

بررسی غلظت‌های مختلف گلوکز بر سمیت سلولی و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و نقش حفاظتی زعفران در سلول PC12

دکتر زهرا طیرانی نجاران^۱، دکتر حیدر پارسایی^۲، دکتر سید هادی موسوی^۳

نویسنده‌ی مسئول: مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده‌ی پزشکی، گروه فارماکولوژی mousaviah@mums.ac.ir

دریافت: ۸۸/۴/۱۸ پذیرش: ۸۸/۱۰/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: نوروپاتی از شایع‌ترین عوارض دیابت است که اعصاب حسی، اتونوم و حرکتی را درگیر می‌کند. هر چند مکانیسم‌های سلولی - ملکولی نوروپاتی دیابتی کاملاً مشخص نگردیده اند، اما با این حال شواهدی از افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در ارتباط با این پدیده، وجود دارد. عصاره‌ی زعفران و بعضی از اجزای آن دارای اثرات آنتی اکسیدان می‌باشند. مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین اثرات محافظت‌کننده‌ی احتمالی عصاره‌ی هیدروالکلی زعفران، در مرگ سلولی ناشی از گلوکز در سلول عصبی PC12 به عنوان یک مدل آزمایشگاهی مناسب در مطالعات عصبی انجام گردید.

روش بررسی: سمیت سلولی به روش MTT بررسی شد. اندازه‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن درون سلولی با استفاده از ۲،۷-دی کلرو فلورسئین دی استات (DCF-DA) در دستگاه فلوسیتومتر انجام گردید.

یافته‌ها: گلوکز توانست میزان بقای سلولی را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد. سمیت گلوکز بر سلول‌های PC12 در حضور عصاره‌ی زعفران و گلوکاتینون کاهش یافت. گلوکز همچنین توانست میزان گونه‌های فعال اکسیژن درون سلولی را در سلول‌ها افزایش دهد که این افزایش در حضور زعفران و GSH کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: افزایش گونه‌های فعال اکسیژن یک مداخله‌ی احتمالی در سمیت ناشی از گلوکز در سلول‌های PC12 می‌باشد. همچنین زعفران با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدان می‌تواند به عنوان یک ترکیب امیدبخش در درمان نوروپاتی دیابتی در مطالعات حیوانی مد نظر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: گلوکز، سلول PC12، سمیت سلولی، گونه‌های فعال اکسیژن، زعفران

مقدمه

می‌گردد (۱). نوروپاتی از شایع‌ترین عوارض دیابت است که اعصاب حسی، اتونوم و حرکتی را درگیر می‌کند. هر چند مکانیسم‌های سلولی ملکولی نوروپاتی دیابتی کاملاً مشخص

بیماری دیابت شیرین یک مشکل بهداشتی در سراسر جهان است که حدود یک تا دو درصد افراد جامعه به آن مبتلا هستند. این بیماری سبب از کارافتادگی و مرگ‌ومیر فراوان

۱- دستیار تخصصی فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۲- دکترای تخصصی فارماکولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی

۳- دکترای تخصصی فارماکولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مرکز تحقیقات سم شناسی پزشکی

نگریده‌اند، شواهدی از افزایش گونه‌های فعال اکسیژن [Reactive Oxygen Species (ROS)] وجود دارد (۲۰۳). بررسی‌های ۲۵ سال اخیر نیز برخی از مسیرهای اصلی متابولیسم گلوکز را در نوروپاتی دیابتی نشان داده، روشن شده که افزایش گلوکز می‌تواند باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و همچنین افزایش فعالیت فاکتور هسته‌ای کاپای بتا NF-kB گردد که در بعضی از رده‌های سلولی از جمله اندوتلیال، مزانشیمال و سلول‌های بتا پانکراس نشان داده شده است (۴). همچنین نشان داده شده است که افزایش ROS در رده‌های سلولی مختلف از جمله PC12 سبب مرگ سلولی می‌گردد (۵). نقش حفاظتی آنتی‌اکسیدان‌ها در ROS ایجاد شده در توکسیسیته ناشی از گلوکز نیز گزارش شده است (۶). با این وجود نقش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به عنوان واسطه‌ی احتمالی نوروتوکسیسیته ناشی از گلوکز در سلول PC12 تاکنون بررسی نگردیده است.

در مجموع از یک طرف افزایش گلوکز سبب اختلالات عصبی می‌گردد و نوروتوکسیک می‌باشد و از طرف دیگر گونه‌های فعال اکسیژن، به عنوان یک واسطه در بیماری‌های نورودژنراتیو شناخته شده است و در رده‌های سلولی مختلف از جمله PC12 سبب مرگ سلولی می‌گردد. با در نظر گرفتن این شواهد، این فرضیه که گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند، واسطه‌ی احتمالی نوروتوکسیسیته ناشی از گلوکز در سلول PC12 باشد، تقویت می‌گردد. در این تحقیق از کشت سلول‌های PC12 که از فئوکروموسایتوما آدرنال موش صحرایی بدست آمده‌اند در محیط‌های با افزایش گلوکز به عنوان یک مدل برون‌تن از نورپاتی دیابتی استفاده گردیده است (۷). تاکنون نقش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به عنوان واسطه‌ی احتمالی نوروتوکسیسیته ناشی از گلوکز در سلول PC12 بررسی نگردیده است. همچنین شواهدی از اثرات آنتی‌اکسیدان عصاره‌ی زعفران و بعضی از اجزای موجود در آن (کروسین، سافرانال) وجود دارد. اثرات

آنتی‌اکسیدان و حفاظت‌کنندگی نرونی کروسین (یکی از اجزای زعفران)، در سلول عصبی PC12 نیز نشان داده شده است (۸ و ۹)، ولی تاکنون این اثرات در نوروتوکسیسیته ناشی از گلوکز در سلول PC12 بررسی نشده است. مهم‌ترین ترکیبات زعفران شامل کروسین، پیکروکروسین و سافرانال می‌باشد. مطالعات گذشته اثرات آنتی‌اکسیدان عصاره‌ی زعفران و بعضی از اجزای موجود در آن را نشان داده‌اند (۸ و ۹). همچنین شواهدی از اثرات آنتی‌اکسیدان زعفران و کاهش گونه‌های فعال اکسیژن در سلول PC12 تحت استرس وجود دارد (۹) و اثرات آنتی‌اکسیدان کروسین در مهار مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو در نرون‌ها، بیشتر از α توکوفرول گزارش شده است. کروسین همچنین مرگ سلول‌های PC12 ناشی از مجاورت با هیدروژن پراکسید (H_2O_2) را به میزان زیادی کاهش می‌دهد (۹ و ۱۰). ولی تاکنون این اثرات در این مدل (مرگ سلولی ناشی از گلوکز در سلول عصبی PC12) بررسی نشده بود. لذا، مطالعه‌ی حاضر جهت تعیین اثرات محافظت‌کننده‌ی احتمالی عصاره‌ی هیدروالکلی زعفران در مرگ سلولی ناشی از گلوکز در سلول عصبی PC12 به عنوان یک مدل آزمایشگاهی مناسب در مطالعات عصبی انجام گرفت. همچنین تعیین ارتباط سمیت سلولی با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و مقایسه‌ی اثرات آنتی‌اکسیدان عصاره‌ی زعفران (کاهش گونه‌های فعال اکسیژن) با اثرات آنتی‌اکسیدان شناخته شده گاما-گلوتامیل-L-سیستینیل-L-گلايسين (GSH) در این مطالعه، انجام گرفت.

روش بررسی

زعفران از شرکت نوین زعفران تهیه گردید. پس از پودر کردن زعفران، عصاره‌گیری با مقدار یک گرم از آن توسط ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درجه به مدت ۲ ساعت در حمام سونیکاتور انجام گردید. پس از حذف اتانول در خلا، عصاره یک شب در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس

GSH با غلظت ۱۰ میلی مولار و زعفران با غلظت ۱۰ و ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر جهت تیمار گروه تجربی در نظر گرفته شد و سلول‌ها در یک روش وابسته به زمان، تحت تیمار قرار گرفتند. بعد از دو پاساژ سلولی، سلول‌ها جهت سنجش توان حیاتی روی ظروف ۹۶ خانه منتقل شده، کشت داده شدند. میزان گونه‌های فعال اکسیژن با اندازه‌گیری هیدروژن پراکسید تولید شده بررسی شد (۱۳). به‌طور خلاصه سلول‌ها پس از تیمار با DCF-DA به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. محیطی به فالكون انتقال داده شد، سلول‌ها تریسینه شده، در همان فالكون جمع‌آوری شدند. پس از دو بار شستشو با PBS، شدت نور فلورسنت DCF-DA با فلوسیتومتر در طول موج تحریک ۴۸۰ و نشر ۵۳۰ نانومتر تعیین گردید. داده‌ها به وسیله‌ی تجزیه‌ی واریانس و میانگین داده‌ها با Duncan Test و اختلاف معنی‌دار با Bonfroni's Test و ANOVA ارزیابی شدند. سطح اطمینان $P < 0.05$ به‌طور آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه جهت سنجش مرگ سلولی، سلول‌ها در معرض افزایش گلوکز به میزان ۳ و ۵ برابر طبیعی (۱۳/۵، ۲۷ میلی گرم در میلی لیتر) محیط کشت در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت قرار داده شدند و برای هرکدام از سلول‌ها یک گروه کنترل در نظر گرفته شد و آزمایش سه بار تکرار شد طبق نمودار ۱ میزان جذب نوریتوان حیاتی سلول‌ها در سنجش و MTT در گروه ۹۶ ساعت، در مجاورت با گلوکز نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.01$). GSH به عنوان یک آنتی‌اکسیدان (۱۳) به منظور بررسی توان آن در کاهش سمیت گلوکز استفاده شد. GSH با غلظت ۱۰ میلی مولار توانست جلوی سمیت ایجاد شده توسط گلوکز در سلول‌های PC12 را بگیرد (نمودار ۲). GSH به تنهایی با غلظت ۱۰ میلی مولار پس از ۴ روز سمیتی نشان

توسط Dryer Freeze آب اضافی حذف گردید. از پودر حاصل غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر در DMSO تهیه گردید و تا انجام آزمایش در -40°C درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۱). سلول‌های PC12 از انستیتو پاستور تهیه شد. سلول‌ها در دمای 37°C درجه و رطوبت ۹۰ درصد و ۵ درصد CO_2 نگه‌داری شدند. سلول‌ها در محیط DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) به‌علاوه‌ی ۵ درصد سرم جنین گاوی [Fetal Bovine Serum (FBS)], Penicillin (50 IU/ml) و Streptomycin (50 $\mu\text{g/ml}$) رشد کردند. غلظت گلوکز در این محیط ۴/۵ میلی گرم در میلی لیتر بود که برطبق دستورالعمل ساخت جهت رشد سلول‌های PC12 مناسب بود. در حالی که این میزان نسبت به غلظت گلوکز سرم انسان به میزان قابل توجهی بالا بود. در این تحقیق بعد از دو پاساژ سلولی، سلول‌ها جهت سنجش توان حیاتی روی ظروف ۹۶ خانه منتقل شده، کشت داده شدند. غلظت ۱۳/۵ و ۲۷ میلی گرم در میلی لیتر جهت تیمار گروه تجربی در نظر گرفته شد و سلول‌ها در یک روش وابسته به زمان تحت تیمار قرار گرفتند.

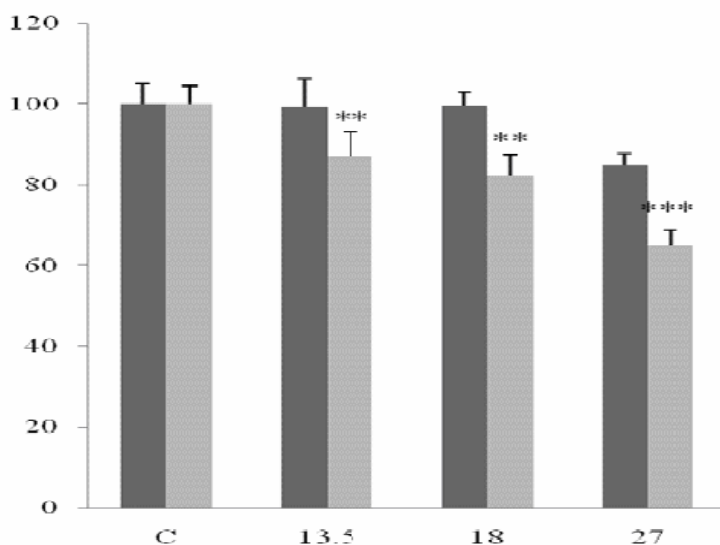
پس از دو پاساژ سلولی جهت سنجش MTT سلول‌های PC12 به میزان ۲۰۰۰ سلول در هر خانه در ظرف ۹۶ خانه در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، و ۹۶ کشت داده شد. توان حیاتی سلول‌ها با استفاده از دی متیل تیازول و دی فنیل تترازولیوم (۱۲) ارزیابی گردید. به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر محلول MTT حل شده در محیط DMEM به غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر به هر کدام از خانه‌های ۹۶ تایی اضافه شد و سلول‌ها برای یک ساعت در انکوباتور در حرارت 37°C درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از اینکه محیط سلول‌ها دور ریخته شد به رسوب (سلول‌ها و بلورهای حاصله از محلول) ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO اضافه شد و جذب نوری آن‌ها در ۵۷۰ نانومتر در دستگاه ELISA Reader بررسی شد. در این تحقیق غلظت ۱۳/۵ و ۲۷ میلی گرم در میلی لیتر گلوکز و

نشان می‌دهد که GSH ۱۰ میلی‌مولار یک‌ساعت پیش از گلوکز در سلول‌های PC12 از میزان گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده به میزان قابل توجهی می‌کاهد. این مساله نشان می‌دهد که گونه‌های فعال اکسیژن نقش مهمی در سمیت ایجاد شده توسط گلوکز دارد.

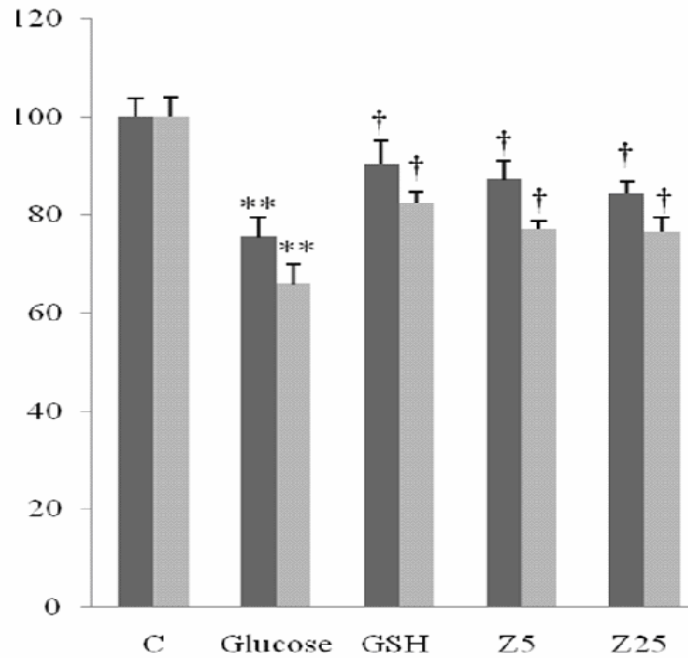
در مرحله‌ی بعد نقش حفاظتی عصاره‌ی زعفران بر تولید گونه‌های فعال اکسیژن در سمیت گلوکز، پس از ۴ روز بررسی شد. همان‌گونه که در نمودار ۳ مشاهده می‌گردد زعفران (۵ و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) یک‌ساعت پیش از گلوکز در سلول‌های PC12، از میزان گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده به میزان قابل توجهی می‌کاهد. این مساله نشان می‌دهد که گونه‌های فعال اکسیژن نقش مهمی در سمیت ایجاد شده توسط گلوکز دارد.

نداد. به منظور بررسی توان آنتی‌اکسیدان زعفران، از این ماده در کاهش سمیت گلوکز در سلول‌های PC12 استفاده شد. نتایج حاکی از آن است که زعفران با غلظت بیشتر از ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث کاهش در تعداد سلول‌های PC12 شده است. لذا غلظت ۵ و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر زعفران برای آزمایشات بعدی انتخاب گردید. زعفران در این غلظت توانست جلوی سمیت ایجاد شده توسط گلوکز در سلول‌های PC12 را بگیرد (نمودار ۲).

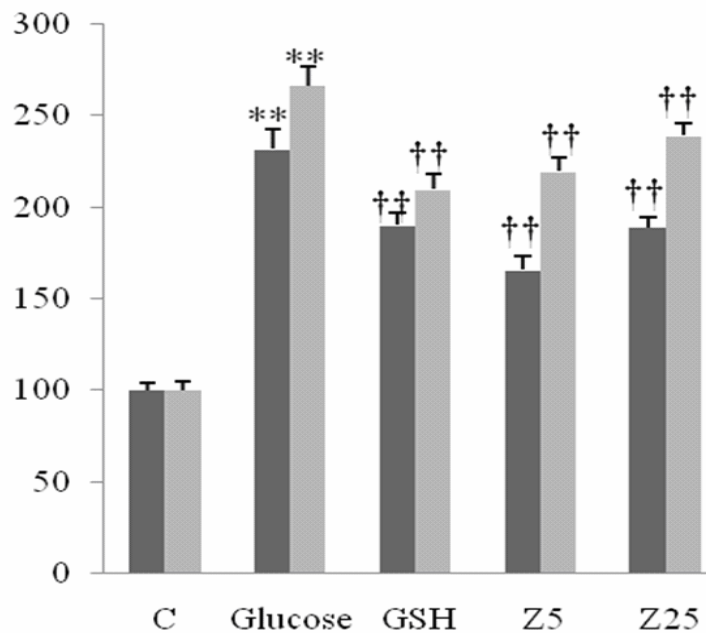
برای بررسی این نکته که سمیت گلوکز احتمالاً به واسطه‌ی تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد، آزمایشات فلوسیتومتری با DCF-DA انجام شد. همانطور که در شکل ۳ دیده می‌شود، پس از ۹۶ ساعت مجاورت با گلوکز (۱۳/۵ و ۲۷ میلی‌گرم در لیتر) در سلول‌های PC12 سطح فلورسنت DCF-DA به میزان قابل توجه افزایش یافته است. شکل ۳



نمودار ۱: سمیت گلوکز در سلول PC12. سمیت سلولی با سنجش MTT بررسی گردید. هر ستون بیانگر میانگین \pm خطای استاندارد در ۶ نمونه است. $P < 0/01$ ، $P < 0/001$ در مقایسه با کنترل



نمودار ۲: اثرات GSH و عصاره‌ی زعفران بر سمیت ایجاد شده توسط گلوکز. هر ستون بیانگر میانگین \pm خطای استاندارد در ۶ نمونه است.
 $P < 0/05$ ، $P < 0/01$ در مقایسه با کنترل، $P < 0/01$ در مقایسه با خلطت بالای گلوکز



نمودار ۳: اثرات GSH و زعفران بر تولید گونه های فعال اکسیژن در سلول های PC12. هر ستون بیانگر میانگین \pm خطای استاندارد در ۶ نمونه است.
 $P < 0/05$ در مقایسه با کنترل، $P < 0/01$ در مقایسه با خلطت بالای گلوکز

بحث

در برخی مطالعات اثرات آنتی اکسیدان عصاره‌ی زعفران و بعضی از ترکیبات آن نشان داده شده است. همچنین شواهدی از اثرات آنتی اکسیدان کروسین و زعفران در کاهش ROS در سلول PC12 نیز وجود دارد (۹). مطالعات نشان می‌دهد که Crocin (یک رنگدانه‌ی کاروتنوئید زعفران) از مرگ سلول‌های PC12 ناشی از فاکتور نکروز تومور α -TNF (جولوگیری می‌نماید (۸ و ۹)). Crocin همچنین از مرگ سلول‌های PC12 که در شرایط فاقد سرم و گلوکز قرار گرفته‌اند، از طریق افزایش سنتز گلوپاتین (GSH) پیشگیری کرده، به این ترتیب فعالیت آنزیم اسفنگومیلیتاز (nSMase) غشای سلولی را مهار می‌نماید (۱۰). اثرات آنتی اکسیدان کروسین در مهار مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو در نرون‌ها، بیشتر از α توکوفرول گزارش شده است (۸). کروسین همچنین مرگ سلول‌های PC12 ناشی از مجاورت با H₂O₂ را به میزان زیادی کاهش می‌دهد (۹). لیکن در برخی مطالعات اثرات آنتی اکسیدانی ضعیفی از عصاره‌ی الکلی زعفران گزارش شده است (۱۷-۱۴) که ضرورت بررسی بیشتر اثرات آنتی اکسیدانی عصاره‌ی زعفران را نشان می‌دهد. افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و همچنین افزایش فعالیت فاکتور هسته‌ای کاپای بتا NF-kB در نتیجه‌ی تاثیر غلظت بالای گلوکز در رده‌های سلولی دیگر مانند اندوتلیال، مزانشیمال و سلول‌های بتا پانکراس (۱۹-۱۷) نشان داده شده است. همچنین در مطالعه‌ی، افزایش ROS در توکسیسیته ناشی از گلوکز در سلول PC12 گزارش شده است. ولی در این مطالعه نقش آن به عنوان مدیاتور این توکسیسیته بررسی نگردیده است (۵).

نقش نیتریک اکسید (NO) در سمیت ناشی از گلوکز در سلول PC12 نیز نشان داده شده است (۲۰). کوشی مورو و همکاران نشان دادند که افزایش گلوکز سبب افزایش غلظت

کلسیم درون سلولی و افزایش نترات و نیتريت (NOx) در سلول PC12 می‌گردد. L-NAME (مهارگر آنزیم NOS) افزایش NOx و سمیت ناشی از گلوکز در سلول PC12 را مهار می‌نماید. در این مطالعه علت احتمالی افزایش NO، افزایش غلظت کلسیم درون سلولی و در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم NOS گزارش شده است (۲۰). هیپرگلیسمیا که تحت دیابت اتفاق می‌افتد، نقایصی مانند نوروپاتی و رتیوپاتی ایجاد می‌کند (۲۱). اگرچه مشخص شده است که هیپرگلیسمیا آسیب نورونی را از طریق مرگ برنامه ریزی شده سلولی یا آپتوزیس القا می‌کند (۲۲)، اما مکانیسمی که به وسیله‌ی آن این القا صورت می‌گیرد، هنوز به درستی روشن نیست. اثر افزایش گلوکز روی بسیاری از تیپ‌های سلولی مطالعه شده، نشان داده که سمیت سطح بالای گلوکز باعث القای آپتوزیس از طریق گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش سطح NO می‌گردد (۲۰). گلوکز تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن را افزایش می‌دهد و مکانیسم مشترکی را ایجاد می‌کند که ممکن است فعالیت MAP کینازها را القا کرده، آپتوزیس را افزایش دهد (۲۴ و ۲۳، ۵). همچنین مطالعات دیگر پیشنهاد می‌کند که جریان کلسیم می‌تواند روی سلول‌های نورونی اثر بگذارد (۲۵). نقش حفاظتی آنتی اکسیدان‌ها در سمیت سلولی گلوکز در سلول‌های PC12 هنوز بررسی نشده است، بنابراین در این مطالعه اثر هیپرگلیسمیا بر سلول‌های تمایز نیافته PC12 به عنوان یک مدل سلولی برای مطالعه‌ی نوروپاتی دیابتی و همچنین نقش حفاظتی زعفران به عنوان یک آنتی اکسیدان در پیشگیری از ایجاد سمیت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که گلوکز می‌تواند توان حیاتی سلول‌های PC12 که تحت تیمار غلظت سه تا شش برابر گلوکز (۱۳/۵ و ۲۷ میلی گرم در لیتر) بوده‌اند را کاهش دهد که این نتایج مطابق با نتایج گذشته است (۲۲). سنجش MTT نشان داد که غلظت ۲۷ و ۱۳/۵ میلی گرم در میلی لیتر گلوکز می‌تواند توان حیاتی

آنتی‌اکسیدان از سمیت ایجاد شده توسط گلوکز بکاهد. این مطالعه اولین گزارش از اثرات زعفران بر سمیت گلوکز به واسطه گونه‌های فعال اکسیژن در مدل سلولی PC12 است. در این مطالعه نشان داده شد که سمیت گلوکز می‌تواند تا حدی به واسطه‌ی ROS باشد. مطالعات بیشتری جهت شناخت مکانیسم‌های درگیر ضروری است.

تقدیر و تشکر

از پشتیبانی‌های علمی، اجرایی مسوولین و کارشناسان محترم مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی مشهد در اجرای این طرح صمصیمانه قدردانی می‌شود. همچنین از زحمات سرکار خانم دکتر نصیرلی در انجام فلوسیتومتری سپاس‌گزاری می‌گردد.

References

- 1- Sheperd PR, Kan BB. Glucose transporters and insulin action-implication for insulin resistance and diabetes mellitus. *Engl J Med*. 1999; 341:248-57.
- 2- Greene DA, Sima AAF, Stevens MJ, Feldman EL, Lattimer SA. Complications, neuropathy, pathogenetic considerations. *Diabetes Care*. 1992; 15:1902-25.
- 3- Osen P, Nawroth PP, King G, Ller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications, a summary of a congress series sponsored by UNESCO-MCBN, the American diabetes association and the German diabetes

سلول‌های PC12 تمایز نیافته را پس از ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت کاهش دهد. بر طبق گزارش کوشی‌مورو، افزایش غلظت گلوکز باعث کاهش توان حیاتی سلول‌های تمایز یافته پس از ۷ روز می‌گردد که این نتایج پیشنهاد می‌کند که سلول‌های تمایز یافته مقاومت بیشتری را در برابر مرگ سلولی دارا می‌باشد (۲۰). افزایش گلوکز باعث افزایش در میزان گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد که سنجش آن به‌عنوان یک مشخصه‌ی مرگ برنامه‌ریزی شده در مطالعات اخیر مورد استفاده قرار گرفته است (۲۳). در مطالعات مختلف اثرات آنتی‌اکسیدان و رویش‌گر گونه‌های فعال اکسیژن زعفران نشان داده شده است (۱۷ و ۲۶). با این وجود هیچ مطالعه‌ای جهت بررسی اثر زعفران بر سمیت عصبی گلوکز در مدل سلولی PC12 در برون تن به‌عنوان مدل نوروپاتی دیابتی انجام نگردیده است. در این مطالعه مشخص شد زعفران می‌تواند به‌عنوان یک

- society. *Diabetes Metab Res Rev*. 2001; 17: 189-212.
- 4- Dua X, Stockklauser-Färbera K, Rösen P. A generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF- κ B, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 752-63.
- 5- Lelkes E, Unsworth BR, Ielkes PI. Reactive oxygen species apoptosis and altered NGF-signaling in PC12 pheochromatocytoma cells cultured in elevated glucose. *Neurotox Res*. 2001; 3: 189-203.
- 6- Hong H, Liu GQ. Scutellarin protects PC12 cells from oxidative stress-induced apoptosis. *J*

- Asian Nat Prod Res.* 2006; 8: 471-9.
- 7- Martin TF, Grishanin RN. PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells. *Methods Cell Biol.* 2003; 71: 267-86.
- 8- Ochiai T, Ohno S, Soeda S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin prevents the death of rat pheochromyctoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of α -tocopherol. *Neuroscience Letters.* 2004; 362: 61-4.
- 9- Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. *Phytother Res.* 2005; 19: 997-1000.
- 10- Ochiai T, Soeda S, Ohno S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin prevents the death of PC-12 cells through sphingomyelinaseceramide signaling by increasing glutathione synthesis. *Neurochem Int.* 2004; 44: 321-30.
- 11- Hadizadeh F, Mahdavi M, Emami SA, et al. Evaluation of ISO method in saffron qualification. *Acta Horticulturae.* 2007; 739: 405-10.
- 12- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 98: 55-63.
- 13- Wallach-Dayan SB, Izbicki G, Cohen PY, Gerstl-Golan R, Fine A, Breuer R. Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 290: L790-6.
- 14- Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ziaee T, Danaee A. Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. *J Pharm Pharm Sci.* 2005; 8: 387-93.
- 15- Naderi GA, Asgary S, Taher MA, Sabet B, Nik-Khoo N. Antioxidant effect of Turmeric and saffron on the oxidation of hepatocytes, LDL and non-enzymatic glycation of hemoglobin. *J Med Plants.* 2005; 4: 29-35.
- 16- Keyhani E, Ghamsari I, Keyhani J, Hadizadeh M. Antioxidant enzymes during hypoxia-anoxia signaling events in *Crocus sativus* L. corm. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1091: 65-75.
- 17- Hunjoo H, Mi Ra Y, Yoon J C, Masanori K, Hi Bahl L. Role of high glucose-induced nuclear factor-kappaB activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesanchial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 894-902.
- 18- Maedler K, Sergeev P, Ris F, et al. Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest.* 2002; 110: 851-60.
- 19- Nobuhisa M, Hideyuki Y, Hitoshi I, et al. Altered Bcl2 and bax expression and Intracellular Ca signaling in apoptosis of pancreatic cells and the impairment of glucose induced insulin secretion. *Endocrinology* 1998; 139: 1429-38.
- 20- Koshimura K, Tanaka J, Murakami Y, Kato Y. Involvement of nitric oxide in glucose toxicity on differentiated PC12 cells: prevention of glucose toxicity by tetrahydrobiopterin, a cofactor

for nitric oxide synthase. *Neurosci Res.* 2002; 43: 31-8.

21- Alen DA, Yaghoob MM, Harwood SM. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J nutria biochemistry.* 2005; 16: 705-13.

22- Sharifi AM, Mousavi SH, Farhadi M, Larijani B. Study of high glucose-induced apoptosis in PC12 cells: Role of bax protein. *J Pharm Sci.* 2007; 104: 258-62.

23- Lelkes E, Unsworth BR, Lelkes PI. Reactive oxygen species, apoptosis and altered NGF-induced signaling in PC12 pheochromocytoma cells cultured in elevated glucose: an in vitro

cellular model for diabetic neuropathy. *Neurotox Res.* 2001; 3: 189-203.

24- Greene DA, Stevens MG, Obrosova I, Feldman EL. Glucose induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol.* 1999; 375: 217-23.

25- Kasier N, Eldman IS. Calcium dependence of glucocorticoid-induced lymphocytolysis. *Proc Natl Acad Sci.* 1977; 74: 638-42.

26- Palozza P, Krinsky NI. Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*, an overview. *Meth Enzymol.* 1992; 213: 403-20.

Study of High Glucose-Induced Toxicity and Reactive Oxygen Species Production and the Protective Effect of Saffron Extract in PC12 Cells

Tayarani-Najaran Z¹, Parsaee H¹, Mousavi SH²

¹Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Dept. of Pharmacology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

²Medical Toxicology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Corresponding Author: Mousavi SH, Medical Toxicology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Email: mousavih@mumslac.ir

Received: 9 Jul 2009 **Accepted:** 17 Jan 2010

Background and Objective: Diabetic neuropathy is one of the most frequent complications of diabetes. Despite some studies, the exact mechanism of glucose neurotoxicity has not been fully elucidated. Increased reactive oxygen species (ROS) has been proposed as a possible mechanism. *Crocus sativus* L. (saffron) has been known as a source of antioxidants. Therefore, neuroprotective effect of saffron extract was studied in glucose-induced neurotoxicity, using PC12 cells as a suitable in vitro model of diabetic neuropathy.

Materials and Methods: Cell viability was quantitated by MTT assay. ROS was measured using DCF-DA by flow cytometry analysis.

Results: The result showed that glucose reduced the cell viability of PC12 cells. Saffron extract and GSH could decrease this toxicity. Glucose toxicity was consistent with increased ROS production which was reduced by saffron and GSH pre-treatment.

Conclusion: These results suggest that the glucose-induced cell toxicity could be mediated through the generation of ROS. Due to antioxidant effects of Saffron, it could be considered in diabetic neuropathy treatment in animal models.

Keywords: *Glucose, PC12, Toxicity, Reactive Oxygen Species, Saffron*