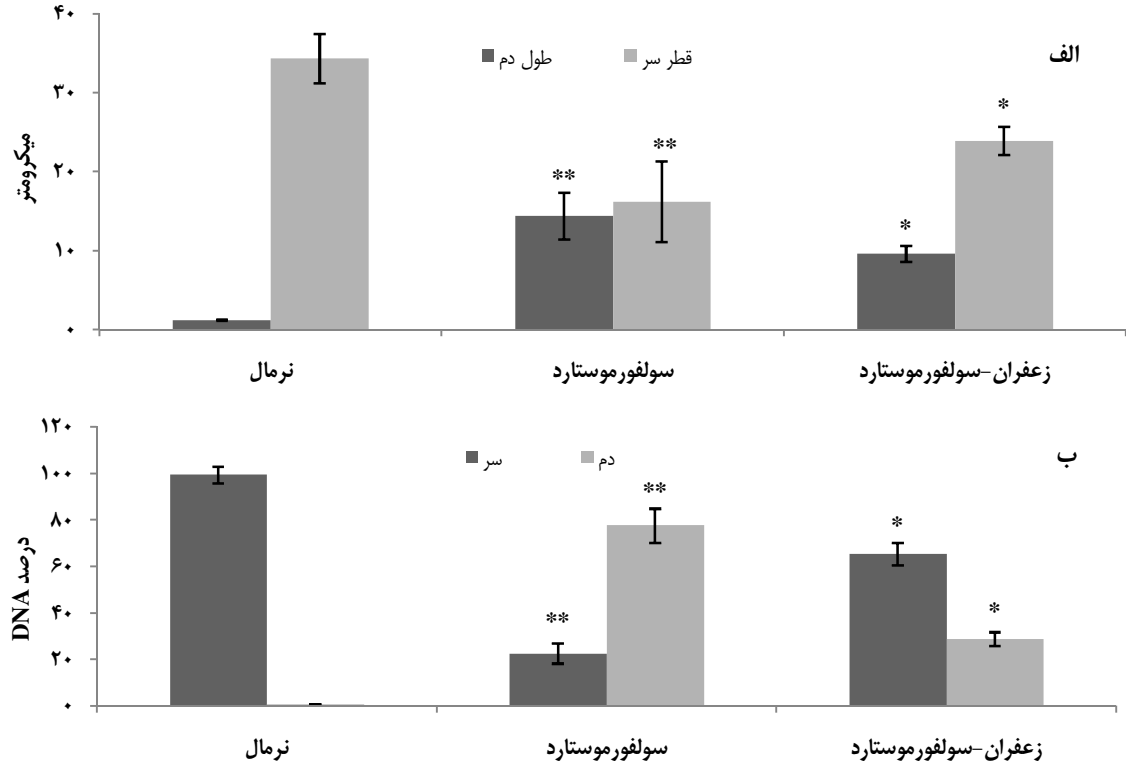
نمودار ۲) میزان MDA در سلول‌های ماکروفاژ تیمارشده با سولفوروموستارد، $KMnO_4$ و عصاره زعفران (n=۶) (p<۰/۰۵* در مقایسه با سولفوروموستارد، p<۰/۰۰۱** در مقایسه با سلول نرمال)



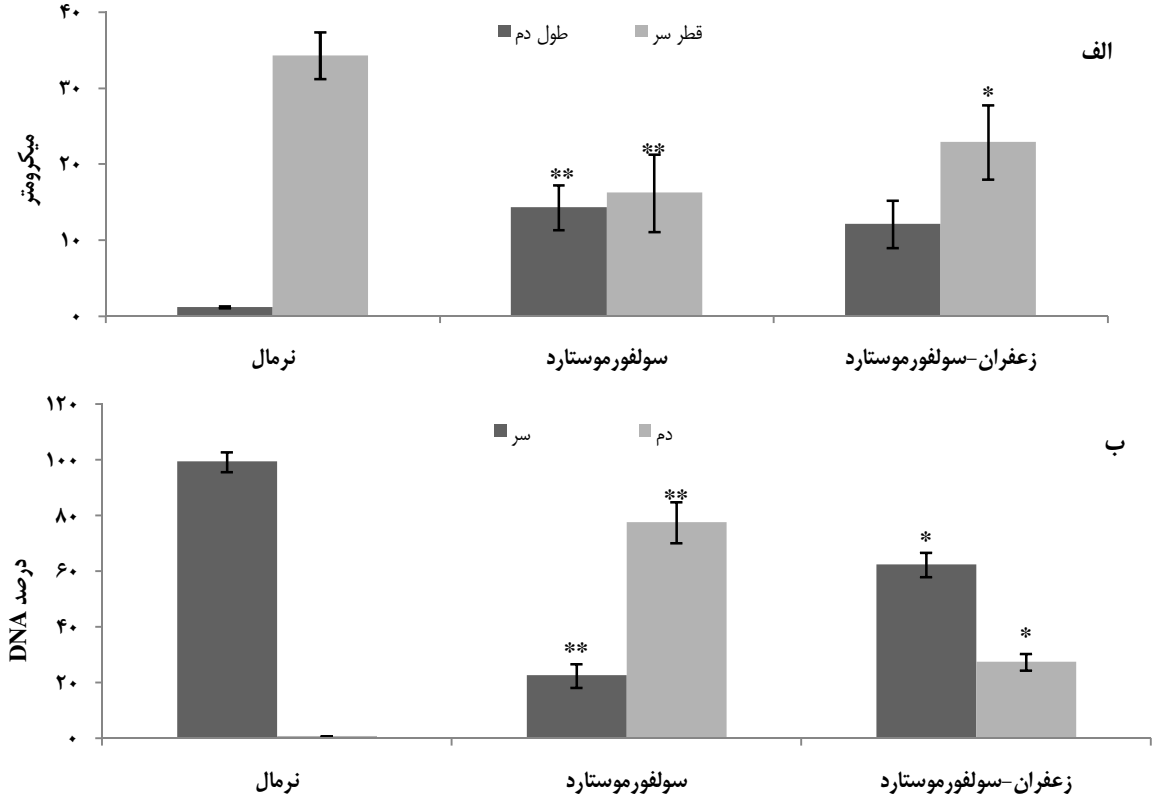
نمودار ۳) مقایسه شاخص‌های ژنوتوکسیسیتی ناشی از آلودگی با سولفوروموستارد (۱۸۰ میکرومولار) و $KMnO_4$ (۰/۲۵ میلی‌مولار) در سلول ماکروفاژ با استفاده از روش Comet assay (n=۱۰۰) الف) مقایسه قطر سر، طول Comet و طول دم برحسب میکرومتر، ب) مقایسه درصد DNA در سر و درصد DNA در دم (p<۰/۰۵* در مقایسه با سولفوروموستارد، p<۰/۰۰۱** در مقایسه با سلول نرمال).

www.SID.ir

Archive of SID



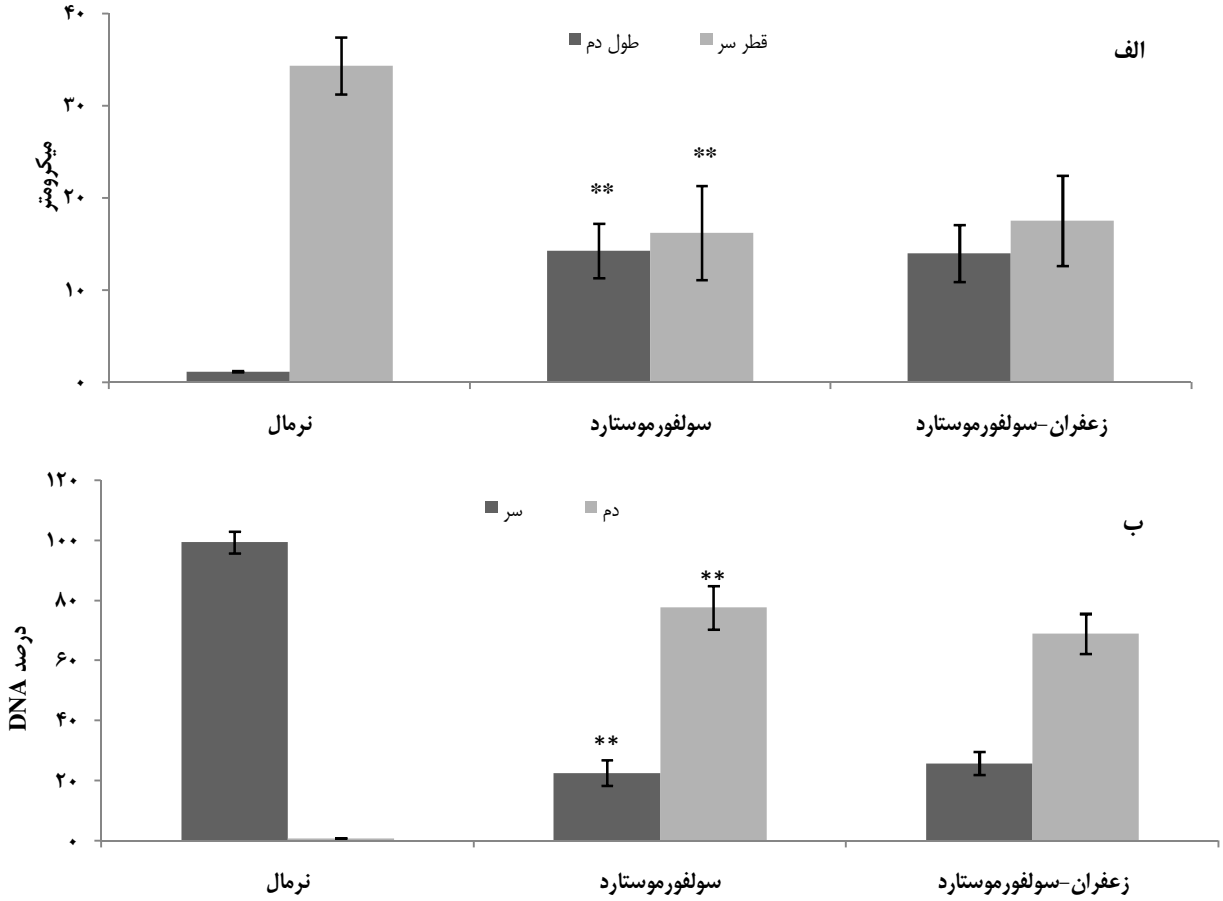
نمودار ۴) مقایسه تاثیر عصاره آبی زعفران بر میزان ژنوتوکسیسیتی ناشی از آلودگی با سولفورموستارد (۱۸۰ میکرومولار) در سلول ماکروفاژ با استفاده از روش Comet assay در شرایط افزایش عصاره به‌صورت پیش‌تیمار (۳۰ دقیقه) نسبت به سولفورموستارد (n=۱۰۰) الف) مقایسه قطر سر و طول دم برحسب میکرومتر، ب) مقایسه درصد DNAپ در سر و دم (p<۰/۰۵* در مقایسه با سولفورموستارد، p<۰/۰۰۱** در مقایسه با سلول نرمال)



نمودار ۵) مقایسه تاثیر عصاره آبی زعفران بر میزان ژنوتوکسیسیتی ناشی از آلودگی با سولفورموستارد (۱۸۰ میکرومولار) در سلول ماکروفاژ با استفاده از روش Comet assay در شرایط افزایش عصاره به‌صورت همزمان با سولفورموستارد (n=۱۰۰)
الف) مقایسه قطر سر و طول دم برحسب میکرومتر، ب) مقایسه درصد DNA در سر و دم
(p<۰/۰۵* در مقایسه با سولفورموستارد، p<۰/۰۰۱** در مقایسه با سلول نرمال)

www.SID.ir

Archive of SID

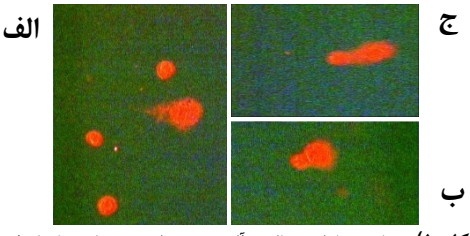


نمودار ۶) مقایسه تاثیر عصاره آبی زعفران بر میزان ژنوتوکسیسیتی ناشی از آلودگی با سولفورموستارد (۱۸۰ میکرومولار) در سلول ماکروفاژ با استفاده از روش Comet assay در شرایط افزایش عصاره ۳۰ دقیقه پس از آلودگی با سولفورموستارد (n=۱۰۰)
الف) مقایسه قطر سر و طول دم برحسب میکرومتر، ب) مقایسه درصد DNA در سر و دم
(*p<۰/۰۵ در مقایسه با سولفورموستارد، **p<۰/۰۰۱ در مقایسه با سلول نرمال).

جدول ۱) مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی زعفران (پیش‌تیمار) بر میزان ژنوتوکسیسیتی ناشی از آلودگی با سولفورموستارد (۱۸۰ میکرومولار) در سلول ماکروفاژ با استفاده از روش Comet assay (n=۱۰۰)

گروه← / شاخص↓	نرمال	سولفورموستارد	زعفران (۲۵ میلی‌مولار)	زعفران (۵۰ میلی‌مولار)	زعفران (۱۰۰ میلی‌مولار)
طول Comet (میکرومتر)	۲۳/۱±۱/۴۳	۴۰/۴۵±۴/۴۲	۳۵/۵۵±۴/۱۲	۳۲/۲۵±۳/۳۷*	۳۲/۴±۴/۱۵*
قطر سر (میکرومتر)	۳۴/۳±۳/۱	۱۶/۲۲±۵/۱	۱۸/۸±۴/۷۸*	۲۱/۵۴±۳/۷۶**	۲۶/۲±۵/۷*
طول دم (میکرومتر)	۱/۲±۰/۰۹	۱۴/۲۸±۲/۹۴	۱۱/۵۴±۶/۲	۹/۳۳±۴/۶**	۹/۶±۱/۰۱*
درصد DNA در سر	۹۹/۳±۳/۶	۲۲/۶۱±۴/۳	۴۸/۱۴±۴/۹۹**	۶۰/۱۷±۹/۳۵**	۶۵/۵±۴/۸**
درصد DNA در دم	۰/۹±۰/۰۶	۷۷/۶±۷/۳	۶۸/۲۷±۴/۶۵**	۳۷/۲۳±۳/۶۵**	۲۷/۶±۳**

(**p<۰/۰۰۱ ،*p<۰/۰۵)



شکل ۱) تصاویر سلول نرمال و آلوده به سولفورموستارد حاصل از Comet با بزرگ‌نمایی ۴۰۰؛ الف) ماکروفاژ نرمال، ب) ماکروفاژ آلوده به سولفورموستارد

نتایج بررسی تاثیر وابسته به غلظت عصاره زعفران، بیانگر تقویت اثرات آنتی‌ژنوتوکسیسیتی عصاره در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار بود. ولی با به‌کارگیری غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار به نسبت افزایش غلظت، کاهش اثرات مشاهده نشد (جدول ۱).

بحث

تحقیقات در زمینه اثر زعفران روی سلول‌های نئوپلاستیک در دهه

www.SID.ir

Archive of SID

گذشته، بیانگر اثرات آنتی‌کارسینوژنیک و ضدتوموری زعفران و ترکیبات حاصل از آن به‌صورت *در شیشه* و *در محیط زنده* بوده است [۲۴، ۲۵، ۲۶]. طبق نتایج حاصل از مطالعات، تجویز خوراکی عصاره زعفران با روش وابسته به دوز موجب مهار رشد تومور آسیت موش، کارسینوم آسیت ارلیخ و همچنین آسیت دالتون لنفوما شده و طول زندگی موش‌های تیمارشده را ۲ تا ۳برابر افزایش داده است. گزارشات دیگر حاکی است که دوز غیرسمی ماده موثره کروسین، اثرات ژنوتوکسیک و نئوپلاستیک بنزوپیرین را در رده سلولی C3H1OT1/2 مهار می‌کند [۲۷]. بنابراین نتایج حاصل از مطالعات مختلف *در محیط زنده*، بیانگر تاثیر معنی‌دار عصاره زعفران و اجزای خالص‌شده آن بر افزایش طول مدت حیات حیوانات مبتلا به انواع تومورها است، هرچند به مکانیزم اثر آن اشاره‌ای نشده است.

مطالعه حاضر با توجه به کاربرد گسترده سولفورموستارد به‌عنوان عامل آلکیله‌کننده و اکسیدان قوی در جنگ‌ها و بروز عوارض شدید و گاهی غیرقابل درمان در مصدومان انجام شد. ابتدا به‌منظور تایید تاثیر اکسیداتیو سولفورموستارد روی ماکروفاژ، میزان گلوتاتیون و MDA قبل و بعد از آلودگی با سولفورموستارد در هموژن سلول اندازه‌گیری شد. افزایش معنی‌دار در میزان MDA و کاهش در میزان گلوتاتیون بیانگر تاثیرات اکسیداتیو سولفورموستارد روی ماکروفاژ است و تیمار ماکروفاژ آلوده به سولفورموستارد موجب کاهش معنی‌دار در میزان MDA و افزایش در میزان گلوتاتیون می‌شود که بیانگر اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره زعفران است. سپس اثرات ژنوتوکسیسیتی سولفورموستارد روی سلول ماکروفاژ با کمک تکنیک کامت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل بیانگر آن است که سولفورموستارد به‌شدت اسیدهای نوکلئیک سلول‌های ماکروفاژ را تحت تاثیر قرار داده و موجب شکست تک یا هر دو زنجیره DNA می‌شود. به‌علاوه، سولفورموستارد از طریق تشکیل اتصالات عرضی در زنجیره DNA موجب فشردگی در DNA می‌شود. هر دو مورد فوق در سلول‌های مورد مطالعه مشاهده شد، به‌طوری که در بیش از ۹۰٪ سلول‌های مورد مطالعه، در اثر آلودگی با سولفورموستارد، شکست DNA مشاهده شد که منجر به حرکت DNA در میدان الکتریکی و تشکیل کامت شد و کمتر از ۵٪ سلول‌ها به‌صورت فشرده و کوچک‌تر از سلول‌های نرمال بودند که ناشی از اتصالات عرضی است. تیمار سلول‌ها با عصاره زعفران (کروسین) موجب کاهش معنی‌دار در میزان شکست DNA و در نتیجه، کاهش طول کامت و افزایش درصد DNA در هسته (به‌عنوان یک شاخص معتبر از میزان شکست DNA) و تبدیل سلول‌ها به فرم طبیعی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزایش عصاره زعفران قبل از آلودگی با سولفورموستارد موجب کاهش معنی‌دار در ژنوتوکسیسیتی ناشی از سولفورموستارد می‌شود، ولی افزایش همزمان یا افزایش عصاره ۳۰ دقیقه بعد از آلودگی با سولفورموستارد، تاثیر چندانی در بهبود عوارض آن ندارد. چون سولفورموستارد از طریق کاهش سیستم آنتی‌اکسیدان و تولید ROS و همچنین تبدیل به یون سولفونیوم [۲۸] موجب اتصال به DNA و شکست زنجیره‌های DNA می‌شود، لذا احتمالاً عصاره آبی زعفران (کروسین) به‌عنوان عامل آنتی‌اکسیدان عمل کرده و از تولید ROS یا از تشکیل یون سولفونیوم جلوگیری می‌کند. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره زعفران دارای اثرات پیشگیرانه است، ولی تاثیر چندانی در حذف یا درمان اثرات ایجادشده ندارد. در مطالعه دیگری که با استفاده از عصاره زعفران به‌همراه عصاره سیر صورت گرفته، نتایج مشابهی مشاهده شده است که بیانگر اثرات آنتی‌ژنوتوکسیسیتی روی سلول‌های مغز استخوان موش است و نشان می‌دهد که عصاره سیر به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدان موجب تقویت اثر زعفران می‌شود [۲۹، ۳۰]. با توجه به موارد مشاهده‌شده، زعفران به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مناسب می‌تواند به‌صورت مکمل غذایی برای جلوگیری از بروز عوارض ژنوتوکسیسیته ناشی از اثرات اکسیداتیو مربوط به کارسینوژن‌های محیطی، از جمله سولفورموستارد مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

عصاره آبی زعفران در محافظت DNA در مقابل شکست اکسیداتیو ناشی از سولفورموستارد، اثرات آنتی‌ژنوتوکسیسیتی دارد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که مصرف خوراکی این گیاه به‌صورت مکمل غذایی، احتمالاً می‌تواند از عوارض ناشی از این عوامل پیشگیری کند.

منابع

1- Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. Free Radic Biol Med. 2007;43(4):477-503.

2- Papirmeister B, Feister AJ, Robinson SI, Ford RD. Medical defense against mustard gas: Toxic mechanisms and pharmacological implications. Boca Raton: CRC Press; 1991.

3- Wormser U. Toxicology of mustard gas. Trends Pharmacol Sci. 1991;12(4):164-7.

4- Lakshmana Rao PV, Vijayaraghavan R, Bhaskar ASB. Sulfur mustard-induced DNA damage in mice after dermal and inhalation exposure. Toxicology. 1999;139(1-2):39-51.

5- Somani SM, Babu SR. Toxicodynamics of sulfur mustard. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol. 1989;27(9):419-35.

6- Vijayaraghavan R, Sugendran K, Pant SC, Husain K, Malhotra RC. Dermal intoxication of mice wih bis (2-chloroethyl) sulfide and the protective effect of flavonoids. Toxicology. 1991;69(1):35-42.

7- Gross CL, Innace JK, Hovatter RC, Meier HL, Smith WJ. Biochemical manipulation of intracellular glutathione levels influences cytotoxicity to isolated human lymphocytes by sulfur mustard. Cell Biol Toxicol. 1993;9(3):259-68.

8- Lindsay CD, Hambrook JL, Lailey AF. Monoisopropylglutathione ester protects A549 cells from cytotoxic effects of sulfur mustard. Hum Exp Toxicol. 1997;16(11):636-44.

9- Meier HL, Johnson JB. The determination and prevention of cytotoxic effects induced in human lymphocytes by alkylating agent 2, 2'-dichloroethyl sulfide (sulfur mustard, HD). Toxicol

www.SID.ir

Archive of SID

Appl Pharmacol. 1992;113(2):234-9.
10- Vojvodic V, Milosavljevic Z, Boskovic B, Bojanic N. The protective effect of different drugs in rats poisoned by sulfur and nitrogen mustards. Fundam Appl Toxicol. 1985;5(6):S160-8.
11- Bhattacharya R, Lakshmana Rao PV, Pant SC, Kumar P, Tulsawani RK, Pathak U, et al. Protective effects of amifostine and its analogues on sulfur mustard toxicity in vitro and in vivo. Toxicol Appl Pharmacol. 2001;176(1):24-33.
12- Walker IG, Smith WJ. Protection of L-cells by thiols against the toxicity of sulfur mustard. Can J Physiol Pharmacol. 1969;47(2):143-51.
13- Das SK, Mukherjee S, Smith MG, Chatterjee D. Prophylactic protection by N-acetylcesteine against the pulmonary injury induced by 2-chloroethyl sulfide: A mustard analogue. J Biochem Mol Toxicol. 2003;17(3):177-84.
14- Shih MN, Korte WD, Smith JR, Szafraniec LL. Reactions of sulfides with S-330: A potential decontaminant of sulfur mustard in formulations. J Appl Toxicol. 1999;19(1):83-8.
15- Ferguson LR. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. Mutat Res. 1994;307(1):395-410.
16- Verma SK, Bordia A. Antioxidant property of saffron in man. Indian J Med Sci. 1998;52(5):205-7.
17- Abdullaev FI, Espinosa A. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. Cancer Detect Prev. 2004;28(6):426-32.
18- Vijayaraghavan R, Kumar P, Dubey DK, Singh R. Evaluation of CC2 as a decontaminant in various hydrophilic and lipophilic formulations against sulfur mustard. Biomed Environ Sci. 2002;15(1):25-35.
19- Bhattacharya R, Lakshmana Rao PV. Pharmacological interventions of cyanide-induced cytotoxicity and DNA damage in isolated rat thymocytes and their protective efficacy in vivo. Toxicol Lett. 2001;119(1):59-70.
20- Gad SC. In vitro toxicology. 2nd ed. New York: Academic Press; 2000.
21- Zaree A, Saberi M, Pyrzad J, Golmanesh L. Investigation of acetaminophen induction effects on GSH concentration by N-acetylcysteine and 2-oxothyazolidin-4-carboxylate (OTC) and its protective effect on sulfur mustard injures in H2FF cells. Kowsar Med J. 2005;10(3):21-31. [Persian]
22- Zaree Mahmoudabady AB, Saberi M, Pirzad J. Critical role of GSH in sulfur mustard induced oxidative stress and cytotoxicity in human skin fibroblast cell line. Iran J Pharmaceut Res. 2008;7(1):35-41. [Persian]
23- Moron MS, Kepierre JW, Mannervick B. Levels of glutathione reductase and glutathione-s-transferase activities in rat lung and liver. Biochim Biophys Acta. 1979;582(1):67-78.
24- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Ann Biochem. 1979;95(2):351-8.
25- Escribano J, Diaz-Guerra MJ, Riese HH, Alvarez A, Proenza R, Fernandez JA. The cytotoxic effect of glucoconjugate extracted from corms of saffron plant (Crocus sativus) on human cell lines in culture. Planta Med. 2000;66(2):157-62.
26- Abdullaev FI, Riveron Negrette L, Rotenburd Belacortu V, Kasumov FJ, Perez Lopez I, Hernandes JM, et al. Saffron as chemopreventive agent. In: Wenyi T, editor. Food of 21st century: Food and resource technology environment. China: Light Industry Press; 2000.
27- Molnar J, Szabo D, Pusztai R, Mucsi I, Berek L, Ocsovski I, et al. Membrane associated antitumor effects of crocine-, ginseniside- and cannabinoid derivates. Anticancer Res. 2000;20(2):861-7.
28- Chang VC, Lin YL, Lee MJ, Show SJ, Wang CJ. Inhibitory effect of crocetin on benzo(a)pyrece genotoxicity and neoplastic transformation in C3H1OT1/2 cells. Anticancer Res. 1996;765:3603-8.
29- Matijasevic Z, Precopio ML, Snyder JE, Ludlum DB. Repair of sulfur mustard-induced DNA damage in mammalian cells measured by a host cell reactivation assay. Carcinogenesis. 2001;22(4):661-4.
30- Kumpati P, Sundramoorthy K, Sathiyavedu T. Interactive effects of saffron with garlic and curcumin against cyclophosphamide induced genotoxicity in mice. Asia Pac J Clin Nutr. 2004;13(3):292-4.

www.SID.ir